

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Ústav lékařské biofyziky

# DISERTAČNÍ PRÁCE

**Olomouc 2018**

**Jiří Dejmek**

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Ústav lékařské biofyziky

# Studium účinku fyzikálních podmínek v hyperbarické komoře na buňky

Školitel: MUDr. Lukáš Bolek, Ph.D.

Odborný konzultant: doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

Studijní obor: Lékařská biofyzika

**Olomouc 2018**

**Jiří Dejmek**

Palacky University Olomouc  
Faculty of Medicine and Dentistry  
Department of Medical Biophysics

# Study of the effect of physical conditions in the hyperbaric chamber on cells

Tutor: MUDr. Lukáš Bolek, Ph.D.

Consultant: doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.

Institute: Department of Medical Biophysics, FMD PUO

Academic discipline: Medical biophysics

**Olomouc 2018**

**Jiří Dejmeš**

**Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem svoji doktorskou disertační práci vypracoval samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

**Olomouc 2018**

**Ing. Jiří Dejmek**

**Poděkování:**

Děkuji svému školiteli MUDr. Lukáši Bolkovi, Ph.D. za intenzivní spolupráci při vývoji nové technologie mikrohyperbarické komůrky, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Veliké díky patří paní doc. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. za mnoho cenných rad k teoretické části práce a při plánování a realizaci experimentální části a zvláště pak za poskytnuté zázemí pro mitochondriální respirometrii, která byla klíčovou hodnotící metodou provedených experimentů.

Chtěl bych také poděkovat Ing. Michaele Kripnerové za její zkušenosti, rady a trpělivost, díky kterým bylo možné buněčný materiál připravit a vyhodnotit. Dále děkuji kolegyním Mgr. Michaele Kohoutové a MUDr. Miroslavě Čedíkové, Ph.D. za pomoc s hodnotícími metodami. Mgr. Tereze Rajdlové a Mgr. Markétě Kohoutkové děkuji za jazykové korektury.

Velice děkuji paní prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za podporu a možnost doktorské studium začít a dokončit.

Nejvíc děkuji své drahé rodině za jejich obrovskou podporu a víru.

Práce vznikla za podpory výzkumných fondů a grantových projektů: CZ.1.05/3.1.00/14.0307 (Nové technologie UP v biomedicíně–IA03); Výzkumný fond Univerzity Karlovy (Progres Q39); Národní programem udržitelnosti I (NPUI) č. LO1503 poskytovaný MŠMT ČR; projekt č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000787 "Fighting INfectious Diseases", udělený MŠMT ČR, financovaný z EFRR a specifický studentský výzkumný projekt č. 260394/2017 Univerzity Karlovy v Praze.

# 1. OBSAH

<b>1.</b>	<b>OBSAH</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>9</b>
<b>4.</b>	<b>FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI KYSLÍKU</b>	<b>10</b>
4.1	FYZIKA PLYNŮ	11
4.2	ROZPUSTNOST PLYNŮ	15
<b>5.</b>	<b>METABOLISMUS KYSLÍKU</b>	<b>18</b>
5.1	VNĚJŠÍ DÝCHÁNÍ (METABOLISMUS KYSLÍKU V TĚLE)	19
5.2	VNITŘNÍ DÝCHÁNÍ (BUNĚČNÁ RESPIRACE)	21
5.3	DÝCHACÍ ŘETĚZEC	23
5.4	REAKTIVNÍ KYSLÍKOVÉ FORMY (ROS) V ORGANISMU	27
<b>6.</b>	<b>VYUŽITÍ KYSLÍKU V MEDICÍNĚ</b>	<b>29</b>
6.1	TOXICITA KYSLÍKU	30
6.2	HYPERBARICKÁ OXYGENOTERAPIE	31
6.3	HYPERBARICKÉ KOMORY	35
6.4	ZÁKLADNÍ VÝZKUM HBO	37
<b>7.</b>	<b>MIKROHYPERBARICKÁ KOMŮRKA UHBK</b>	<b>40</b>
7.1	TECHNOLOGIE UHBK	41
7.2	TYP UHBK 1	47
7.3	TYP UHBK 2	53
<b>8.</b>	<b>HODNOCENÍ VLIVU HBO EXPOZICE NA HFL1</b>	<b>59</b>
8.1	BUNĚČNÝ MATERIÁL	59
8.2	PROTOKOL HBO EXPOZICE	60
8.3	HODNOTÍCÍ METODY	61
8.4	MITOCHONDRIÁLNÍ RESPIROMETRIE (HRR)	68
8.5	HODNOCENÍ DAT A STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ	71
<b>9.</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>72</b>
9.1	MIKROHYPERBARICKÁ KOMŮRKA UHBK	72
9.2	INTERMITENTNÍ EXPOZICE HBO	73
9.3	MITOCHONDRIÁLNÍ RESPIROMETRIE (HRR)	79
<b>10.</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>83</b>
10.1	MIKROHYPERBARICKÁ KOMŮRKA UHBK	83
10.2	VLIV INTERMITENTNÍ EXPOZICE HBO NA HFL1	84
10.3	DALŠÍ SMĚŘOVÁNÍ VÝZKUMU	86
<b>11.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>88</b>
<b>12.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>90</b>
<b>13.</b>	<b>SOUHRN</b>	<b>99</b>
<b>14.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>100</b>
<b>15.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>101</b>
<b>16.</b>	<b>VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA</b>	<b>103</b>

## 2. ÚVOD

Podstata vlivu některých fyzikálně-chemických faktorů na biologické procesy na buněčné, subcelulární a molekulární úrovni je dosud neúplně prostudovanou oblastí z důvodu obtížného navození vhodných experimentálních podmínek (Place et al. 2017). Zejména vliv nedostatečného nebo nadměrného přísunu kyslíku tkáním (hypoxie či hyperoxie) jsou velmi významnými oblastmi biomedicínského výzkumu. Zatímco hypoxie (vzhledem k obrovskému významu v patofyziologii četných onemocnění) je intenzivně zkoumána na buněčné, orgánové i celotělové úrovni, stavy spojené s nadměrným přívodem kyslíku jsou předmětem systematického studia mnohem vzácněji.

Kyslík je druhý nejrozšířenější plyn v zemské atmosféře (přibližně 21 %), v organismu je jedním z hlavních biogenních prvků a převážná většina organismů jej využívá jako oxidační činidlo pro značnou část metabolických procesů důležitých pro získání biologicky dostupných forem energie, buněčnou signalizaci, syntetické i biodegradační reakce. Pro studium vlivu různých typů hypoxie byla vyvinuta celá řada sofistikovaných technologií, které umožňují experimentálně navodit nejrůznější klinicky významné hypoxie, kontinuální i intermitentní (hypoxemickou, transportní, stagnační nebo histotoxickou), a to i na úrovni buněčné nebo subcelulární. Je však třeba poznamenat, že ani definice normoxie pro jednotlivé buněčné typy není triviálním úkolem a v posledních deseti letech dochází v tomto směru k diskusi (Carreau et al. 2011).

V případě hyperoxie, tedy stavu, kdy je v organismu k dispozici přebytek kyslíku, je situace v oblasti výzkumu a pochopení horší, i když je 100% kyslík používán v celé řadě medicínských i laických indikací (Brugniaux et al. 2018). Ještě méně je známo o důsledcích aplikace kyslíku při zvýšeném atmosférickém tlaku (hyperbarické hyperoxii nebo hyperbaroxii) na fyziologické děje v buňkách. V tomto směru je velmi zajímavé porovnání publikačních výstupů týkajících se stavů spojených s nedostatkem nebo nadbytkem kyslíku (hypoxia, hyperoxia nebo hyperbaric oxygen) a mitochondrií jako buněčných organel, ve kterých se více než 90 % kyslíku spotřebovává (Wagner et al. 2011). V databázi PubMed lze najít 5885 publikačních výstupů na zadání „hypoxia and mitochondria“, 345 publikací odkazujících na „hyperoxia and mitochondria“ a jen 137 na „hyperbaric oxygen and mitochondria“ (případně 173 na „hyperbaric and mitochondria“).

Hyperbarická oxygenoterapie (HBO) je podpůrná a terapeutická léčebná metoda využívající zvýšenou koncentraci kyslíku za zvýšeného atmosférického tlaku. Velké uplatnění

našla HBO např. při léčbě chronických ran, bércových vředů a dalších kožních eflorescencí (Yildiz et al. 2016; Han a Ceilley 2017; Borab et al. 2017), při léčbě tinnitu (Holy et al. 2016), otravě oxidem uhelnatým (Rose et al. 2017), u některých neurologických chorob (Al-Waili et al. 2005) aj. Možnosti jejího dalšího uplatnění jsou předmětem usilovného výzkumu.

Přestože se jedná o běžně a hojně užívanou léčebnou metodu, v odborné literatuře není dostatek podkladů pro plné pochopení biologických dějů, které v buňkách při těchto odlišných fyzikálních podmínkách probíhají. Existuje celá řada standardizovaných buněčných linií vhodných pro studium buněčně-specifické odpovědi na zkoumaný stimul (farmakologický, chemický, toxikologický, elektrický aj.) za tzv. normoxických podmínek (tj. při normálním atmosférickém tlaku a v atmosféře obsahující cca 21 % O<sub>2</sub>) nebo za podmínek hypoxické hypoxie. Hyperbarické podmínky však není možné navodit bez speciálního přístrojového vybavení. Tento typ experimentů nelze v klasických hyperbarických komorách provádět. Mají velký objem v jednotkách krychlových metrů, což je při potřebě vytvoření specifické atmosféry velmi nákladné. Současná zákonná opatření neumožňují tato zařízení plnit kyslíkem o koncentraci vyšší než 22,5 % objemového množství. Komory jsou navíc navrhovány pro dosahování nízkých pracovních tlaků (běžně do 300 kPa). Velkým problémem je jejich teplota na teploty vhodné ke kultivaci buněčných linií (37 °C), neboť jsou konstrukčně určeny pro pacienty (23 °C). Významným faktorem je také klinické využití těchto zařízení v rámci léčebných opatření.

Aby bylo možné se na studium vlivu podmínek hyperbarické hyperoxie (HBO) na buněčný metabolismus zaměřit, bylo nutné vyvinout zcela novou a unikátní technologii, která by výzkum umožnila. Spolupráce Ústavu biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni a Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci vyústila v úspěšné řešení projektu Preseed (CZ.1.05/3.1.00/14.0307-IA03), v rámci kterého bylo možné nové experimentální tlakové zařízení vyvinout. Technologie dostala název mikrohyperbarická komůrka uHBK a je v současné době chráněna národním patentem č. 305989.

Díky nové technologii bylo možné provést pilotní experimenty, které měly za cíl získat představu o rozsahu metod, na které je nutné se zaměřit k pochopení mitochondriálního zpracování kyslíku za hyperbarických podmínek. Bylo třeba také vybrat vhodné nástroje pro hodnocení, sestavit protokoly pro standardizaci kultivace a také získat představu o podobě potřebného laboratorního zázemí, ve kterém by bylo možné kontinuální základní výzkum v této oblasti provádět.



### 3. CÍLE PRÁCE

Zadaným tématem je studium účinku fyzikálních podmínek v hyperbarické komoře na buňky. Z širokého výběru možných směrů bylo vybráno hodnocení vlivu zvýšené koncentrace kyslíku na plicní fibroblasty a jejich metabolismus. Práce shrnuje fyzikálně-chemické vlastnosti kyslíku, jeho medicínské využití a rizika s ním spojená. V experimentální části se zaměřuje zejména na účinky hyperbarického kyslíku na mitochondriální respiraci. Pro vytvoření odlišných fyzikálních podmínek bylo nezbytné vyvinout novou technologii malé hyperbarické komůrky, která umožní buněčný materiál ovlivňovat. Buněčné kultury vystavené standardizovaným hyperbarickým podmínkám jsme vhodnými metodami kvantitativně i kvalitativně analyzovali, zejména s ohledem na mitochondriální spotřebu kyslíku, kvalitu a morfologii mitochondriálních sítí, antioxidační ochranu a viabilitu buněk. Práce je proto rozdělena na tři části:

1. Shrnuje fyzikálně-chemické vlastnosti kyslíku, jeho medicínské využití a rizika s ním spojená. Popisuje jeho fyziologický metabolismus na úrovni mitochondriální respirace.
2. Technologickým cílem práce bylo navrhnout novou konstrukci malé hyperbarické komůrky, která vyhovuje potřebám při krátkodobé a dlouhodobé kultivaci buněčného materiálu. Konstrukce přístroje musí být provedena podle norem, návrhů a výpočtů tak, aby splňovala požadavky na bezpečnost, stabilitu a opakovatelnost prováděných buněčných experimentů. Vyvinutá technologie malé hyperbarické komůrky by měla být patentově ochráněna.
3. Experimentálním cílem disertační práce byla aplikace hyperbarických podmínek na vybrané lidské buňky v kultuře a analýza jejich vlivu na některé mitochondriální parametry. Bylo nutné vybrat vhodnou buněčnou linii, stanovit optimální podmínky pro její kultivaci za normo- a hyperbarických podmínek, standardizovat oxygrafické protokoly a vybrat další kvalitativní a kvantitativní metody pro hodnocení účinků HBO na vybrané buňky in vitro.

## 4. FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI KYSLÍKU

Protože je cílem této práce studium vlivu zvýšené (nefyziologické) koncentrace kyslíku na buňky a jejich metabolismus, je vhodné v této souvislosti shrnout fyzikální a chemické vlastnosti kyslíku.

Kyslík byl zařazen mezi chemické prvky v roce 1777 Antoinem Lavoisierem. Při standardní teplotě a tlaku je kyslík bezbarvý plyn bez zápachu a bez chuti s molekulárním vzorcem  $O_2$ . Jedná se o vysoce reaktivní nekov a oxidační činidlo, které s většinou prvků snadno tvoří oxidy. V atmosféře tvoří plynný molekulární kyslík 20,8 objemových procent. Do zemské atmosféry je průběžně doplňován fotosyntézou, která využívá energii slunečního světla k výrobě kyslíku z vody a oxidu uhličitého. Ozon ( $O_3$ ), tříatomová molekula kyslíku, silně absorbuje ultrafialové záření UVB a ve formě ozonové vrstvy pomáhá chránit biosféru. Nejčastější sloučeninou kyslíku je voda, která pokrývá dvě třetiny zemského povrchu (hmotnostní složka kyslíku ve vodě představuje 90 %).

**Tabulka 1.** Fyzikální, chemické a termodynamické vlastnosti kyslíku při referenčních podmínkách (25 °C; 101,35 kPa).

Molekulární hmotnost	31,9988
Specifická hmotnost (Vzduch = 1)	1,105
Specifický objem [ $m^3 kg^{-1}$ ]	0,764
Hustota kapaliny při atmosférickém tlaku [ $kg m^{-3}$ ]	1142
Dynamická viskozita [ $Pa s$ ]	$20,47 \cdot 10^{-6}$
Rychlost zvuku v kyslíku [ $m s^{-1}$ ]	329
Specifické teplo $c_p$ [ $J kg^{-1} K^{-1}$ ]	920
Poissonova konstanta ( $c_p/c_v$ )	14611
Plynová konstanta $R$ [ $J kg^{-1} K^{-1}$ ]	260
Tepelná vodivost [ $W m^{-1} °C^{-1}$ ]	0,026
Bod varu při 100 kPa [ $°C$ ]	-182,97
Skupenské teplo odpařování při bodu varu [ $J kg^{-1}$ ]	213000
Bod mrazu nebo teploty tání při 100 kPa [ $°C$ ]	-218,4
Měrné skupenské teplo tání [ $J kg^{-1}$ ]	13700
Kritická teplota [ $°C$ ]	-118,6
Kritický tlak [ $MN m^{-2}$ ]	5,01
Kritický objem [ $m^3 kg^{-1}$ ]	0,0025
Hořlavost	ne

## 4.1 Fyzika plynů

Nejdůležitější veličinou, se kterou se ve vztahu k plynům setkáváme, je tlak. Je definovaný jako účinek síly působící na jednotku plochy. Z hlediska molekulárně kinetické teorie plynů si lze tlak představit jako sílu způsobenou pružnými nárazy molekul na jednotkovou plochu. Obecně je tlak označován symbolem  $p$ , jeho jednotka je Pascal [Pa], dle SI pak  $[\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}]$ . Další, převážně v medicíně používanou jednotkou tlaku, je ekvivalent sloupce rtuti [mmHg]. Převodní koeficient je  $1 \text{ mmHg} = 133 \text{ Pa}$ . Tlak  $1 \text{ mmHg}$  je ekvivalentní starší jednotce tlaku Torr. Jednotka mmHg není jednotkou SI, v odborném textu by tedy neměla být užívána. Vzhledem k tradičnímu užívání v medicíně bude v následujícím textu uváděn tlak vždy v Pa a v závorce pak jeho hodnota v mmHg.

Je nutné přesně rozlišovat termíny absolutní tlak a přetlak. Přetlakem se rozumí tlakový rozdíl mezi tlakem atmosférickým v daném místě a zvýšeným tlakem v prostoru, kde je měřen. Parciální tlaky plynů se zpravidla uvádějí jako tlaky absolutní. Většina tlakoměrů na přístrojích však udává přetlak. 10 m pod vodní hladinou je hydrostatický tlak přibližně 100 kPa. Absolutní tlak v daném místě je pak daný součtem tlaku hydrostatického a atmosférického působícího na hladinu. (Barcal et al. 2000; Hájek 2017).

### Hydrostatický tlak a Pascalův zákon

Uvažujme sloupec kapaliny ve válcové nádobě se svislou osou, ve které spočívá tíha kapaliny na dně nádoby. Síla, kterou působí kapalina na dno, bude přímo úměrná objemu kapaliny  $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$ , hustotě této kapaliny a gravitačnímu zrychlení a je vyjádřena vztahem:

$$F = \pi \cdot r^2 \cdot h \cdot \rho \cdot g \quad (1)$$

kde  $r$  [m] vyjadřuje poloměr nádoby,  $\rho$   $[\text{kg m}^3]$  je hustota kapaliny,  $h$  [m] je výška sloupce kapaliny a  $g$   $[\text{m s}^{-2}]$  je gravitační zrychlení. Transformací předešlého vztahu lze vyjádřit (hydrostatický) tlak působící kapaliny na dno nádoby:

$$p = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot h \cdot \rho \cdot g}{\pi \cdot r^2} = h \cdot \rho \cdot g \quad (2)$$

Touto úpravou mizí z konečného výrazu pro hydrostatický tlak symboly pro objem kapaliny i nádoby, zůstala jen výška (sebetenčího) sloupce kapaliny, hustota a gravitační zrychlení. Tento fakt je označován jako „hydrostatické paradoxon“.

Hydrostatický tlak v definované hloubce známé kapaliny se známou hustotou slouží jako názorná a dobře reprodukovatelná jednotka tlaku s označením mmH<sub>2</sub>O či mmHg. Pascalův

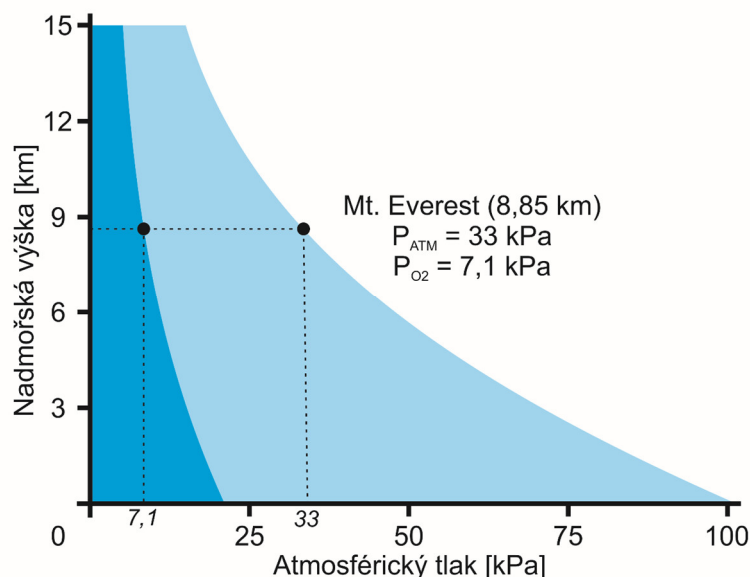
zákon je důležitým zákonem mechaniky tekutin a vyjadřuje, že tlak vyvolaný vnější silou, která působí na kapalinu (či plyn) v uzavřené nádobě, je ve všech místech této tekutiny stejný, působí rovnoměrně všemi směry a přenosem tlaku do libovolného místa v tekutině se tlak nikde neztrácí. Přenos tlaku je umožněn pohybem částic kapaliny a rozkladem vzájemných intermolekulárních sil do všech směrů. Pascalův zákon je možné považovat za statický limit Bernoulliho rovnice a je vyjádřen rovnicí:

$$P_1 - P_2 = -\rho \cdot g \cdot (h_2 - h_1) \quad (3)$$

kde  $h_1$  [m] a  $h_2$  [m] jsou dvě rozdílné výšky kapaliny,  $\rho$  [kg m<sup>3</sup>] je hustota kapaliny a  $g$  [m s<sup>-2</sup>] je tíhové zrychlení. Pro ideální kapalinu a ideální plyn platí tento zákon zcela přesně (Rumble 2018; Jain 2017; Barcal et al. 2000; Hájek 2017).

### Aerostatický tlak, Ideální plyn, Stavová rovnice plynů

Obdobně lze tlakové působení sloupce kapaliny aplikovat i na tlak vytvořený vlastní tíhou plynu, nejčastěji naší atmosféry. Je však nutné započítat změnu hustoty plynu, která se s narůstajícím tlakem zvětšuje a výpočet se stává komplikovaným, v extrémních případech až nespolehlivým. Do nadmořské výšky 700 m ubývá s přibližně 100 Pa na každých 8 m výšky. Na grafu 1 je znázorněna funkce tlakového gradientu vzduchu a parciálního tlaku kyslíku se vzrůstající nadmořskou výškou.



**Graf 1.** Parciální tlak kyslíku v závislosti na nadmořské výšce (Hájek 2017).

Zákony popisující teoretické chování plynů mají v hyperbaroxii zásadní význam. Teoretický předpoklad se od skutečného chování plynů liší, odchylky těchto obecně platných zákonů se zvyšují se vzrůstajícím tlakem a snižují se teplotou. Pro zjednodušení je zaveden pojem

ideálního plynu, chovajícího se podle plynových zákonů beze zbytku. Stavová rovnice ideálního plynu vyjadřuje vzájemnou závislost stavových veličin při termodynamických dějích v ideálním plynu. Lze ji vyjádřit ve tvaru:

$$p \cdot V = n \cdot R \cdot T \quad (4)$$

kde  $p$  [Pa] je tlak plynu,  $V$  [m<sup>3</sup>] je objem plynu,  $n$  [-] je látkové množství,  $R$  je univerzální molární plynová konstanta ( $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) a  $T$  [K] je termodynamická teplota.

Stavovou rovnici ideálního plynu lze pro popis reálných plynů použít pouze v poměrně úzkém rozmezí teplot a tlaků. Z hlediska molekulárně kinetické teorie plynů mají molekuly ideálního plynu nulové rozměry a nedochází k vzájemné elektrostatické interakci. V reálném prostředí „tuhé“ molekuly za vyšších tlaků zabírají již nezanedbatelnou část celkového „pružného“ objemu plynu a jejich vzájemná přitažlivost brání jejich volnému rozpínání a je důvodem odlišného chování reálných plynů v porovnání s výsledky výpočtů ze zákonů ideálního plynu.

Plyny užívané při HBO, tedy kyslík, dusík a helium, mají v rozsahu používaných a uvažovaných tlaků a teplot odchylky od chování ideálního plynu významně menší, než jsou přesnosti obvyklých měření. Je tedy možné zanedbat složitější popisy chování plynů, jakým je např. van der Waalsova rovnice a pro popis jejich chování použít klasické zákony ideálních plynů (Rumble 2018; Jain 2017; Barcal et al. 2000; Hájek 2017).

### Zákony ideálního plynu

Boyle–Mariottův zákon je termodynamický vztah pro izotermický děj, probíhající v ideálním plynu za stálé teploty. Součin tlaku a objemu plynu je tedy za dané teploty konstantní. Podle Gay-Lussacova zákona je tlak lineární funkcí teploty. Spojením obou zákonů lze získat vztah odvozený Clapeyronem:

$$p \cdot V = R \cdot T \quad (5)$$

kde  $R$  [J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>] je molární plynová konstanta, která má základní význam ve všech termodynamických a fyzikálně chemických úvahách. Stavová rovnice plynu se někdy teoreticky uvažuje ne pro 1 mol látky, ale pro jedinou molekulu plynu. Matematický zápis stavové rovnice je pak stejný, univerzální plynová konstanta  $R$  je nahrazena symbolem  $k_B$ , tzv. Boltzmannovou konstantou. Boltzmannova konstanta vyjadřuje vztah mezi teplotou a energií plynu, tedy množství energie potřebné k zahřátí jedné částice ideálního plynu o jeden kelvin. Hodnota Boltzmannovy konstanty je  $k_B = 1,380 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ .

Ze stavové rovnice plynu lze odvodit, že 1 mol jakéhokoliv plynu zaujímá za normálních podmínek (273,15 K; 101,325 kPa) objem 22,4 l. Působením roztažnosti zaujímá 1 mol plynu při teplotě 25 °C objem 24,45 l. Vztah mezi molární plynovou konstantou a Boltzmannovou konstantou spojuje Avogadrova konstanta, která vyjadřuje počet částic v jednotkovém látkovém množství (1 mol). Avogadrova konstanta  $N_A$ , je definována jako celkový počet atomů v dvanácti gramech nuklidu uhlíku  $^{12}_6\text{C}$  a její experimentálně zjištěná hodnota je  $N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ .

K zákonům ideálního plynu patří Daltonův zákon parciálních tlaků pro směs chemicky netečných plynů. Tyto plyny jsou libovolně mísitelné v každém poměru. Výsledný (celkový) tlak plynu tvořeného směsí několika vzájemně nereagujících plyných složek je roven součtu všech parciálních (částečných) tlaků jednotlivých složek. Matematicky je zákon vyjádřen jako:

$$p = p_1 + p_2 + \dots + p_n = \sum_{i=1}^n p_i \quad (6)$$

kde  $p_1, p_2, \dots, p_n$  [Pa] představuje parciální (částečný) tlak každého z plynů přítomných ve směsi. Parciální tlak má zcela klíčový význam pro pochopení principů hyperbaroxie, protože chemické, biochemické, a tedy i biologické účinky plynů, předně kyslíku, závisí pouze na parciálním tlaku a nejsou závislé na příměsi ostatních plynů směsi. Plyn se tedy v obecných podmínkách chová chemicky podle svého parciálního tlaku tak, jako by byl v prostoru přítomen pouze sám.

Třetím významným zákonem pro popis chování ideálního plynu je Gay-Lussacův zákon. Gay-Lussac roku 1802 studoval chování plynů za různých teplot a odvodil, že všechny plyny se teplem rozpínají stejně. Jde o tzv. děj isochorický. Zvyšováním termodynamické teploty plynu v izolované nádobě ( $V = \text{konst.}$ ) bude tlak stoupat dle vztahu:

$$p_t = p_0 \cdot (1 + \gamma \cdot t) \quad (7)$$

kde  $p_t$  [Pa] je tlaková změna systému,  $p_0$  [Pa] je tlak při 0 °C,  $\gamma$  [K<sup>-1</sup>] je teplotní součinitel (koeficient) roztažnosti daného plynu a  $t$  [°C] je změna teploty. Pokud bude mít plyn konstantní tlak, bude se jeho objem zvětšovat analogicky dle vztahu:

$$V_t = V_0 \cdot (1 + \gamma \cdot t) \quad (8)$$

kde  $V_t$  [m<sup>3</sup>] je objemová změna systému,  $V_0$  [m<sup>3</sup>] je výchozí objem při 0 °C,  $\gamma$  [K<sup>-1</sup>] je teplotní součinitel (koeficient) roztažnosti daného plynu a  $t$  [°C] je změna teploty. Jde o tzv. děj isobarický. Grafickým vyjádřením těchto závislostí jsou přímky (isochora, isobara). (Rumble 2018; Jain 2017; Barcal et al. 2000; Hájek 2017)

## 4.2 Rozpustnost plynů

Obecně platí, že plyny se v kapalinách rozpouštějí. Pokud nedojde k chemické reakci mezi plynem a kapalinou, řídí se rozpouštění Henryho zákonem. Pro páry rozpuštěné látky platí přímá úměra mezi tlakem par této látky a jejím frakčním molárním zlomkem  $x_i$  v roztoku. Konstantou úměrnosti je Henryho konstanta  $K_H$  [ $\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$ ], je charakteristická pro daný plyn při  $p = 101,325 \text{ kPa}$ , závisí na teplotě a s rostoucí teplotou se zvyšuje. Zákon je vyjádřen rovnicí:

$$p_i = K_H \cdot x_i \quad (9)$$

kde  $p_i$  [Pa] je parciální tlak kyslíku v plynné fázi,  $K_H$  [ $\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$ ] je Henryho konstanta a  $x_i$  [-] je molárním zlomek rozpuštěné složky, tedy podíl látkového množství složky a součtu látkového množství všech složek směsi. Úpravou lze zákon vyjádřit pro stanovení koncentrace rozpuštěného plynu ve vodě, která je přímo úměrná parciálnímu tlaku plynu nad její hladinou:

$$c_i = K_H \cdot p_i \quad (10)$$

Rozpustnost plynu zpravidla prudce klesá s rostoucí teplotou. Rozdílné absorpční (koncentrační) koeficienty  $c_i$  [ $\text{mol/m}^3$ ] pro různé plyny vedou ve svém důsledku k tomu, že objemové složení rozpuštěných plynů se liší od složení plynů nad kapalinou. Rozpustnost plynů v kapalinách, konkrétně v tělesných tekutinách, je velice důležitým problémem, na který je nutno brát v hyperbaroxii zřetel. Při zvýšeném tlaku se rozpustí značné množství plynů, které se při dekompresi mohou uvolňovat ve formě bublinek (dekompresní nemoc). Henryho konstanta rozpustnosti plynů se mění s teplotou podle Van't Hoffovy rovnice:

$$K_H(T) = K_H(T^*) \left[ -C \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T^*} \right) \right] \quad (11)$$

kde  $K_H$  je Henryho konstanta,  $C$  je konstanta vztahující se k entalpii rozpustnosti pro daný plyn a  $T^*$  představuje standardní stav ( $T = 298,15 \text{ K}$ ;  $p = 101,325 \text{ kPa}$ ). Řešení této rovnice je velmi komplikované, proto se v literatuře vychází z tabulkových hodnot. Rozpustnost dle teploty lze také stanovit z rovnice empirické aproximace (Rumble 2018) ( $T^* = T/100$ ):

$$\ln x_i = A + \frac{B}{T^*} + C \cdot \ln T^* \quad (12)$$

**Tabulka 2. Hodnoty rozpustnosti kyslíku ve vodě a parametry rovnice empirické aproximace**

	<b>T [K]</b>	<b>Rozpustnost [<math>x_{O_2}</math>]</b>	<b>Konstanty rovnice</b>
<b>Kyslík</b> ( $M_r = 31,9988$ )	288,15	$2,756 \times 10^{-5}$	A = - 66,7354
	293,15	$2,501 \times 10^{-5}$	B = 87,4755
	298,15	$2,293 \times 10^{-5}$	C = 24,4526
	303,15	$2,122 \times 10^{-5}$	SD = $\pm 0,36 \%$
	308,15	$1,982 \times 10^{-5}$	Platné pro 273,15 - 348,15 K
	310,15	$1,936 \times 10^{-5}$	

Hodnoty Henryho konstanty rozpustnosti pro základní plyny ve vodě při 25 °C jsou uvedeny v tabulce 3 (100% koncentrace daného plynu nad hladinou,  $p_{ATM} = 101,325$  kPa). V tabulce 3 jsou také uvedeny hodnoty rozpuštěných plynů v dalších jednotkách, které se v literatuře běžně užívají (Rumble 2018; Sander 2015).

**Tabulka 3. Hodnoty Henryho konstanty rozpustnosti  $K_H$  pro základní plyny ve vodě při 25 °C**

<b><math>K_H</math></b>	<b>O<sub>2</sub></b>	<b>H<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>N<sub>2</sub></b>
Pa·m <sup>3</sup> /mol	$74,7 \cdot 10^6$	$121,2 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	$155,0 \cdot 10^6$
l/mol	756,51	1227,76	29,75	1570,15
mmol/l	1,32	0,81	33,61	0,64
mg/l	41,31	404,04	763,73	22,73
ml/l	32,32	19,91	821,80	15,57

Hodnoty koncentrace rozpuštěného vzdušného kyslíku (při  $p_{O_2} = 21$  kPa) ve vodě při vybraných hodnotách tlaků v závislosti na teplotě vody shrnuje následující tabulka (Rumble 2018). Je důležité upozornit, že se v literatuře hodnoty rozpuštěného kyslíku liší.

**Tabulka 4. Hodnoty množství rozpuštěného vzdušného kyslíku na litr vody (frakce plynu 21%) při zvyšujícím se atmosférickém tlaku**

<b>Tlak [abs]</b>	760 mmHg 101,3 kPa			1520 mmHg 202,6 kPa			3040 mmHg 405,2 kPa		
	$\mu\text{mol/l}$	mg/l	ml/l	$\mu\text{mol/l}$	mg/l	ml/l	$\mu\text{mol/l}$	mg/l	ml/l
<b>Teplota</b>									
0 °C	461,1	14,6	10,3	913	29,2	20,5	1844	58,4	41,3
10 °C	355,9	11,27	8,3	705	22,6	16,4	1423	45,1	33,1
25 °C	263,4	8,34	6,4	517	16,5	12,6	1053	33,4	25,8
35 °C	218,9	6,93	5,5	436	14	11	875	27,7	22,1
37 °C	211,9	6,71	5,4	423,8	13,4	10,8	847	26,8	21,6
40 °C	202,4	6,41	5,2	404	12,9	10,4	810	25,6	20,8

Uvedené hodnoty rozpustnosti kyslíku platí pro vodu, u které neuvažujeme příměsi. Lze tedy konstatovat, že kyslík vstupující do vodného roztoku vytváří slabé interakce s molekulami vody. U nehomogenních médií, jako je plasma nebo kultivační roztoky, nastává komplikovanější situace. Slabé interakce mezi kyslíkem a vodou jsou narušeny přítomností nabitých elektrolytů a bílkovin, které tvoří s vodou mnohem silnější interakce. Henryho



konstanta pro tyto kapaliny pak závisí na koncentraci elektrolytů, bílkovin a teplotě roztoku (Place et al. 2017).

V případě buněčných kultivací závisí množství rozpuštěného kyslíku také na dalších faktorech. Standardně je v atmosféře inkubátoru pro stabilizaci pH média přítomno 5 % CO<sub>2</sub>. Dalším důležitým faktorem, který ovlivní množství rozpuštěného kyslíku, je vlhkost vzduchu (uvažujeme 100 % RH). Při 37 °C a 100% RH má vodní pára parciální tlak 6,251 kPa (47 mmHg). Při tlaku ekvivalentu hladiny moře zabírá vodní pára 6,2 % celkového objemu plynu. Reálné množství kyslíku v inkubátoru lze vyjádřit rovnicí:

$$[\%] O_{2(\text{aktuální})} = ([\%] O_{2(\text{výchozí})} \cdot (1 - \% \text{ plyn}_{(1)} - \dots \% \text{ plyn}_{(n)})) \cdot 100 \quad (13)$$

Výpočet reálného množství kyslíku v inkubátoru po započtení vodní páry a oxidu uhličitého vychází  $[(0,21 \times (1 - 0,062 - 0,05) \times 100) = 18,6 \%$ . Skutečné procento kyslíku zaujímající atmosféru typického inkubátoru pro buněčné kultury je pouze 18,6 % kyslíku. V porovnání s 20,8 % objemových procent kyslíku v atmosféře se jedná o mírně hypoxické prostředí. Dalším faktorem ovlivňujícím množství kyslíku je nadmořská výška, koncentrace vzdušného kyslíku s nadmořskou výškou klesá. Se změnou nadmořské výšky se bude množství rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu rovněž lišit (Place et al. 2017).

## 5. METABOLISMUS KYSLÍKU

Kyslík je významným biogenním prvkem a jeho přítomnost je nezbytná pro existenci většiny živých organismů na této planetě. Hraje důležitou roli v energetickém metabolismu živých organismů a je nedílnou součástí buněčného dýchání. Kyslík je obsažen v organických molekulách živých organismů (proteiny, nukleové kyseliny, sacharidy a tuky), stejně jako v hlavních anorganických sloučeninách živočišných skořápek, zubů a kostí. Volný kyslík je generován v biosféře fotolýzou při fotosyntéze v zelených řasách a rostlinách. Během oxidační fosforylace při buněčné respiraci je kyslík zpět redukován na vodu, čímž se biologický redoxní cyklus vody a kyslíku uzavírá.

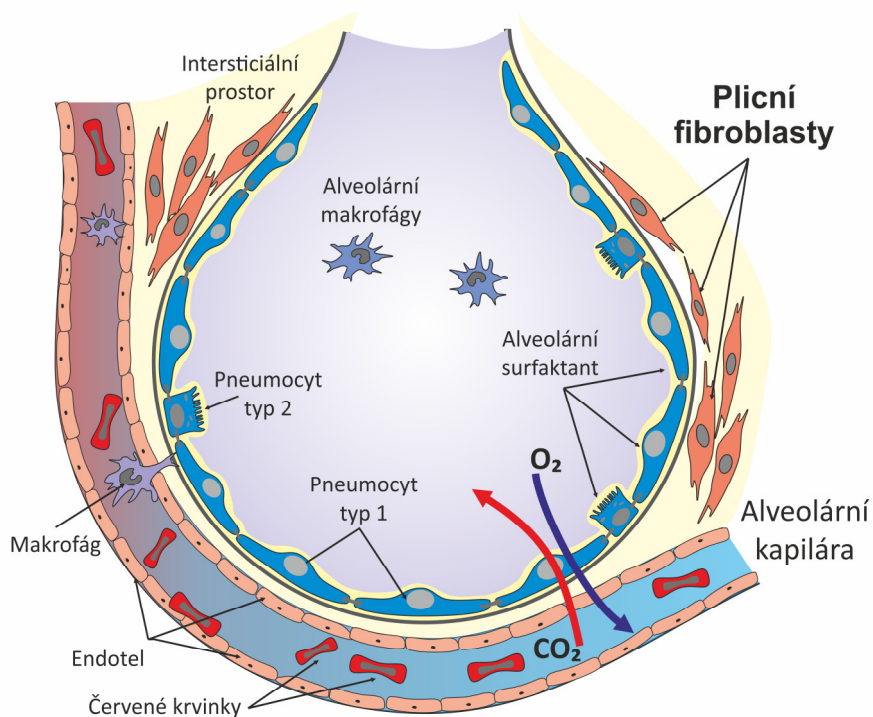
Naprostá většina živočichů včetně člověka kyslík potřebuje k buněčnému dýchání pro přeměnu živin na energii. K výměně dýchacích plynů (kyslíku a oxidu uhličitého) mezi vnějším a vnitřním prostředím dochází v orgánové dýchací soustavě. Vzduch se dostává do plic ve fázi vdechu a zásobuje tak tělo kyslíkem. Při výdechu je vzduch z plic vytlačován a zároveň je z těla vylučován oxid uhličitý. Molekuly kyslíku a oxidu uhličitého jsou v krvi při tomto procesu převážně vázány na hemoglobin v červených krvinkách, cévním systémem transportovány po těle a pasivně vyměňovány difuzí mezi okolním prostředím a krví. V tkáních je kyslík po přestupu přes buněčnou membránu metabolizován. Oxid uhličitý, odpadní produkt metabolických reakcí, se z buněk uvolňuje zpět do krve, která ho odnáší zpátky do plic a proces se opakuje.

Protože je cílem této práce studium vlivu zvýšené (nefyziologické) koncentrace kyslíku na plicní fibroblasty a jejich metabolismus, je podstatné se dále zaměřit na popis transportu kyslíku ze vzduchu procesem vnějšího dýchání do alveolů a jeho metabolismus při vlastní buněčné respiraci. V případě HBO expozice jsou plicní buňky tou tkání, která je zvýšením parciálního tlaku (koncentrace) kyslíku exponována nejvíce. Proto zde nebude popsán celý složitý komplex fyziologie dýchání a následující část se zaměří jen na oblasti plicních alveolů. Větší pozornost je pak věnována vnitřnímu buněčnému dýchání, tj. mitochondriální respiraci pomocí elektronovému transportnímu řetězce, kde je kyslík finálně zpracováván. Hodnocení mitochondriální respirace je také stěžejní metoda hodnocení vlivu provedených HBO experimentů.

## 5.1 Vnější dýchání (metabolismus kyslíku v těle)

Vnější dýchání je chápáno jako výměna plynů mezi organismem a zevním prostředím. Kyslík se dostává dýchacími cestami do plicních alveolů (sklípků), odtud difunduje do krve a následně přes buněčné membrány erytrocytů, endotelových a tkáňových buněk až do mitochondrií. V nich vznikají při oxidativním metabolismu voda a oxid uhličitý, který se opačným postupem dostává přes krev a plíce do zevního prostředí. Vedle tlakových změn při ventilaci se v procesu transportu plynů uplatňují ještě další fyzikální procesy, jako jsou například distribuce a difuze plynů a plicní perfuze.

V plicích se nachází až 300 milionů alveolů o rozměrech 0,3–0,7  $\mu\text{m}$  s celkovým povrchem 70–90  $\text{m}^2$ . Vzdálenost vzduchu od krve je přibližně 0,5  $\mu\text{m}$ , což umožňuje efektivní výměnu plynů difúzí.



**Obrázek 1.** Anatomická struktura alveoly

Bariéra krev-vzduch má 4 vrstvy, které tvoří respirační epitel plicních sklípků, bazální retikuloelastické membrány, a kapilárního endotel. Součástí interalveolárního septa jsou dvě vrstvy plochého epitelu (pneumocyty 1. a 2. typu), mezi kterými leží intersticiální vazivo poskytující oporu kapilárám, typické vazivové buňky (fibroblasty), elastická, kolagenní a retikulární vlákna. Každé septum je společné sousedním alveolům. Kapilární síť je v jejich nejtěsnějším sousedství a tvoří nejbohatší kapilární síť v těle. Membránové pneumocyty (typ 1, 95 % pokrytí) jsou ploché epitelové buňky vystylající alveolární výběžky, mají

čočkovité jádro a jejich tělo je převážně uložené v těsné blízkosti kapilár. Granulární pneumocyty (typ 2) mají kulovitý tvar, volný povrch s mikroklyky a spočívají na bazální membráně. Jejich důležitou funkcí je tvorba surfaktantu, který napomáhá zmenšení povrchového napětí. V alveolech se vyskytují ještě další typy buněk (alveolární makrofágy).

Difuze plynů mezi alveolárním prostorem a nitrem erytrocytů je způsobena rozdílem parciálních tlaků. Průměrný  $pO_2$  v alveolech je 13,8 kPa (104 mmHg) a  $pCO_2$  je 5,3 kPa. Do plic vstupující venózní krev má  $pO_2$  přibližně 5,3 kPa (40 mmHg) a  $pCO_2$  6,2 kPa (46 mmHg). Převážná část objemu krve vstupujícího z plic do levé síně je okysličená až na  $pO_2$  cca 13,8 kPa (104 mmHg). Minoritní objem krve přichází do levé síně z nutričního plicního oběhu, který zásobuje zejména hluboké tkáně plic. Tato krev není plicnímu vzduchu vůbec vystavena a hodnota jejího  $pO_2$  je stejná jako u normální systémové žilní krve, tedy pouze 5,3 kPa (40 mmHg). Mísící se krev z funkčního a nutričního oběhu má v místě vstupu do levé síně hodnotu  $pO_2$  přibližně 12,6 kPa (95 mmHg) (Hall a Guyton 2005). Objem fyzikálně rozpuštěného kyslíku v 1 litru krve je přibližně 3 ml, objem kyslíku vázaného na hemoglobin je přibližně 197 ml. 1 g hemoglobinu váže až 1,34 ml kyslíku a při průměrné koncentraci hemoglobinu v krvi 150 g/l vychází, že v 5 l krve je tedy navázán přibližně 1 l kyslíku (Ganong 2005; Trojan 2003; Hall a Guyton 2005).

**Tabulka 5.** Parciální tlaky plynů v různých částech respirační soustavy (Ganong 2005)

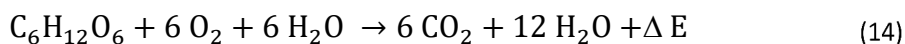
kPa mmHg	Atmosférický vzduch	Nadechovaný vzduch	Alveolární vzduch	Vydechovaný vzduch	Levé srdce	Tkáně	Pravé srdce
$O_2$	<b>21,00</b>	<b>21,00</b>	<b>13,30</b>	<b>15,43</b>	<b>12,64</b>	<b>5,32</b>	<b>5,32</b>
	158	158	100	116	95	40	40
$CO_2$	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	<b>5,32</b>	<b>4,26</b>	<b>5,32</b>	<b>6,12</b>	<b>6,12</b>
	0,3	0,3	40	32	40	46	46
$H_2O$	<b>0,49</b>	<b>0,76</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>
	3,7	5,7	47	47	47	47	47
$N_2$	<b>79,40</b>	<b>79,27</b>	<b>76,21</b>	<b>75,15</b>	<b>76,21</b>	<b>76,21</b>	<b>76,21</b>
	597	596	573	565	573	573	573

Arteriální krev má  $pO_2$  přibližně 12,6 kPa (95 mmHg), saturace kyslíkem je průměrně 97 %. Parciální tlak kyslíku v extracelulární tekutině obklopující tkáňové buňky má hodnotu průměrně pouze 5,32 kPa (40 mmHg). Tento tlakový rozdíl (koncentrační gradient) způsobuje rychlou difuzi kyslíku z kapilární krve do tkání, kapilární  $pO_2$  klesá téměř na úroveň tlaku 5,32 kPa (40 mmHg) v intersticiu. Proto má krev opouštějící tkáňové kapiláry a vstupující do systémových žil hodnotu přibližně  $pO_2$  5,32 kPa (40 mmHg), její saturace je pouze 75 %. Hodnota normálního intracelulárního  $pO_2$  se pohybuje od 5,32 kPa

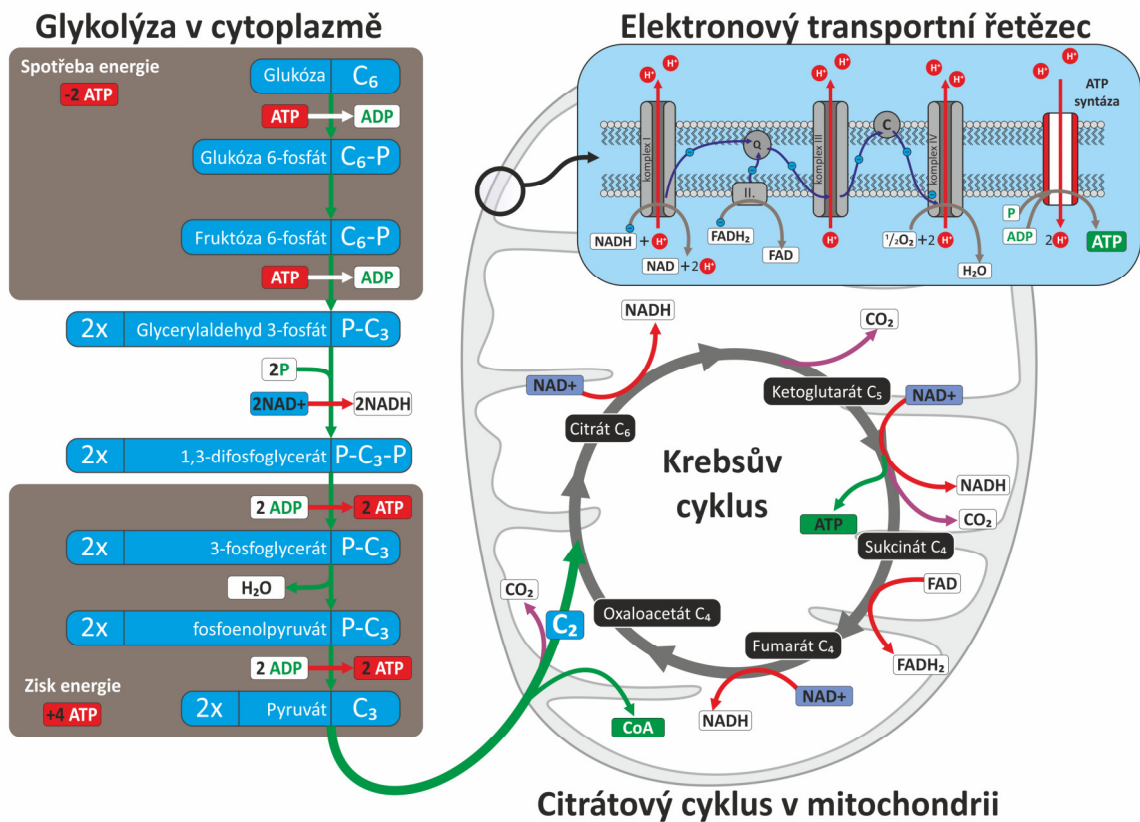
(40 mmHg) až po 0,67 kPa (5 mmHg). Pro plnou podporu chemických procesů buněčného metabolismu využívajícího kyslík je potřeba pouze 0,13 až 0,4 kPa (1 až 3 mmHg) pO<sub>2</sub> kyslíku (Hall a Guyton 2005; Ganong 2005).

## 5.2 Vnitřní dýchání (buněčná respirace)

Buněčná respirace je složitý biochemický a bioenergetický proces. Během buněčného metabolismu jsou základní živiny (cukry, tuky, bílkoviny) štěpeny až na dvouuhlíkaté fragmenty Acetyl CoA, které jsou pak následně oxidovány a jako odpadní produkty se uvolňují oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>) a voda. Vodíkové kationty (protony) a elektrony uvolněné při oxidaci jsou přenášeny koenzymy NAD<sup>+</sup> a FADH, které jsou pak následně redukovány na NADH + H<sup>+</sup> a FADH<sub>2</sub>. V průběhu respirace je energie získaná oxidací živin využita na tvorbu gradientu vodíkových protonů, který je pak využit jako zdroj energie k syntéze ATP z ADP. Stechiometricky lze celý proces popsat např. rovnicí pro oxidaci glukózy:



Většina metabolických procesů vedoucích k zisku energie ve formě ATP probíhá v mitochondriích. Mitochondrie jsou elipsoidní organely s vlastním genetickým aparátem, které obsahují dva typy membrán: vnější a vnitřní. Vnější mitochondriální membrána obsahuje mimo jiných protein porin, který umožňuje prostou difuzi. Vnitřní membrána je volně propustná pouze pro plyny (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) a vodu. Vnitřní membrána obsahuje proteinové přenašeče, které regulují průchod iontů, metabolitů a dalších sloučenin. Membrány určují dva oddělené prostory: mezimembránový prostor a matrix (gelovitou hmotu s obsahem vody menším než 50 %). Proteiny, podílející se na transportu elektronů (z NADH a FADH<sub>2</sub>) na kyslík (oxidaci) a mitochondriální tvorbě ATP (fosforylaci), jsou vázány k vnitřní mitochondriální membráně. Celý děj je souhrnně zobrazen na obrázku 2 a probíhá pro glukózu v několika níže popsaných krocích.



**Obrázek 2.** Schematické znázornění systému buněčné respirace (glykolýza, Krebsův cyklus, a oxidativní fosforylace)

**Glykolýza** – V cytoplasmě je glukóza štěpena glykolýzou. Po fosforylaci, konverzi na fosforylovanou fruktózu a vazbě další fosfátové skupiny se hexóza rozštěpí na 2 triózy, které se dále metabolizují. Při rozštěpení 1 molekuly glukózy se uvolní energie, která odpovídá 2 molekulám ATP. V aerobních podmínkách je konečným produktem glykolýzy pyruvát (Ganong 2005; Voet a Voet 2011; Gnaiger 2014).

**Krebsův cyklus** - Pyruvát je přenesen do matrix mitochondrií, kde je dále oxidován pyruvátdehydrogenázou na CO<sub>2</sub> a acetyl-CoA, který se slučuje s oxaloacetátem (4C) na citrát (6C). Během cyklu se uvolní další dvě molekuly ATP (na původní molekulu glukózy), dochází k redukci koenzymů NAD<sup>+</sup> a přenosu vodíkových protonů a elektronů na respirační komplexy vnitřní membrány mitochondrií. Vedlejším produktem probíhajících procesů je také oxid uhličitý (Ganong 2005; Voet a Voet 2011; Gnaiger 2014).

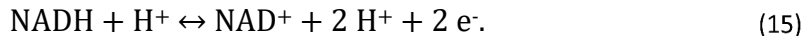
**Dýchací řetězec** – Elektrony a vodíkové protony z redukováných koenzymů jsou dále přenášeny složitými komplexy dýchacího řetězce, které se skládají z mnoha proteinových podjednotek a přenašečů elektronů (flavoproteiny, Fe-S klastry, cytochromy). Transport elektronů vnitřní mitochondriální membránou horizontálně poskytuje energii k přečerpávání protonů některými respiračními komplexy vertikálně, tj. z mitochondriální matrix

do prostoru mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou. Činnost těchto protonových přenašečů vytváří na vnitřní membráně elektrochemický koncentrační gradient (Ganong 2005; Voet a Voet 2011; Gnaiger 2014). Konečným akceptorem elektronů je elementární kyslík, který reaguje s vodíkovými protony za vzniku vody.

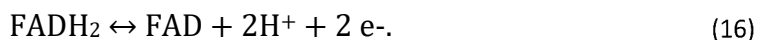
**Fosforylace** - Vnitřní membrána mitochondrií je pro vodíkové protony neprostupná, do mezimembránového prostoru jsou pumpovány činností respiračních komplexů při současném přenosu elektronů. Vodíkové protony se vrací do mitochondriální matrix pomocí ATP-syntázy, která je zakotvená ve vnitřní mitochondriální membráně a tvoří kanál pro průchod iontů. Energie této protonmotivní síly je využívána k syntéze ATP (Ganong 2005; Voet a Voet 2011; Gnaiger 2014).

### 5.3 Dýchací řetězec

Dýchací řetězec (elektrontransportní řetězec, elektrontransportní systém) je souborem navazujících přenašečů elektronů vnitřní mitochondriální membrány, které jsou zodpovědné za sled redoxních reakcí, jež ukončují odbourávání sacharidů, lipidů a bílkovin. Během tohoto odbourávání dochází ke vzniku redukováných koenzymů NADH a FADH<sub>2</sub>. NADH (nikotinamidadenindinukleotid) se v dýchacím řetězci oxiduje na NAD<sup>+</sup> dle reakce:

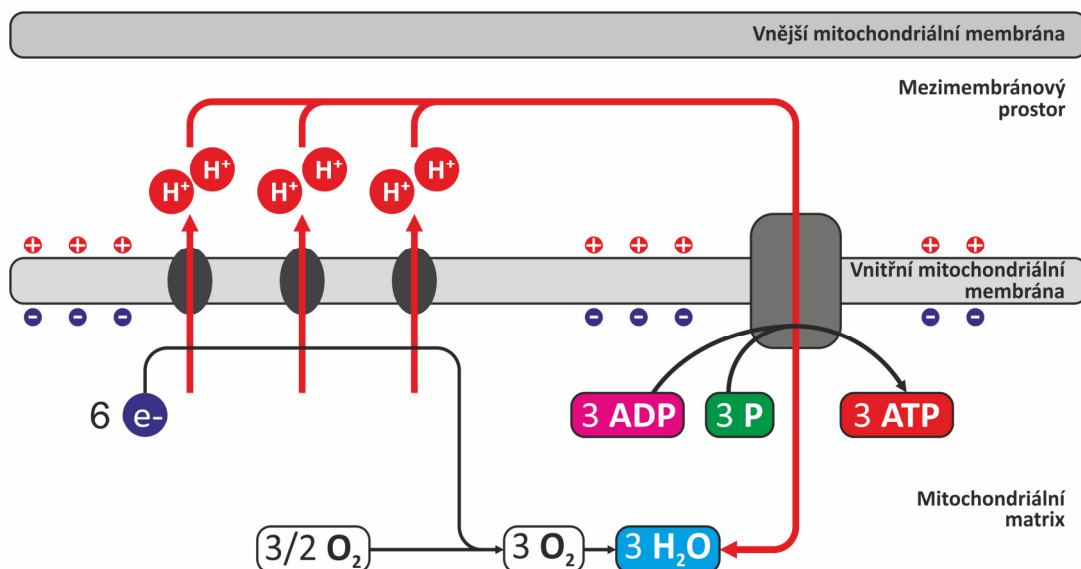


FADH<sub>2</sub> (flavinadenindinukleotid) se v dýchacím řetězci oxiduje na FAD dle reakce:



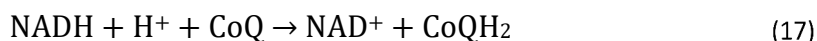
Z redukováných koenzymů jsou elektrony přenášeny systémem akceptorů, uspořádaných v dýchacím řetězci, na atomární kyslík za vzniku vody (Duška a Trnka 2007; Voet a Voet 2011; Teplá 2017).

Kromě enzymů dýchacího řetězce jsou ve vnitřní mitochondriální membráně zabudovány i transportní proteiny pro ionty a různé nízkomolekulární látky (ATP; NADH, pyruvát, oxaloacetát, glutamát, malát aj.). Elektronový transportní řetězec zpracovává redukované koenzymy dodávané z cytoplasmy a Krebsova cyklu (matrix mitochondrie). Tyto koenzymy jsou opětovně oxidovány pomocí elektronového transportního řetězce. Soubor čtyř hlavních enzymových komplexů je označován jako Komplexy I-IV (Ganong 2005; Gnaiger 2014; Teplá 2017; Hall a Guyton 2005).

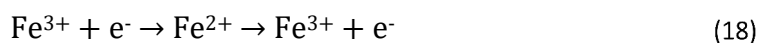


**Obrázek 3.** Zjednodušené schéma dýchacího řetězce

**Komplex I** (NADH-ubichinonoxidoreduktasa) přenáší elektrony z NADH na koenzym Q (CoQ, ubichinon), který se redukuje na ubichinol (CoQH<sub>2</sub>). Oxidace NADH je výraznou exergonickou reakcí, tj. reakcí doprovázenou poklesem Gibbsovy energie ( $\Delta G < 0$ ), která může probíhat samovolně a probíhá podle rovnice:



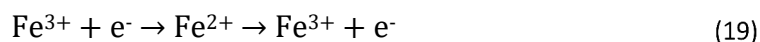
Komplex I obsahuje FMN (flavinmononukleotid) a dále Fe-S klastry, které se zúčastňují přenosu elektronů z NADH na CoQ. Fe-S klastry obsahují ionty železa, které mění své oxidační stavy dle rovnice:



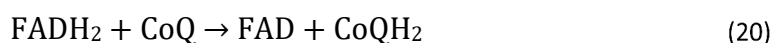
Komplexem I probíhá transport elektronů následovně: dva elektrony a proton z NADH přechází na FMN za vzniku FMNH<sup>-</sup> a NAD<sup>+</sup>. Elektrony z FMNH<sup>-</sup> přecházejí (po jednom) na CoQ, který je postupně redukován na radikál ubisemichinon CoQH<sup>•</sup> a následně na CoQH<sub>2</sub> (ubichinol). Při navázání elektronu na CoQ dochází současně k navázání protonu H<sup>+</sup> z mitochondriální matrix. Během přenosu elektronů z NADH na CoQ přes komplex I dochází k přenosu celkem čtyř H<sup>+</sup> z matrix do mezimembránového prostoru. Redukovaný CoQH<sub>2</sub> (ubichinol) je uvolněn z komplexu I a je nahrazen další molekulou oxidovaného CoQ (ubichinon) (Ganong 2005; Gnaiger 2014; Teplá 2017; Hall a Guyton 2005; Duška a Trnka 2007).



**Komplex II** (sukcinát-ubichinonoxidoreduktasa) přenáší elektrony ze sukcinátu na koenzym Q (CoQ, ubichinon), a tím jej redukuje na CoQH<sub>2</sub> (ubichinol). Sukcinát oxiduje na fumarát doprovázen vznikem redukovaného koenzymu FADH<sub>2</sub>. Reakce je součástí citrátového cyklu. Komplex II obsahuje cytochrom b (cyt b) a Fe-S klastry, které se účastní přenosu elektronů z FADH<sub>2</sub> na CoQ. Fe-S klastry i cyt b obsahují ionty železa, které mění své oxidační stavy:



Transport elektronů skrze komplex II: elektrony přecházejí z FADH<sub>2</sub> na koenzym Q. Oxidace FADH<sub>2</sub> je exergonickou reakcí (FADH<sub>2</sub> je redukční činidlo):

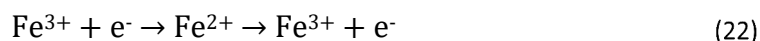


CoQ je redukován na radikál CoQH<sup>•</sup> (ubisemichinon) a následně na CoQH<sub>2</sub> (ubichinol). Redukovaný ubichinol (CoQH<sub>2</sub>) je z komplexu II uvolněn a nahrazen další molekulou oxidovaného ubichinonu (CoQ). (Ganong 2005; Gnaiger 2014; Teplá 2017; Hall a Guyton 2005; Duška a Trnka 2007)

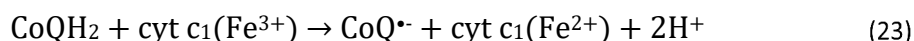
**Komplex III** (ubichinol-cytochrom-c-oxidoreduktasa) transportuje elektrony z redukovaného koenzymu Q (ubichinolu, CoQH<sub>2</sub>) na cyt c:



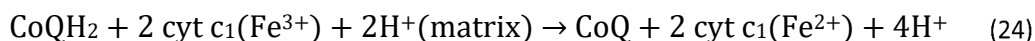
Komplex III obsahuje cytochrom b (cyt b), který váže dva hemy (b<sub>H</sub> a b<sub>L</sub>), cytochrom c<sub>1</sub> (cyt c<sub>1</sub>) a Rieskeho Fe-S protein (ISP). Cytochromy a Rieskeho Fe-S proteiny obsahují ionty železa, které mění své oxidační stavy podle rovnice:



Mechanismus, kterým komplex III přebírá elektrony od CoQH<sub>2</sub>, se nazývá Q-cyklus. V jeho průběhu dochází k pumpování H<sup>+</sup> z matrix do mezimembránového prostoru. Jedním z meziproductů Q-cyklu je stabilní CoQ<sup>•-</sup> semichinon. Komplex III obsahuje dvě vazebná místa: Q<sub>o</sub>, který váže CoQH<sub>2</sub>, a Q<sub>i</sub>, který váže CoQ<sup>•-</sup> a CoQ. CoQH<sub>2</sub> (produkt komplexu I či II) se váže do Q<sub>o</sub> místa. Jeden z elektronů je přenesen přes ISP na cyt c<sub>1</sub> (a dále na cyt c), čímž se uvolní dva protony do mezimembránového prostoru a vzniká CoQ<sup>•-</sup>. Druhý elektron přechází na hem b<sub>L</sub>, který následně redukuje na hem b<sub>H</sub>. Vzniklý CoQ je uvolněn z místa Q<sub>o</sub> a váže se do lokace Q<sub>i</sub>. Elektron z hemu b<sub>H</sub> přechází zpět na CoQ za opětovného vzniku CoQ<sup>•-</sup>:



Oba protony jsou přeneseny do mezimembránového prostoru. Do místa  $Q_o$  se váže další molekula  $CoQH_2$  a děj se opakuje. Další elektron z hemu  $b_H$  redukuje  $CoQ^{\bullet-}$  za současného navázání dvou protonů z matrix mitochondrie a vzniká  $CoQH_2$ . Na každé dva koenzymy  $CoQH_2$  vstupující do Q-cyklu se jeden  $CoQH_2$  regeneruje. Výsledkem je sumární reakce s přesunem 4 elektronů do mezimembránového prostoru:

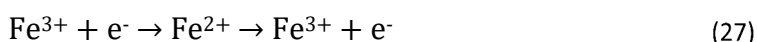
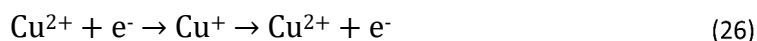


(Ganong 2005; Gnaiger 2014; Teplá 2017; Hall a Guyton 2005; Duška a Trnka 2007)

**Komplex IV** (cytochrom-c-oxidáza) katalyzuje oxidaci čtyř redukovaných molekul cytochromu c (cyt c) za současné redukce molekuly  $O_2$ . Výsledným produktem je voda:



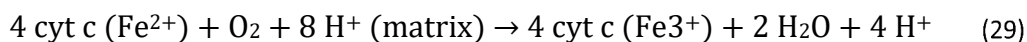
Komplex IV obsahuje  $Cu_A$  centrum, cytochrom a (cyt a), binukleární komplex cytochromu  $a_3$  (cyt  $a_3$ ) a  $Cu_B$  centra.  $Cu$  centra a cytochromy obsahují ionty mědi a železa, které mění své oxidační stavy:



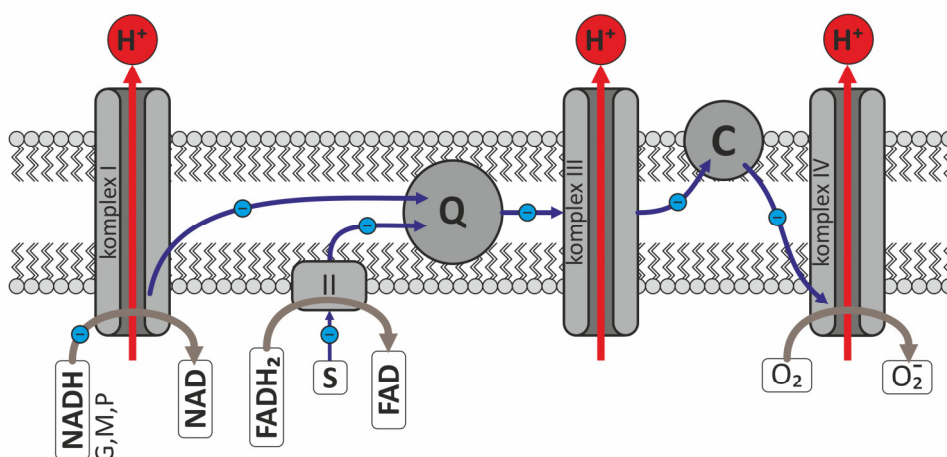
Elektrony jsou přes komplex IV transportovány následovně: molekula  $O_2$  se váže do binukleárního centra. Cyt c slouží jako pohyblivý přenašeč elektronů z komplexu III na komplex IV. Elektrony jsou přenášeny z cyt c přes  $Cu_A$  centrum, cyt a a binukleární komplex cyt  $a_3$  a  $Cu_B$  centra až na  $O_2$ . Molekula kyslíku je postupně redukována na  $O^{2-}$  ionty, které reagují s protony z matrix za vzniku dvou molekul vody:



Na úplnou redukci jedné molekuly kyslíku na dvě molekuly vody je zapotřebí čtyř elektronů a čtyř protonů. Během přenosu čtyř elektronů skrze komplex IV dochází k přenosu čtyř protonů z matrix do mezimembránového prostoru:



(Ganong 2005; Gnaiger 2014; Teplá 2017; Hall a Guyton 2005; Duška a Trnka 2007).



**Obrázek 4.** Schéma transportu elektronů dýchacím řetězcem: Elektrony jsou přenášeny mezi komplexem I a komplexem III v membráně rozpustným CoQ (prostřednictvím Q-cyklu), komplex II přenáší elektrony na CoQ ze sukcinátu a prostřednictvím Q-cyklu jsou následně elektrony přeneseny na komplex III a mezi komplexem III a IV periferním membránovým proteinem - cytochromem c.

### Syntéza ATP (oxidační fosforylace)

Transportem elektronů dýchacím řetězcem vzniká volná energie, která umožňuje komplexům I, III a IV transportovat protony z matrix do mezimembránového prostoru. Vytváří se zde elektrochemický protonový gradient (v mezimembránovém prostoru je koncentrace protonů vyšší než v matrix). Matrix je oblast negativního elektrického potenciálu a nízké koncentrace protonů. Oproti tomu je mezimembránový prostor oblast vysoké koncentrace protonů a pozitivního elektrického potenciálu. Výsledný elektrochemický potenciál tohoto gradientu je využit k syntéze ATP.

Syntéza ATP je endergonický proces, při kterém vzniká ATP (adenosintrifosfát) z ADP (adenosindifosfátu) a P (anorganického fosfátu). Reakce je katalyzována enzymem ATP-syntázou a je poháněna transportem protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix mitochondrie. Předpokládá se, že na vznik jedné molekuly ATP je zapotřebí zpětného přenosu tří až čtyř protonů (Duška a Trnka 2007; Ganong 2005; Voet a Voet 2011; Hall a Guyton 2005).

### 5.4 Reaktivní kyslíkové formy (ROS) v organismu

Reaktivní kyslíkové formy (ROS) jsou volné radikály vytvořené z molekuly kyslíku, které obsahují nepárový elektron. Tyto reaktivní formy jsou pro některé děje v organismu nezbytné, v případě zvýšení koncentrace kyslíku je však samotná jejich přítomnost a metabolická produkce podstatně vyšší. Tato situace vyvolává v buňkách oxidační stres,

který představuje nerovnováhu mezi kyslíkovými radikály a antioxidační obranou organismu a vede k poškození buněk.

Superoxid  $O_2^{\bullet-}$  vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku. Je schopný dismutovat, při vzájemné reakci vykazuje oxidační i redukční vlastnosti. Reakce probíhá spontánně a v organismu je urychlována enzymem superoxid dismutázou (SOD).

Zdrojů ROS je v organismu několik. Nejvýznamnější zdroj superoxidu pochází z dýchacího řetězce v mitochondriích, při kterém se tvoří primárně superoxid, sekundárně peroxid vodíku. Hlavním producentem ROS v respiračním řetězci jsou Komplex I a Komplex III. Dalším zdrojem je endoplasmatické retikulum, kde vzniká superoxid z oxokomplexu cytochromu P450. Superoxid vzniká v malém množství také v erytrocytech při oxidaci hemoglobinu na methemoglobin, zejména kvůli ochraně vlastních struktur proti radikálům (Hall a Guyton 2005; Ganong 2005; Duška a Trnka 2007; Voet a Voet 2011).

## 6. VYUŽITÍ KYSLÍKU V MEDICÍNĚ

Inhalace zvýšené koncentrace kyslíku je využívána pro léčebné účely. Metoda zvyšuje hladinu kyslíku v krvi pacienta, snižuje pracovní zátěž srdce a tím snížení hemodynamického odporu u mnoha typů plicních onemocnění. Kyslíková terapie se používá k léčbě emfyzému, pneumonie, poruch srdce (např. městnavé srdeční selhání) a jiných onemocnění snižujících schopnost těla vstřebávat a metabolizovat kyslík. Léčbu je možné provádět v nemocnicích, při domácí terapii nebo díky přenosným zařízením. Kyslík je pacientům dodáván kyslíkovou maskou či nosní kanylou (Sim et al. 2008; Hájek 2017; Barcal et al. 2000; Trojan 2003).

Při dýchání vzduchu je většina kyslíku vázána na hemoglobin a pouze malé množství je volně rozpuštěné v plazmě. Při hyperoxii je hemoglobin zcela saturován kyslíkem, množství rozpuštěného kyslíku v plazmě stoupá a takto fyzikálně rozpuštěný kyslík pokryje asi jednu třetinu potřeb tkání. V případě HBO s absolutním tlakem 300 kPa pokryje veškeré potřeby tkání pouze kyslík rozpuštěný v plazmě (Thomson a Paton 2014; Poff et al. 2017).

Hyperbarická medicína používá speciální kyslíkové komory, které zvyšují okolní tlak kolem pacienta a tím umožňují inhalaci zvýšeného parciálního tlaku kyslíku. Metodu lze použít např. při léčbě otravy oxidem uhelnatým, kdy je narušena schopnost hemoglobinu vázat kyslík. Zvýšená koncentrace kyslíku v plicích (5 - 15 x vyšší než ve vzduchu) pomáhá vyvazovat oxid uhelnatý z hemoglobinu (Buckley et al. 2011). Dále umožňuje léčbu plynové gangrény a dekompresní nemoci (Stephenson et al. 1996; Hájek 2017; Jain 2017). Kyslík je cytotoxický pro anaerobní bakterie, které způsobují plynovou gangrénu. Ventilací plynu se zvýšeným parciálním tlakem kyslíku a tím zvýšením koncentrace rozpuštěného kyslíku v krvi pomáhá tyto bakterie zabít (Eltorai et al. 1986).

Dekompresní nemoc se vyskytuje u potápěčů, kteří se po ponoru příliš rychle dekomprimují (vynoří). Následkem dojde k uvolnění rozpuštěných inertních plynů z krve (převážně dusíku a vzácněji helia), tvorbě bublinek v krvi a ke vzniku blokády (plynová embolie). Zvýšený okolní tlak pomáhá tyto bubliny znovu rozpustit zpět do krve. Tyto nadbytečné plyny jsou v průběhu expozice přirozeně vydýchány plicemi (Hájek 2017; Jain 2017). Potápěči, využívající uměle dodaný kyslík, dýchají většinou směs vzduchu nebo plynu s vhodným podílem kyslíku pro pracovní hloubku určenou jejich činností. Používání čistého nebo téměř čistého kyslíku je při potápění při vyšších tlacích obvykle omezeno na rebreathery. Rebreather je potápěčský přístroj s uzavřeným či polouzavřeným okruhem.

Vydechovaný plyn nebo jeho větší část se vrací zpět do přístroje, ve kterém jej pohlcovač zbaví oxidu uhličitého a následně je plyn obohacen o kyslík.

Kyslík byl v minulosti v kyslíkových barech užíván rekreačně pro údajné navození euforických pocitů. Profesionální sportovci používají kyslíkové masky pro zvýšení jejich výkonnosti. Farmakologický účinek je ale pochybný, pravděpodobnější je placebo efekt (Webb et al. 1989). Dostupné studie podporují zvýšení výkonu z kyslíku obohacené směsi pouze v případě, že je dýchán při aerobním cvičení (Rusko et al. 2003).

## **6.1 Toxicita kyslíku**

Toxicitu kyslíku způsobují především reaktivní formy kyslíku (ROS). V případě překročení antioxidační schopnosti organismu dochází k poškození tkáně indukci nekrózy či apoptózy. Toxicitou kyslíku jsou nejvíce ohroženi nedonošení novorozenci vyžadující oxygenoterapii, pacienti vyžadující hyperbarickou oxygenoterapii a potápěči. Hlubší potápění vyžaduje významné zředění kyslíku jinými plyny ( $N_2$ , He), aby se zabránilo projevům kyslíkové toxicity (Knight 1999; DeGorordo et al. 2003; Hájek 2017). Krátká HBO expozice vysokým parciálním tlakem kyslíku (400 kPa) vede k poškození funkce centrálního nervového systému (potápění, hyperbarická oxygenoterapie). Dlouhodobá expozice zvýšeným  $pO_2$  za normálního atmosférického tlaku poškozuje především plíce a oči (Thomson a Paton 2014; Poff et al. 2017; Knight 1999).

### **Mechanismus toxicity kyslíku při hyperoxii**

Hyperoxie vede ke zvýšení tvorby kyslíkových radikálů, které reagují s lipidy, DNA a proteiny oxidačními reakcemi a nepřímo reagují přes mechanismy zprostředkované radikály. To může způsobit oxidační poškození buňky, jejich nekrózu či apoptózu. Ač má organismus mnoho antioxidačních mechanismů, jejich kapacita je při vysokých koncentracích volného kyslíku překročena, čímž dochází k poškození tkání (Thomson a Paton 2014; Poff et al. 2017; Knight 1999).

### **Důsledky toxicity u oxygenoterapie a hyperoxie**

Kyslík způsobuje vazokonstrikci v systémové cirkulaci a vazodilataci plicních cév. Vysoká koncentrace kyslíku nepřímo zlepšuje zánětlivou odpověď zmírněním tkáňové hypoxie. Při oxygenoterapii akutní dekompenzace chronické obstrukční plicní nemoci může dojít k hyperkapnickému respiračnímu selhání ( $\rightarrow$  těžká respirační acidóza  $\rightarrow$  kóma). Obdobný stav hrozí u dětí s těžkými neuromuskulárními chorobami s chronickým respiračním selháním (Thomson a Paton 2014; Poff et al. 2017; Knight 1999).

## Klinické důsledky toxicity kyslíku

**Poškození plic** - Dýchací systém je vystaven nejvyšším koncentracím kyslíku z celého organismu a je prvním orgánem, kde se toxicita kyslíku projevuje. Toxicita kyslíku se neobjevuje při směsi s O<sub>2</sub> nižší než 50 %. Dlouhodobá expozice zvýšeným pO<sub>2</sub> o normálním atmosférickém tlaku plíce poškozuje, rychlost poškození je přímo úměrná pO<sub>2</sub> vdechovaného kyslíku. V případě ventilace 100 % kyslíku dochází v řádu hodin k tracheobronchiální iritaci a zánětu s projevy pleurální bolesti, kašle a snížení aktivity cilií. Následkem dochází ke snížení vitální kapacity plic a difuznímu poškození alveolů (akutní dechové tísní). Tyto efekty mohou způsobit chronickou plicní fibrózu, progresivní hypoxémii a snížení aktivity antioxidantních enzymů v plicích. Na poškození plic se současně podílí i umělá plicní ventilace a eventuálně primární onemocnění vyžadující oxygenoterapii. Toxicitu kyslíku dále zvyšuje adrenalin, estrogen, amfetaminy a hormony štítné žlázy (Thomson a Paton 2014; Poff et al. 2017; Knight 1999).

**Poškození CNS** - K poškození CNS dochází pouze při velmi vysokém parciálním tlaku kyslíku (potápění, hyperbarická komora). Rychlost progresu je přímo úměrná parciálnímu tlaku kyslíku (při 400 – 500 kPa dochází k projevu již po 10 minutách). Primárním projevem jsou poruchy vidění (tunelové vidění), tinnitus, nevolnost, záškuby mimických svalů, závrať, zmatenost. Druhým stupněm jsou tonicko-klonické křeče (odezní při snížení parciálního tlaku kyslíku) a porucha vědomí (Thomson a Paton 2014; Poff et al. 2017; Knight 1999).

**Poškození zraku** - Dlouhodobá expozice vyšší koncentraci kyslíku za normálního atmosférického tlaku se u nedonošených novorozenců podílí na rozvoji retinopatie z důvodu abnormálního prorůstání cév nezralou sítnicí. U potápěčů a pacientů léčených v hyperbarické komoře se může rozvinout hyperoxemická myopie, která je však reversibilní (Thomson a Paton 2014; Poff et al. 2017; Knight 1999).

**Poškození dalších orgánů** - Zvýšený parciální tlak kyslíku může vést k destrukci erytrocytů (Larkin et al. 1972), poškození myokardu, endokrinních žláz (nadledvin, gonád a štítné žlázy) a ledvin (Thomson a Paton 2014; Poff et al. 2017; Knight 1999).

## 6.2 Hyperbarická oxygenoterapie

Hyperbarická oxygenoterapie (HBO, hyperbaroxie) je léčebná metoda spočívající v inhalačním podávání kyslíku za podmínek zvýšeného atmosférického tlaku. Při těchto podmínkách dochází k rozpuštění většího množství kyslíku v plazmě a vede ke zvýšené dodávce kyslíku tkáním, což může být prospěšné u řady chorob. Kromě toho má

hyperbarický kyslík řadu dalších specifických efektů (zmenšení velikosti bublin plynu, snížení otoku ve tkáních, modulace imunitních funkcí v boji proti infekci, snížení průběhu ischemicko-reperfučního syndromu, stimulace neovaskularizace, fibroblastové proliferace a podobně (Hájek 2017; Jain 2017).

U některých patologických stavů se jeví jako vhodný způsob léčby a významnou měrou ovlivňuje léčebný výsledek, mortalitu a kvalitu života. U dalších stavů má spíše pomocnou roli v doplnění konzervativního nebo chirurgického léčebného postupu na zmírnění průběhu onemocnění a redukci následných komplikací. Indikační spektrum schválené k léčbě HBO je součástí vyhlášky č. 472/2009 Sb. a zahrnuje 26 onemocnění a klinických stavů (Hájek 2017).

### **Fyzikální principy HBO - Přímé účinky přetlaku**

Zvýšená hodnota tlaku zvyšuje rozpustnost kyslíku v kapalině, zmenšuje bubliny a snižuje difúzní vzdálenosti. HBO expozice snižuje působícím přetlakem objemy veškerých tělních plynů, čímž se například snižuje tlak plynů při střevní neprůchodnosti, nadýmání a intraluminální akumulaci plynů, perioperační gastrointestinální obstrukci a plynové gangréně. Snížení tlaku plynu naakumulovaného v tkáních a dutinách má za následek menší zranění cévního řečiště a snížení bakteriální translokace, nekrózy, bolestí a otoků. Vysoký gradient kyslíku umožňuje zpětné rozpuštění dusíkových bublin a jeho odstranění prostřednictvím dýchání. (Tibbles a Edelsberg 1996; Gill a Bell 2004; Ambiru et al. 2007; Jain 2017; Al-Waili a Butler 2006; Nylander et al. 1984; Hopf et al. 2008; Hájek 2017).

### **Fyzikální principy HBO – Účinky HBO na distribuci kyslíku krevní plazmou**

Henryho zákon uvádí, že množství kyslíku je přímo úměrné jeho  $pO_2$ . Konstanta rozpustnosti kyslíku v plazmě při 37 °C má hodnotu přibližně 0,143 ml/l·Pa (Leach et al. 1998; Place et al. 2017). Při normálním atmosférickém tlaku 101 kPa (760 mmHg) a hodnotě vzdušného  $pO_2$  21 kPa (158 mmHg) je hodnota arteriálního  $pO_2$  12,6 kPa (95 mmHg) a průměrná hodnota  $pO_2$  v tkáních 5,32 kPa (40 mmHg). Při těchto podmínkách je v plazmě rozpuštěno přibližně 3 ml kyslíku na litr krve. V případě zvýšení okolního tlaku na hodnotu 3 ATA a při frakci kyslíku 21 % dochází k rozpuštění až 9 ml kyslíku v litru krve.

Při normobarické oxygenoterapii (NBO), probíhající při normálním atmosférickém tlaku, se vdechovaná koncentrace kyslíku blíží k 100 %. Za těchto podmínek se rozpustí až 14,3 ml/l. Při HBO expozici je pracovní tlak v hyperbarické komoře je 2,5 - 3 násobně vyšší než atmosférický tlak. Pokud je při těchto podmínkách dýchán 100% kyslík, je jeho



koncentrace až 15 x vyšší než při dýchání vzduchu za normálních podmínek. Dochází nejen k plnému nasycení hemoglobinu kyslíkem, ale i vysokému fyzikálnímu rozpuštění v krevní plazmě (až 45 m/l).

Efektivní dosah difuze kyslíku se ve tkáni prodlužuje až 4 násobně, vysoký kyslíkový gradient umožňuje difuzi kyslíku do oblastí s nízkým obsahem kyslíku, což okamžitě pomáhá ischemickým a kompromitovaným tkáním s malým či žádným krevním zásobením.

Některé infekce, poranění a onemocnění zvyšují požadavky na dodávku kyslíku tkáním. Anémie, toxiny a krvácení mohou snížit schopnost přenášet kyslík hemoglobinem, edém nebo blokování cév zvyšují vzdálenost transportu kyslíku do tkání.

V literatuře (Boerema et al. 1960; Bitterman 2009) je uvedeno, že je možné při dýchání čistého kyslíku při tlaku 250 kPa zabezpečit fyziologickou spotřebu kyslíku v tkáních bez hemoglobinu. Hyperbarický kyslík způsobuje vazokonstrikci indukci kontrakce hladkých svalů ve svalovině cév, nikoliv však v krevních kapilárách nebo lymfatické mikrocirkulaci. Snižuje se tím krvácení a lymfatické kanály mohou pokračovat v čištění a odstraňování otoků. V důsledku poškození tkání dochází ke zvýšení  $p\text{CO}_2$ , což vede k vasodilataci cév (Mathieu et al. 2006). Zvýšené  $p\text{O}_2$  v plazmě zabezpečuje okysličení tkáně a zlepšení mikrovaskulárního krevního oběhu (Gill a Bell 2004).

### **Fyzikální principy HBO – Léčebný přínos vysoké hladiny kyslíku**

Vysoká hladina kyslíku inhibuje syntázu prozánětlivých cytokinů (Benson et al. 2003). Bylo prokázáno, že  $\text{O}_2$  má přímé bakteriostatické a baktericidní účinky proti grampozitivním, gramnegativním, aerobním a anaerobním mikroorganismům (Gill a Bell 2004). Vysoká hladina kyslíku v tkáních má synergický antibiotický účinek, napomáhá účinnosti a působení aminoglykosidů, sulfonamidů a cefalosporinů. HBO kyslík inhibuje růst plísní, snižuje poškození volnými radikály, inhibuje toxiny, a zmenšuje reperfuční poškození (Al-Waili a Butler 2006; Jain 2017).

### **Indikace k léčbě HBO**

HBO indikace je z patogenetického hlediska užitečná k substituci kyslíku v hypoxických tkáních včetně jejího fyzikálního efektu. Významný je i možný imunosupresivní efekt a je také možná kombinace všech účinků navzájem.

**Substituce kyslíku – Hypoxémie a hypoxie – generalizovaná:** otrava oxidem uhelnatým a kyanidy, methemoglobinémie, šok hemorragický a kardiogenní, asfyxie novorozenců.

**Substituce kyslíku – Hypoxémie a hypoxie – regionální:** diabetická mikroangiopatie, ischemie CNS celková a místní (cévní mozkové příhody), ischemická choroba dolních končetin, percepční vady sluchu, polytraumata, uchovávání orgánů k transplantaci.

**Baktericidní účinek:** anaerobní, především klostridiální infekce a vaskulární respektive kombinovaný šok, akutní pulpitis.

**Interakce kyslíku s činiteli fyzikálními (s ozářením):** maligní tumory orofaciální a gynekologické.

**Interakce kyslíku s činiteli chemickými (s léky):** hemoblastózy (s cytostatiky), modifikace účinků léků všeobecně.

**Fyzikální efekt – likvidace vzduchových bublin** (v kombinaci s účinkem hypoxémie a hypoxie): dekompresní nemoc, vzduchová embolie, pneumatis cystoides intestinalis, plicní otok.

**Imunosupresivní efekt:** polymyositis, sklerodermie, sclerosis multiplex.

**Kombinace účinků – hojení ran a ranných ploch:** popáleniny a omrzliny, bércový vřed žilního a smíšeného původu, pyoderma gangrenosum, přihojování transplantátů, peptický vřed žaludku a dvanáctníku, proctocolitis, Crohnova nemoc, osteomyelitis.

Z hlediska naléhavosti je indikace dělena na 3 stupně naléhavosti.

**První stupeň** zahrnuje stavy, kde je transport k léčbě na hyperbarické jednotce intenzivní péče (HJIP) absolutně indikován, HBO zde ovlivňuje prognózu přežití. K indikacím se řadí: dekompresní nemoc, vzduchová embolie, otrava oxidem uhelnatým a kouřovými plyny, anoxie mozku a postanoxická encefalopatie, anaerobní a těžké smíšené nekrotizující infekce měkkých tkání, včetně diabetické gangrény (diabetická noha), crush syndrom a kompartment syndrom, popáleniny, osteoradionekróza, hemoragický šok (v případech, kdy nemocný nemůže nebo nechce být léčen klasickým způsobem) (Hájek 2017; Jain 2017).

**Druhý stupeň** - situace, u níž je transport k léčbě na hyperbarické JIP doporučen, protože HBO je důležitou součástí léčby dané choroby. HBO ovlivňuje prognózu přežití a je důležitou metodou v prevenci vážných komplikací. K druhému stupni se řadí následující indikace: cystoidní pneumatóza střeva, otrava kyanidy, kardiogenní šok, komplikující akutní infarkt myokardu, polytraumata, náhle vzniklé percepční poruchy sluchu, replantace traumaticky amputovaných končetin (Hájek 2017; Jain 2017).

**Třetí stupeň** indikační naléhavosti: HBO je součástí komplexní terapie a významně zlepšuje klinické výsledky. Indikace HBO třetího stupně, týkající se většinou chorob chronického rázu, jsou: methemoglobinémie, přihojování kožních štěpů a laloků, ischemická

choroba dolních končetin s tvorbou trofických defektů, bérkový vřed žilního a smíšeného původu, dekubitální nekrózy, zánětlivé změny v „objemově limitovaných tkáních“ (Hájek 2017; Jain 2017).

### **Kontraindikace léčby HBO**

Kontraindikace je obecně definována jako stav, který znemožňuje bezpečné provedení léčby, eventuálně by jejím provedením za jistých okolností mohlo dojít ke zhoršení zdravotního stavu pacienta až s následkem smrti. Stejně jako každý jiný typ léčby má HBO také kontraindikace, které jsou rozděleny na absolutní a relativní.

**Absolutní kontraindikace:** neléčený pneumotorax, léčba cytostatiky, během odvykání alkoholiků.

**Relativní kontraindikace:** akutní virové infekce, řízená umělá plicní ventilace, neléčené nádorové maligní onemocnění, těhotenství, akutní astma bronchiale, stav po hrudní operaci, epilepsie.

### **6.3 Hyperbarické komory**

V současné době existují pro použití hyperbarické terapie 3 typy komor. V humánní medicíně jsou obvyklé vysokotlaké jednomístné a vícemístné komory. Komory jsou navrženy pro plnění stlačeným vzduchem. Vnitřní rozměry se dělí na malé (1 - 2 m<sup>3</sup>), střední (4 – 8 m<sup>3</sup>) a velké s objemem několik desítek metrů krychlových. Vícemístné komory umožňují umístění více pacientů naráz a mohou být přizpůsobené pro kriticky nemocné pacienty, které obvykle doprovází zdravotnický personál během expozice pro případ komplikací. Ve vícemístných komorách plněných vzduchem inhalují pacienti kyslík těsnící maskou z dýchacího přístroje, který se nazývá dýchací automatika (nádechová dýchací jednotka). Svým nádechovým úsilím pacienti otevírají inspirační ventil a tím přívod kyslíku. Její součástí je zpravidla i výdechová jednotka se zařízením pro výdech mimo prostředí komory (overboard dumping). Kyslík je možné podávat konstantním průtokovým systémem (flow systém) z tzv. „kyslíkové helmy“ (Oxygen Hood), která je nasazena na hlavu a utěsněna manžetou kolem krku. Velmi malým dětem lze kyslík podat dětským anesteziologickým systémem. Pacienti v bezvědomí jsou ventilováni plicním ventilátorem přes orotracheální či tracheostomickou kanylu (Jain 2017; Hájek 2017; Barcal et al. 2000).

Jednomístné komory jsou převážně určeny pro přímé plnění kyslíkem, pacienti tedy nemusí požívat masky. Malé komory jsou stále častěji používány v menších zařízeních, umožňující individualizaci léčby, lze je nalézt v centrech pro léčbu chronických ran. Většina

komor je určena k provozu při isokompresi za vysokého tlaku, obvykle v rozmezí od 200 do 250 kPa. Díky pokroku v materiálovém inženýrství existují i mobilní nízkotlaké skládací jednoplášťové komory, které pracují v rozsahu 120 až 130 kPa. Tyto komory jsou v současné době nejčastěji určeny pro použití v domácí terapii a jejich použití vzrůstá i v plastické chirurgii jako doplňující léčba k pooperačnímu zotavení. Skládací komory jsou zajímavé díky přenosnosti, nižším pořizovacím a provozním nákladům a vyšší dostupnosti. Vzhledem k principům HBO terapie i u těchto komor dochází ke zlepšení dodávky kyslíku v tkáních, i když ne ve stejném rozsahu jako u komor vysokotlakých. Protože se jedná o relativně novou technologii, nebyly doposud systematicky prozkoumány rozdíly v terapeutických přínosech (Smolle-Jüttner 1999; Jain 2017; Hájek 2017; Barcal et al. 2000; Edwards 2010; Bitterman a Bonen 2016).

### **Konstrukce HBO**

Hyperbarické komory pro terapeutické účely jsou konstruovány obdobně. Základem je tlaková nádoba vybavena výhledy (okny), které umožňují technikům a zdravotnickému personálu mimo komoru monitorovat pacienta uvnitř komory. Tlaková nádoba má jeden nebo více vstupů různých tvarů vycházejících z návrhů a výpočtů. Tyto vstupy jsou malé a kruhové u malých komor, u vícemístných nádob má vstup obvykle charakter portálu pro umístění pacientu na lůžku. Moderní komory jsou vybaveny přetlakovým vstupem, tj. samostatnou komorou se dvěma poklopy, jedním směrem do vnějšího prostoru a jedním k hlavní komoře. Tento přechodový prostor je možné nezávisle tlakovat a umožnit tak pacientům vstupovat nebo opouštět hlavní komoru, která může zůstat stále pod tlakem. Díky tomu nedochází k přerušení probíhající expozice. Běžně je komora vybavena servisním vzduchovým uzávěrem pro transport léků, nástrojů a potravin. V komorách je instalován sofistikovaný hardware (monitoring vnitřního klimatu, složení plynů, měření vlhkosti či interkomunikační systém umožňující obousměrnou komunikaci). Použité technologie jsou od klasických odlišné, protože musí pracovat za vyššího pracovního tlaku. Provoz komory, řízení expozice a monitoring prostředí je prováděn z ovládacího panelu (dispečink) umístěného mimo komoru. Operátor zde řídí průběh expozice regulací ventilů, které řídí tok vzduchu do a z komory, reguluje tok kyslíku do masek a jiné úkony. Vnitřní vybavení komor zahrnuje klimatizaci a protipožární systém. Komory pracovišť zaměřujících se na urgentní případy (např. otrava oxidem uhelnatým) jsou vybaveny speciálními patientskými monitory, dávkovači a ventilátory. Tyto technologie jsou na rozdíl od běžných konstruovány a přizpůsobeny činnosti ve zvýšeném tlaku, například nelze používat běžná

membránová tlačítka, protože by při zvýšení okolního tlaku došlo k jejich samovolnému sepnutí. K hyperbarické komoře také patří složité pneumatické (kompresorové) technologie, které zajišťují dodávky tlakového vzduchu (Jain 2017; Hájek 2017; Barcal et al. 2000).

Provoz hyperbarických komor podléhá přísným bezpečnostním opatřením. Pro provoz vícemístných komor platí společná evropská technická norma EN ČSN 14931 (od 1. 7. 2006), dále EN 12021 a EN 16081.

## 6.4 Základní výzkum HBO

Stav základního výzkumu, zabývajícího se hlubšímu porozumění vlivu zvýšeného parciálního tlaku kyslíku na nižších úrovních (orgánové, tkáňové a buněčné), je v současné době považován samotnými HBO odborníky za nedostatečný. Předně se jedná o témata výzkumu zaměřujícího se na studium základní molekulární a chemické biologie kyslíku a fyziologie transportu kyslíku při HBO podmínkách, sledování úrovně volných radikálů při normálních a hypoxických podmínkách ve vztahu k HBO efektu. Za důležité je považováno prostudování efektu zvýšeného parciálního tlaku kyslíku z HBO na mitochondriální respiraci (Jain 2017; Gail 1991).

### Buněčný výzkum

Množství publikací a současný stav výzkumu vlivu HBO na *in vitro* a *ex vivo* buněčné systémy je v porovnání se studiem hypoxie významně nedostatečný. Lze nalézt ojedinělé studie zabývající se vlivem HBO na biologické, fyziologické a farmakologické mechanismy. Několik prací je zaměřeno na hodnocení vlivu HBO na účinnost fotodynamické terapie. Fotochemická reakce fotodynamické terapie (PDT) závisí na přítomnosti molekulárního kyslíku. Z důvodu anoxie v oblastech nádorové tkáně je účinnost PDT omezená. Předpokládá se, že využitím HBO a tím i zvýšení koncentrace kyslíku v hypoxické tkáni povede ke zvýšení účinnosti PDT. Výsledky studií potvrzují předpoklady zvýšené účinnosti PDT při použití HBO expozice, a to jak na buněčných kulturách, tak u pacientů (Maier et al. 2000b, 2000a; Bajgar et al. 2014).

V oblasti výzkumu vlivu HBO na kmenové buňky je opět velmi málo publikací. Jedna z nich naznačuje, že expozice hyperbarickému kyslíku (HBOT) může také mobilizovat kmenové a progenitorové buňky z kostní dřeně mechanismem stimulace NO syntázy (Thom et al. 2006). Navazující studie porovnává vliv různých parciálních tlaků kyslíku HBO expozice a dochází k závěru, že při léčbě 250 kPa je mobilizace progenitorových buněk vyšší oproti přetlaku 200 kPa a všechny nově mobilizované buňky vykazují vyšší koncentrace specifických

regulačních proteinů (Heyboer et al. 2014). Jiná studie se zabývá vztahem hyperbarického kyslíku a stimulace růstu a diferenciaci vaskulogenních kmenových buněk *in vitro* a její závěry tento vztah potvrzují (Milovanova et al. 2009).

Studie vlivu HBO na *ex vivo* modely používající různé typy buněk dokumentují, že je účinek expozice na stimulaci růstu fibroblastů detekovatelný již po jediné expozici HBO (Kang et al. 2004). Zároveň autoři reportují užitečnost ekvivalentu lidské pokožky jako model pro hodnocení parametrů při hojení ran (Dimitrijevič et al. 1999; Roberts a Harding 1994). Studie, zabývající se účinky hyperbarického kyslíku (HBO) na proliferaci lidských chondrocytů a vzory genové exprese v závěru shrnuje poznatek, že růst *in vitro* chondrocytů je inhibován působením HBO a dochází k upregulaci markerů apoptózy PARP, kaspázy 3, proteinů specifických pro chrupavku kolagen II a COMP. Tento negativní efekt se zvyšuje se rostoucím  $pO_2$  (Melcher et al. 2018). Za zmínku stojí i studie zabývající se vlivem hyperbarického kyslíku na proliferaci a diferenciaci osteoblastů *in vitro*. Autoři v závěru hodnotí, že HBO zvýšila biomineralizaci, dále došlo ke zvýšení tvorby kostních uzlin, nasycení vápníku a zvýšení aktivity alkalické fosfatázy a nebyl zjištěn žádný cytotoxický účinek s použitím testu aktivity laktát dehydrogenázy (Wu et al. 2008).

Další studie se zaměřuje na hodnocení vlivu HBO úrovně kyslíku na oxidační stres plicní tkáně. Její výsledky naznačují, že HBO expozice může aktivovat nekroptózu tkáně a může být příčinou HALI (Hyperoxic Acute Lung Injury) (Han et al. 2018). Zajímavé výsledky přináší studie zaměřená na účinky hyperbarického kyslíku na imunitní funkce. Studie dospívá k závěru, že HBO má dvojitý účinek na funkci lymfocytů, protože vhodná expozice podporuje a nadměrná expozice inhibuje jejich funkci (Liu et al. 2009).

Publikací zaměřených na studium biochemických buněčných procesů ovlivňovaných HBO expozicí je opět málo. Za zmínku stojí výsledky studia zaměřeného na vztah vlivu různých úrovní rozpuštěného  $pO_2$  v médiu, koncentrace glukózy kultivačního média a buněčného růstu. Výsledky studie ukazují, že přímá expozice kožních fibroblastů hyperbarickému kyslíku ovlivňuje růst buněk a superponuje toxický účinek vysoké koncentrace glukózy. Tato cytotoxicita může souviset se zvýšenou produkcí ROS ve fibroblastech (Lin et al. 2008). Zajímavý pohled na HBO expozici shrnuje review zaměřené na vztah HBO kyslíku, jeho protektivních vlastností a buněčného poškození. Autoři v závěru studie hodnotí kyslík jako silný stimulant produkce RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species), který indukuje adaptivní odpovědi jako je zvýšená antioxidační kapacita, změna imunitní funkce a modulace signálních transdukčních cest. Dochází také k závěru, že mitochondrie spočívají uprostřed

studovaných mechanismů, a proto představují slibný potenciální cíl pro prevenci poškození vyvolaného hyperoxií a optimalizaci terapeutické účinnosti HBO (Poff et al. 2017).

Lze nalézt několik zajímavých prací zaměřených na vztah HBO a mitochondriální respiraci. Jedna z nich cílí na analýzu mechanismu indukce apoptózy hyperbarickým kyslíkem. V závěru autoři hodnotí, že jediná HBO expozice indukuje apoptózu lymfocytů pomocí mitochondriálního, a nikoli FAS-souvisejícího mechanismu. Sledovaný transmembránový protein FAS (navázáním ligandů spouští apoptózu) a protein Bcl-2 (reguluje propustnost vnější mitochondriální membrány) regulační mechanismus může být považován za ochranné opatření buňky v reakci na hyperbarický kyslík (Weber et al. 2009). Další práce uvádí, že glutamin chrání mitochondriální strukturu a její funkci proti kyslíkové toxicitě (Ahmad et al. 2001). Autoři review, zaměřené na hodnocení vztahu vlivu kyslíku na buněčné poškození a indukci protekce zvýšením produkce antioxidační kapacity v závěru hodnotí, že zvýšení protekce mitochondrií by mohlo být vhodnou metodou při prevenci toxicity kyslíku a tím i zvýšení terapeutické účinnosti HBO (Poff et al. 2017).

Nedostatek systematického výzkumu lze přičítat nedostupnosti vhodných nástrojů pro ovlivňování buněčných systémů. Existuje několik dostupných hyperbarických komor určených ke studiu vlivu HBO (HAUX, DE; Reimers Systems Inc., USA). Většinou se však jedná o zařízení o objemu desítek až stovek litrů, určený pro výzkum se zvířecími modely. Maloobjemových biofyzikálních reaktorů, které by umožnily provádět kultivaci ve vhodných podmínkách (předně teplota 37 °C), je na trhu dostupných jen málo. Hlavním negativem dostupnosti těchto technologií je jejich extrémní cena pohybující se ve stovkách tisíc korun. Zároveň je nutné mít v kultivačních laboratořích zázemí pro technické plyny a takovéto zařízení musí podle zákonů většiny vyspělých zemí obsluhovat odborně vzdělaná a proškolená obsluha.

## 7. MIKROHYPERBARICKÁ KOMŮRKA UHBK

V řadě technických, lékařských či jiných oborů se používají přetlakové nebo podtlakové komory, které jsou většinou konstruovány pro specifické účely, například pro sterilizaci nástrojů, léčebné zdravotnické účely, pro výcvik letců či kosmonautů nebo pro trénink potápěčů a sportovců. Na trhu je pouze několik výrobců hyperbarických komor, jedná se o Sechrist Hyperbaric (USA), Haux (DE), Dräger (DE), HyTech (NE), Hyox (UK), DRASS GALEAZZI (I). Inovace technologie hyperbarických komor bývají v časopisech publikovány jen výjimečně. V této oblasti jsou novinky chráněny před konkurencí a jejich publikování bez patřičné patentové ochrany by znamenalo ohrožení komerčních aktivit těchto společností. Proto je pro zmapování současného stavu techniky a trendů nutné provést rešerši v oblasti patentové ochrany duševního vlastnictví.

Existují řešení dekompresní komory pro potápěče dle spisu DE 3732167 nebo komory pro trénink sportovců a potápěčů popsané ve spise CZ 3077 U1. Známým řešením je například komora popsaná ve spise CA 2845398, která je sice relativně malá, přenosná několika osobami, ale určená pouze pro terapeutické účely. Modifikované léčebné tlakové zařízení pro novorozence je popsáno ve spise CN 2382403 Y, v němž je však řešena pouze optimální konstrukce vstupních dveří. Společnou nevýhodou těchto známých řešení je jejich konstrukce pro specifický účel s řadou technických a technologických aplikací, která znemožňuje jejich univerzální použití i na jiných experimentálních nebo testovacích pracovištích. Kromě velkých rozměrů jsou jejich další nevýhodou vysoké pořizovací náklady a náročnost na technické zázemí a zaškolení obsluhy. Jsou rovněž známy přetlakové či podtlakové komory použitelné pro různé testovací a analytické metody, a to i v oblasti medicíny a biologie, mezi něž patří např. řešení dle spisu US 6247472, který popisuje metodu využití tepla vzniklého v prostorách hyperbarické komory k termodynamické práci, která je využívána k dalšímu zvyšování tlaku v komoře. Další známá řešení se většinou věnují konstrukci jednotlivých funkčních uzlů, např. spis CN 200953821 Y popisuje metodu ohřevu vnitřních prostor tlakové nádoby pomocí topné spirály. Spis JPH 04184138 pak popisuje tlakové zařízení s malým vnitřním prostorem pro experimenty za vysokých tlaků a teplot. Jeho konstrukce však neumožňuje vkládat větší objekty a neumožňuje řízení vnitřního klimatu komory. Ve spise CZ 20118 U1 je popsáno řešení hypobarické a hyperbarické komory ve formě oboustranně hermeticky uzavíratelného nekovového válce. Válec je napojen na vývěvu a její kompresor je propojen s ovládací jednotkou. Tato komora je určena



pro experimenty s malými savci vyšetřovanými pomocí magnetické rezonance. Jedná se obecně o terapeutickou tlakovou nádobu, u níž není kvůli použitému materiálu možné dosáhnout vysokých tlaků, velkého rozsahu teplot a nemá možnost regulace teploty uvnitř komory. Navíc není díky použitému nekovovému materiálu chemicky a mechanicky odolná, takže při experimentech nelze použít různých agresivních směsí plynů a různých druhů osvitů vnitřního prostoru.

Je známo komerční řešení německé společnosti HAUX Life-Support GmbH s produktovým označením HAUX-TESTCOM 350/10, které je možné díky malým vnitřním rozměrům využít pro buněčný výzkum. Toto řešení má několik podstatných nevýhod. První je absence temperace vnitřních prostor a druhou je velmi vysoká pořizovací cena (zhruba 16.000 €), což z něj činí pro většinu laboratoří nedostupné přístrojové vybavení.

Po průzkumu trhu nebylo nalezeno žádné vhodné laboratorní vybavení, které by umožňovalo provádět kontinuální expozice buněčného materiálu ve vhodném prostředí (tj. možnost udržování teploty a vlhkosti obdobné jako v kultivačním inkubátoru). Bylo tedy nezbytné přijít s vlastním inovativním řešením, které by umožnilo realizovat kultivace a ovlivňování zvolené buněčné linie k hodnocení vlivu intermitentní hyperbarické hyperoxie (HBO).

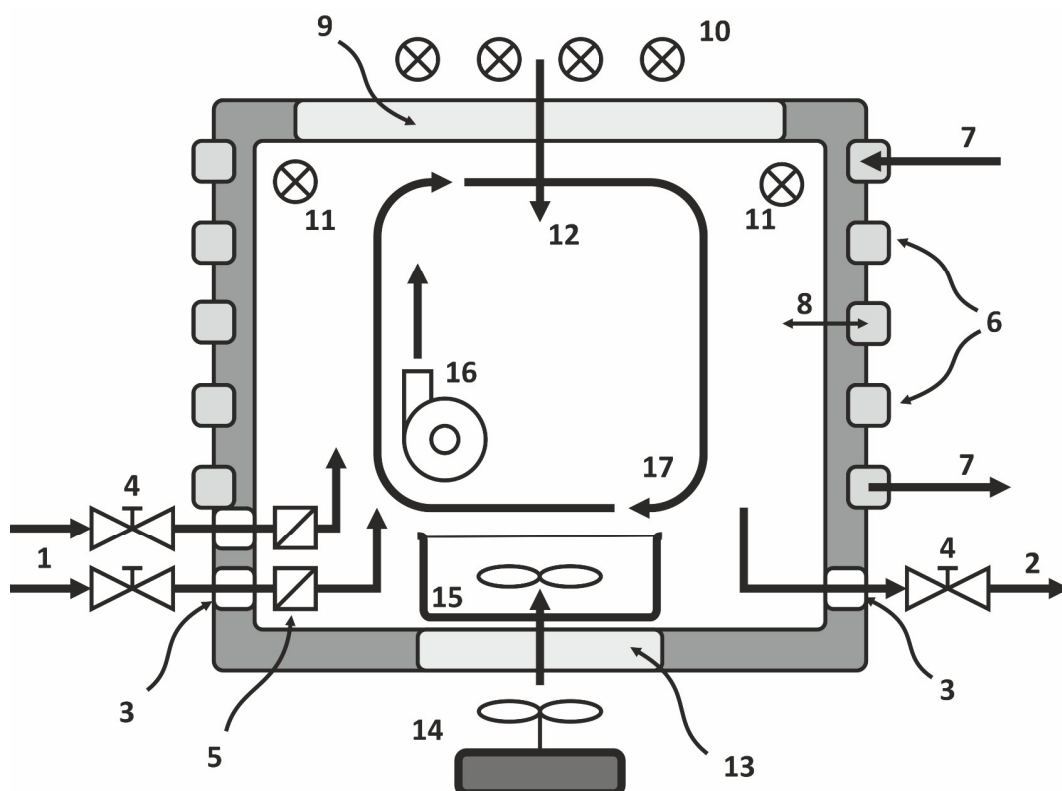
## 7.1 Technologie uHBK

Nová technologie mikrohyperbarických komůrek uHBK by měla být primárně použitelná pro výzkum hyperbarické oxygenoterapie (výzkum na tkáňových kulturách a laboratorních zvířatech). Její využití by mohlo být i v jiných oblastech, například ve výzkumu aplikace látek v dýchané směsi (inhalační anestetika), v oblasti dusíkové narkózy u potápěčů, výzkumu vhodných látek pro tzv. kapalinovou ventilaci, transplantologii (vliv vysokého tlaku na vitalitu transplantovaných orgánů), při prevenci a výzkumu možnosti ovlivnění dusíkové narkózy, při vývoji a testování průtokoměrů pro umělou plicní ventilaci v hyperbarické komoře a testování dekompresních počítačů. Měla by být cenově dostupná (nízké pořizovací i provozní náklady), bezpečná, spolehlivá a určená pro činnost v laboratorním prostředí (snadná obsluha a bezpečnost provozu).

Celková velikost a hmotnost by neměla překračovat rámec běžných laboratorních přístrojů. Objem vnitřních prostor by neměl překračovat 10 litrů. Měla by obsahovat minimálně dva regulovatelné tlakové vstupy pro mísení plynů vnitřní atmosféry a jeden regulovatelný výstup. Měla by umožňovat ovlivňování vnitřní atmosféry, proplachování

a regulovatelnost změny vnitřního tlaku. Systém uzavírání samotné tlakové nádoby, kdy je pro řadu experimentů potřebný rychlý přístup do vnitřních prostor, by měl být vybrán z existujících technických řešení (např. kličkový způsob uzavírání používaný u autoklávů), přičemž za nejefektivnější je považován bajonetový systém uzavírání. Dalším požadavkem je implementace průzorů v těle komory, které by při dodržení konstrukčních zásad pro bezpečné zařízení, umožnily ovlivňovat a pozorovat probíhající experimenty zvenčí (např. pro využití různých typů osvětlení). Komůrka by měla mít možnost bezkontaktního magnetického míchání vzorku uvnitř přetlakové nádoby. Významným požadavkem je možnost temperace vnitřních prostor, kdy na rozdíl od běžných řešení HBO technologií není temperační výměník umístěn uvnitř. Temperace by měla být efektivně integrována do těla přístroje tak, aby ve spojení s vhodným konstrukčním materiálem těla, inovativní konstrukcí a izolací od vnějšího prostředí byla temperace efektivní a umožňovala rychlou regulaci vnitřní teploty. Součástí konstrukce by pak měly být další nezbytné prvky, například regulace vnitřního osvětlení, možnost vnitřní cirkulace atmosféry, dostatek datových konektorů pro připojení různých čidel a samozřejmě elektronický monitoring vybraných fyzikálních a provozních parametrů. Definováním klíčových parametrů a požadavků konceptu nové technologie bylo možné sestavit specifikaci nového systému hyperbarické komůrky. Obrázek 5 specifikaci mikrohyperbarické komůrky schematicky znázorňuje.

Jednotlivá čísla vyjadřují podstatné vlastnosti navrženého konceptu. Komůrka obsahuje vstupní a výstupní porty plynů (1,2), které jsou přiváděny otvory v plášti (3). Průtok těchto plynů je regulován ventily (4). Vstupní plyny jsou temperovány při vstupu do vnitřních prostor výměníkem (5) na teplotu vnitřního prostředí. Vnitřní prostředí je temperováno výměníkem (6) integrovaným v plášti komůrky. Teplota temperační kapaliny (7) je regulována čidly uvnitř komůrky (8). Komůrka má ve víku (9) a dně (13) části z průsvitného nemagnetického materiálu. Osvětlení vnitřních prostor lze realizovat buďto vnitřním osvětlením (11) nebo z vnějšího zdroje (10) a osvětlovat tak specificky vnitřní prostory (12). Díky spodnímu průzoru lze magnetickým manipulátorem (14) ovlivňovat vnitřní prostory (15). Komůrka má vnitřní systém (16) cirkulace atmosféry (17) pro rovnoměrné mísení vstupních plynů a efektivní vyrovnání teplotních gradientů. Dále obsahuje běžné komponenty, jako jsou teplotní a tlaková čidla a průchodky pro přenos biosignálů elektrickou formou.



**Obrázek 5.** Schematické zobrazení konceptu technologie uHBK.

Po diskuzi použitelnosti a hodnocení požadavků na novou technologii bylo rozhodnuto o tom, že budou zkonstruovány dva různé koncepty mikrohyperbarických komůrek, které se od sebe liší tvarem vnitřních prostor, použitým konstrukčním materiálem, vnitřním objemem a hmotností. Ostatní parametry jsou pro obě varianty společné.

### Financování vývoje uHBK

Vývoj nové technologie je vždy časově a finančně náročný. Pro financování byl vhodným kandidátem grantový projekt PreSeed, díky kterému se podařilo získat dostatečné množství prostředků pro realizaci vývoje. Grantový projekt je k nalezení pod označením CZ.1.05/3.1.00/14.0307 - Nové technologie UP v biomedicíně – Individuální aktivita IA03.

Deklarovaným výstupem IA03 bylo navrhnout dva odlišné prototypy hyperbarických komůrek, vytvořit digitální modely pomocí vhodného CAD/CAM software a provést 3D simulace mechanických vlastností. Digitální modely nechat následně dle specifikací vyrobit (předpoklad zakázkové výroby) a sestavit do funkčních vzorků, ověřit jejich funkčnost a změřit všechny jejich reálné provozní parametry. Mezi deklarované výstupy bylo stanovení výrobní ceny obou variant komůrek při kusové, malosériové a velkosériové výrobě. S ohledem na unikátnost modelů byla detekována nutnost chránit technologie a znalosti patentovým právem, formou podání žádosti o český patent, užitný vzor a EU PCT.

Rozsáhlá dokumentace a použité technologické postupy, vzniklé při vývoji, spadají pod ochranu duševního vlastnictví Univerzity Palackého, tudíž v této práci nebylo možné plně zveřejnit technologii výroby dílčích částí, sestavování konstrukce obou hyperbarických komůrek a rozsáhlou fotodokumentaci.

### **Tlakové zařízení – normy a výpočty**

Mikrohyperbarická komůrka je z technického pohledu tlaková konstrukce a z toho důvodu musí být při návrhu a testování dodrženy postupy stanovené právními předpisy, zejména zákonem a normami. Za podmínky dodržení požadavků a zkoušek je možné tlakové zařízení považovat za bezpečné k použití. Definice tlakového zařízení je popsána ve vyhlášce Českého úřadu bezpečnosti práce a Českého báňského úřadu č. 18/1979 Sb., kterou se určují vyhrazená tlaková zařízení a stanoví některé podmínky k zajištění jejich bezpečnosti, ve znění pozdějších předpisů a č. 551/1990 Sb., kterou se mění a doplňuje vyhláška Českého úřadu bezpečnosti práce a Českého báňského úřadu č. 18/1979 Sb., kterou se určují vyhrazená tlaková zařízení a stanoví některé podmínky k zajištění jejich bezpečnosti, ve znění vyhlášky Českého úřadu bezpečnosti práce a báňského úřadu č. 97/1982 Sb.

Koncept mikrohyperbarické komůrky a její varianty uHBK 1 a uHBK 2 byly cíleně navrhovány tak, aby vyhovovaly výjimce definované, § 3 písm. b) vyhlášky č. 18/1979 Sb., která za zařízení ve smyslu této vyhlášky nepovažuje nádoby o objemu do 10 litrů (včetně), u nichž bezpečnostní součin z konstrukčního přetlaku v MPa a objemu v litrech nepřesahuje 10. Varianta uHBK 1 má vnitřní objem 3 l, určený maximální pracovní přetlak 0,8 MPa. Její bezpečnostní součin je pak 2,4. Varianta uHBK má vnitřní objem 6,5 l a určený maximální pracovní přetlak 1,5 MPa. Její bezpečnostní součin je pak 9,45. U každé z variant hyperbarických komůrek byl proveden pouze základní orientační výpočet maximálního dovoleného namáhání a pevnostní podmínky a tento postup je uveden níže.

Tlakové zařízení (TZ) musí splňovat základní technické požadavky na bezpečný výrobek. Proto musí být při návrhu tlakového zařízení pro bezpečnost provozu respektovány požadavky legislativních předpisů pro provádění tlakových konstrukcí, které zakládají povinnost provést základní analýzu pevnosti konstrukce, která je doprovázena numerickou simulací tlakového zatížení a následně u hotového výrobku provést tlakovou zkoušku vodou. Požadavek tlakové zkoušky podle je definován směrnicí PED 97/23/EC a na něj navazující nařízení vlády ČR č. 290/2000 Sb. a je součástí konečného posouzení tlakového zařízení. Posuzuje tlakové zařízení z hlediska jeho odolnosti vůči tlaku a za normálních okolností se provádí tlakem hydraulickým.

Základními legislativními předpisy pro provádění tlakových konstrukcí, technických zařízení a výrobků v České republice jsou: Zákon č. 22/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobky a o změně a doplnění některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, zákon č. 34/2011 Sb., zák. č. 155/2010 Sb., zák. č. 490/2009 Sb., zákon č. 71/2000 Sb., č. 102/2001 Sb., č. 205/2002 Sb., č. 226/2003 Sb., č. 277/2003 Sb., č. 186/2006 Sb. a č. 229/2006 Sb., kterými se mění zákon č. 22/1997 Sb., ve znění pozdějších předpisů, zákon č. 505/1990 Sb., o metrologii, ve znění pozdějších předpisů. Výpočty pevnosti tlakového zařízení vychází z doporučení a předepsaných postupů v normách ČSN 690010 a ČSN 690012.

Tlaková nádoba stabilní (TNS) je nádoba, na jejíž stěny působí tlak pracovní látky, nádoba nemění své stanoviště nebo je přenosná a je trvale nebo přechodně spojena se zdrojem tlaku. Pracovní přetlak TNS je vnitřní přetlak, který vzniká při normálním průběhu pracovního procesu. Nejvyšší pracovní přetlak je nejvyšší hodnota vnitřního přetlaku, kterou smí přetlak v tlakové nádobě dosáhnout za provozu a na níž smí být také nejvýše nastaveno pojistné zařízení. Výpočtový přetlak  $p$  je přetlak, pro nějž se provádí pevnostní výpočet. Výpočtový přetlak pro tlakovou nádobu nebo její část je roven nebo je větší než nejvyšší pracovní přetlak. Zkušební přetlak je přetlak zkušební látky, jímž se zkouší nádoby nebo jejich části při tlakové zkoušce, určuje ČSN 69 0010-7.1.

Požadavky na výstroj TNS jsou především bezpečnostního charakteru, i když musí splňovat požadavky na řádné řízení provozu, odstavování z provozu, regulaci parametrů. Z bezpečnostních hledisek musí výstroj zajišťovat nádobu před překročením maximálního pracovního tlaku. TNS musí mít uzavírací zařízení pro odpojení od potrubí přivádějícího, popř. odvádějícího pracovní látku, a to kvůli oddělení od zdroje tlaku (např. v případě poruchy). Tlakoměr ukazující vnitřní přetlak v připojeném tlakovém prostoru TNS musí indikovat tlak v MPa (kPa). TNS musí mít alespoň jedno pojistné zařízení zabezpečující nádobu před překročením nejvyššího pracovního přetlaku. Zařízení musí být zajištěno proti nedovolenému zásahu do jeho funkce. Výčet požadovaných vlastností, zabezpečení a podmínek je pro TNS velmi rozsáhlý, nejdůležitější části byly uvedeny výše.

### **CAD/CAM software pro návrh uHBK**

Pro návrh digitálních modelů hyperbarických komůrek byl použit specializovaný strojírenský 3D CAD software SolidWorks (Dassault Systèmes, USA), jehož licenci má Lékařská fakulta v Plzni k dispozici. Licence SolidWorks zahrnuje implementovaný modul Simulation, což je pokročilé a robustní, ale zároveň stále snadno ovladatelné a intuitivní řešení pro provádění přesných a reálných simulací návrhů dílů i celých sestav a nabízí řešení

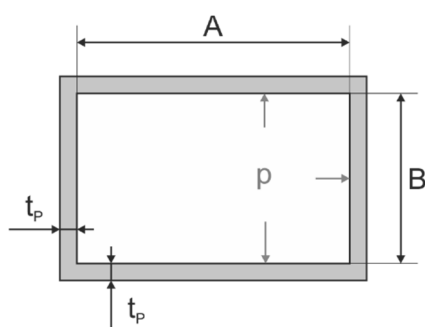
lineárně statických a kontaktních úloh. Pro zhodnocení bezpečnosti návrhů mikrohyperbarických komůrek bylo nutné před výrobou simulací zjistit, zda byly pevnostní výpočty při zatížení a namáhání symetrických součástí tlakem provedeny správně. Způsob modelování a virtuálních dynamických simulací je v současné době při konstrukci technologických celků běžně využíván, protože umožňuje provádět vyhledávání chyb návrhů a optimalizaci dílů před výrobou.

## 7.2 Typ uHBK 1

První typ hyperbarické komůrky má dle návrhu obdélníkový průřez, horizontální pracovní polohu a konstrukčním materiálem je hliníková slitina AISI 6061-T4, která vyniká vysokou pevností v tahu. Volba této slitiny má několik důvodů. Po vhodné chemické úpravě je odolná proti chemickým vlivům a výrazně snižuje hmotnost zařízení.

### Výpočet maximálního dovoleného namáhání a pevnostní podmínky uHBK 1

Mikrohyperbarická komůrka uHBK 1 je tenkostěnná nádoba obdélníkového průřezu. Vnitřní přetlak působí na stěny nádoby a způsobuje jeho namáhání. Při překročení namáhání dochází k nevratnému poškození stěny nádoby. Z tohoto důvodu je nutné vypočítat maximální dovolené namáhání a pevnostní podmínku pro maximální konstrukční tlak nádoby. Rozměry nádoby a parametry materiálů potřebné pro výpočty jsou:



#### Rozměry tlakové nádoby:

$A = 150 \text{ mm}$   
 $B = 80 \text{ mm}$   
 $L = 300 \text{ mm}$   
 $t_{PL} = 5 \text{ mm}$   
 $t_{PR} = 10 \text{ mm}$

#### Maximální pracovní tlak:

$p_{MAX} = 1 \text{ MPa}$

#### Materiálové vlastnosti:

Mez kluzu slitiny 6061-T4

$R_e = 227,5 \text{ MPa}$

**Bezpečnostní koeficient:**  $k = 2$

**Přídavek na korozi a výrobní toleranci:**  $c = 1 \text{ mm}$

Prvním krokem je výpočet maximálního dovoleného namáhání pláště  $\sigma_D$ :

$$\sigma_D = \frac{R_e}{k} = \frac{227,5}{2} = 113,75 \text{ MPa} \quad (30)$$

Stěny nádoby uHBK 1 lze považovat za obdélníkovou desku s vetknutými okraji, maximální dovolené napětí je vypočteno dle vztahu:

$$\sigma_{\max} = 0,308 \cdot p \cdot \left( \frac{a \cdot b}{4 \cdot t_{PL}} \right) \quad (31)$$

Hodnota maximálního dovoleného napětí při působícím tlaku  $p_{MAX}$  na boční stěny je vypočtena dosazením hodnot do vzorce (31).

$$\sigma_{\max(B)} = 0,308 \cdot p \cdot \left( \frac{b \cdot l}{4 \cdot t_{PL}} \right) = 0,308 \cdot 1 \cdot \left( \frac{80 \cdot 300}{20} \right) = 0,308 \cdot 1200 \quad (32)$$

$$\sigma_{\max(B)} = 369,6 \text{ MPa} \quad (33)$$

Hodnota maximálního dovoleného napětí při působícím tlaku  $p_{MAX}$  na horní a spodní stěnu je vypočtena dosazením hodnot do vzorce (31).

$$\sigma_{\max(H)} = 0,308 \cdot p \cdot \left( \frac{a \cdot l}{4 \cdot t_{PL}} \right) = 0,308 \cdot 1 \cdot \left( \frac{160 \cdot 300}{20} \right) = 0,308 \cdot 2400 \quad (34)$$

$$\sigma_{\max(H)} = 739,2 \text{ MPa} \quad (35)$$

Hodnota maximálního dovoleného napětí při působícím tlaku  $p_{\text{MAX}}$  na příruby je vypočtena dosazením hodnot do vzorce (31).

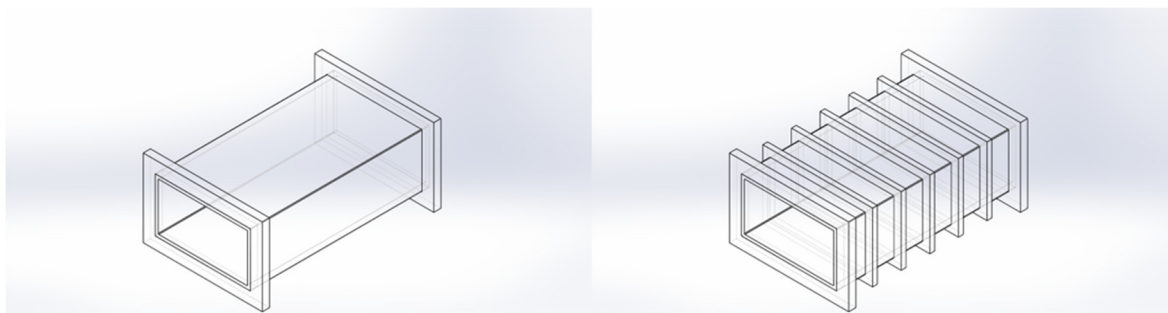
$$\sigma_{\max(PR)} = 0,308 \cdot p \cdot \left( \frac{a \cdot b}{4 \cdot t_{PR}} \right) = 0,308 \cdot 1 \cdot \left( \frac{80 \cdot 160}{40} \right) = 0,308 \cdot 320 \quad (36)$$

$$\sigma_{\max(PR)} = 98,56 \text{ MPa} \quad (37)$$

Podmínku pevnosti lze zapsat ve tvaru:  $\sigma_{\max} \leq \sigma_D$  a porovnáním vypočtených hodnot jsou výsledky pro jednotlivé části následující:

Lokace	$\sigma_{\max}$	$\sigma_D$	Platnost podmínky?
Boční stěny nádoby:	369,6 MPa	113,75 MPa	NE
Horní a spodní stěna:	739,2 MPa	113,75 MPa	NE
Příruby:	98,56 MPa	113,75 MPa	ANO

Výsledky maximálního zatížení všech 4 stěn významně převyšují mez pevnosti materiálu. V tomto případě by došlo k významné deformaci, kterou nelze dopustit. Z tohoto důvodu byla pro vyztužení konstrukce přidána žebra (obrázek 6).



**Obrázek 6.** Úprava konstrukce přidáním žeber k vyztužení stěn.

Tato úprava snížila zatížení stěn nádoby lepším rozložením působícího tlaku. Změnil se parametr délky na hodnotu  $l = 40 \text{ mm}$ . Hodnota maximálního dovoleného napětí při působícím tlaku na boční stěnu je vypočtena dosazením hodnot do vzorce (31).

$$\sigma_{\max(B)} = 0,308 \cdot p \cdot \left( \frac{b \cdot l}{4 \cdot t_{PL}} \right) = 0,308 \cdot 1 \cdot \left( \frac{80 \cdot 40}{20} \right) = 0,308 \cdot 160 \quad (38)$$

$$\sigma_{\max(B)} = 49,28 \text{ MPa} \quad (39)$$

Hodnota maximálního dovoleného napětí při působícím tlaku  $p_{\text{MAX}}$  na horní a spodní stěnu je vypočtena dosazením hodnot do vzorce (31).



$$\sigma_{\max(H)} = 0,308 \cdot p \cdot \left( \frac{a \cdot l}{4 \cdot t_{PL}} \right) = 0,308 \cdot 1 \cdot \left( \frac{160 \cdot 40}{20} \right) = 0,308 \cdot 320 \quad (40)$$

$$\sigma_{\max(H)} = 98,56 \text{ MPa} \quad (41)$$

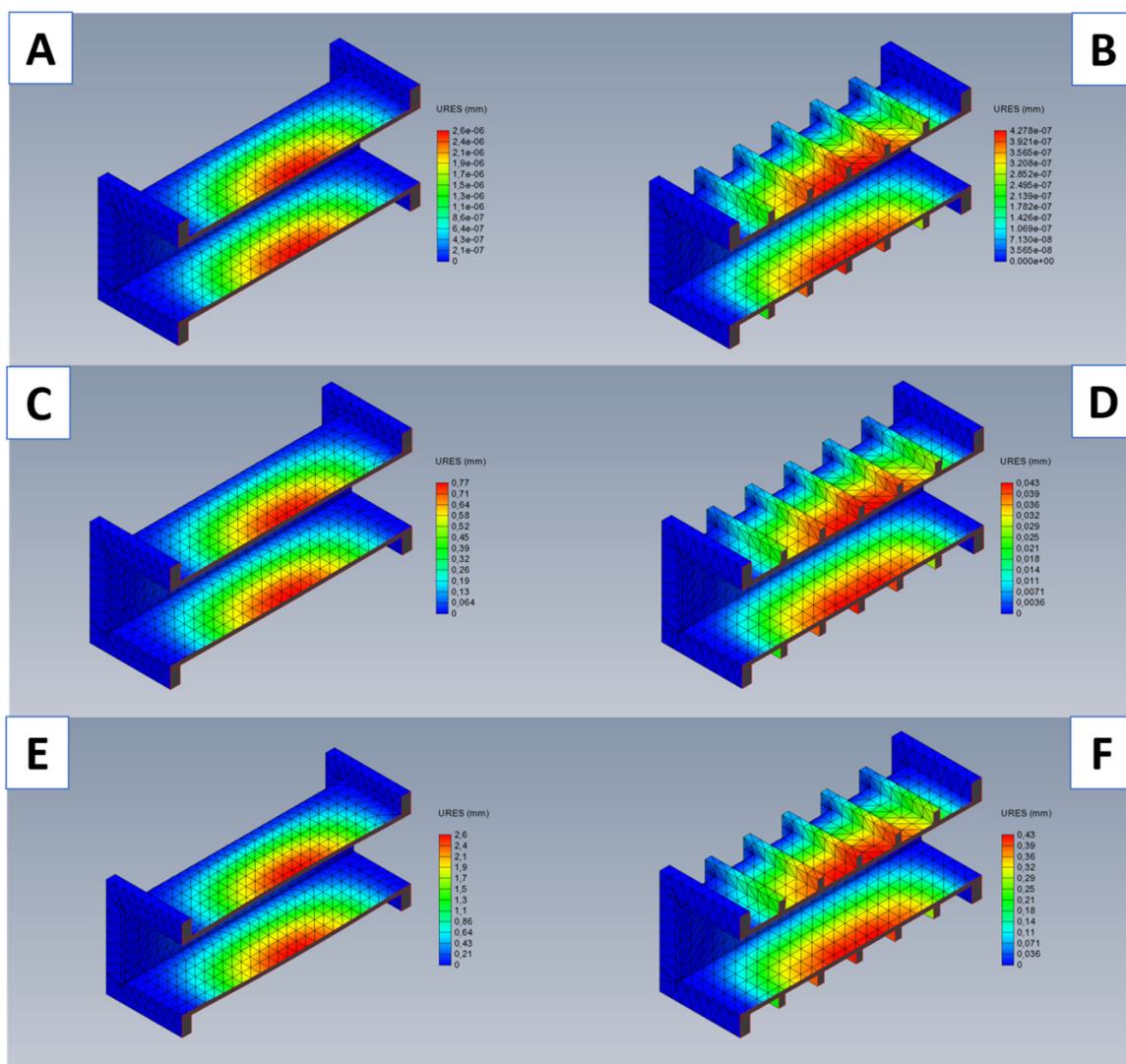
Porovnáním nových výpočtů s hodnotou maximálního dovoleného namáhání pláště  $\sigma_D$  získáváme výsledky:

Lokace	$\sigma_{\max}$	$\sigma_D$	Platnost podmínky?
Boční stěny nádoby:	49,28 MPa	113,75 MPa	<b>ANO</b>
Horní a spodní stěna:	98,56 MPa	113,75 MPa	<b>ANO</b>

Výsledky výpočtů ukazují, že upravené parametry konstrukce tlakové nádoby jsou dostatečně dimenzovány (bezpečnostní koeficient  $k = 2$ ) pro maximální konstrukční přetlak 1 MPa (Černoch 1968; Lenert 1998; Janíček 2004).

## Simulace tlakového namáhání

Mechanické vlastnosti návrhu konstrukce uHBK 1 byly simulovány pomocí specializovaného software SolidWorks Simulations. Na obrázku 7 jsou zobrazeny výsledky deformací tlakové nádoby způsobené tlakovým namáháním pro zvolené pracovní přetlaky. Stupnice URES [mm] a její barevný průmět do výsledků odpovídá poměrové deformaci oproti výchozímu stavu (při nulovém přetlaku). Z obrázků je patrné, že úprava konstrukce vyztužením pláště žebry výrazně snižuje jeho poměrnou deformaci (při 1,0 MPa je maximální deformace bez žebry 2,6 mm; s žebry 0,43 mm).



**Obrázek 7.** Simulace namáhání jádra uHBK 1. Levý sloupec (A, C, E) zobrazuje původní konstrukci bez žebry, pravý (B, D, F) pak s přidáním žebry. Část A a B zobrazuje přetlak 0,1 MPa; C, D přetlak 0,3 MPa a E, F pracovní přetlak 1,0 MPa.

## Parametry uHBK 1

Nejvyšší pracovní přetlak varianty uHBK 1 byl na základě výpočtů a výsledků simulace poměrné deformace stanoven na hodnotu 0,8 MPa. Pro tento přetlak byla úspěšně provedena tlaková vodní zkouška a nastaven pojistný ventil.

**Tabulka 6.** Specifikace a parametry dokončené mikrohyperbarické komůrky uHBK 1

- Malá přetlaková hyperbarická komůrka s obdélníkovým profilem vnitřních prostor.
- Užitný objem 3,0 l.
- Maximální pracovní přetlak 0,8 MPa.
- Konstrukce nádoby z chemicky odolné hliníkové slitiny a PMMA.
- Konstrukce umožňuje provoz v podtlaku.
- Kapalinová teplota vnitřního prostoru.
- Další významné vlastnosti uHBK 1:
  - Jeden regulovatelný vstupní, jeden regulovatelný výstupní port a jeden přímý port pro plyny.
  - Monitoring vnitřní teploty a tlaku.
  - Datové propojení vnitřních prostor (8 vodičů).
  - Nastavitelný bezpečnostní přetlakový ventil.

**Maximální pracovní přetlak:** 0,8 MPa

**Vnitřní rozměry (Š x V x H):** 15 x 8 x 26 cm

**Vnější rozměry (Š x V x H):** 20 x 21 x 43 cm

**Hmotnost:** 9 kg

**Rychlost tlakových změn:** Rychlost plnění: 0,1 – 50 kPa/s

Rychlost vypouštění: 0,1 – 100 kPa/s

**Rychlost teplotní změny vnitřního prostředí:** 0,5 - 1,0 °C/s (v závislosti na výkonu temperačního zařízení)

**Počet vstupů/výstupů plynu:** 1/1 regulovatelné + 1 přímý vstup/výstup

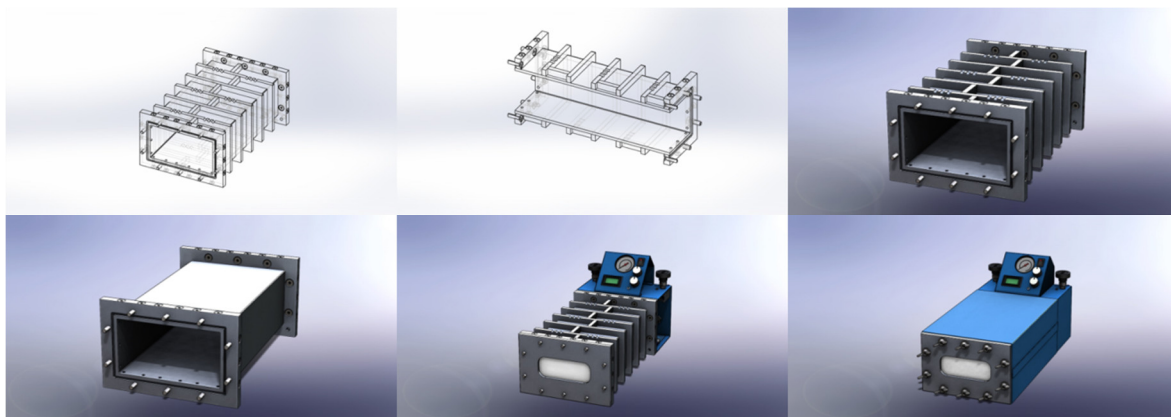
**Rozsah teploty:** + 5 až + 60 °C

**Měřené parametry:** 1x teplota, 1x tlak

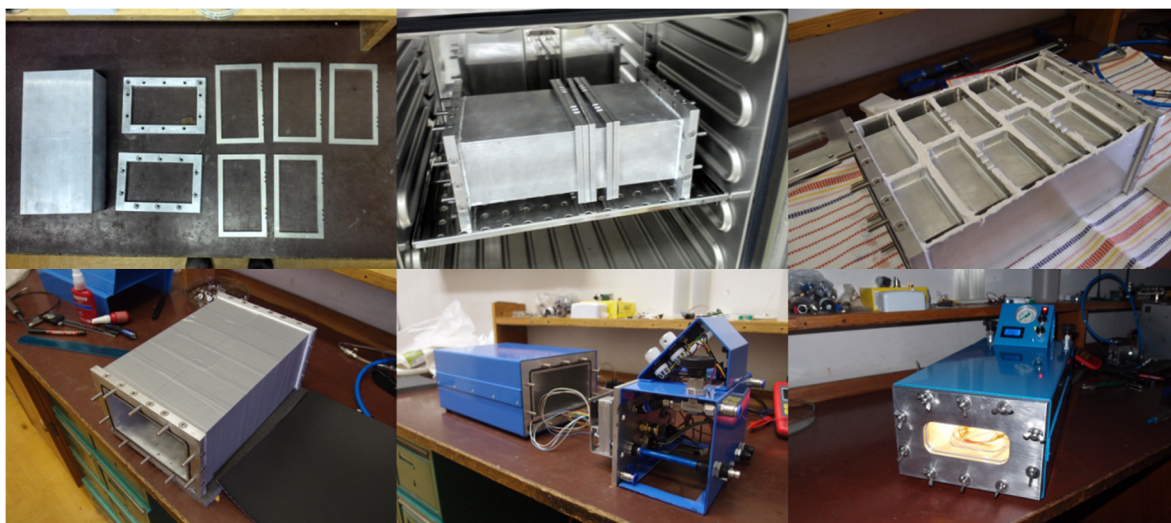
**Další vlastnosti:** Datové propojení (8 vodičů), přední průzor, řízení vnitřního osvětlení a ventilace

## Fotodokumentace uHBK 1

Pro ilustraci rozsahu a komplikovanosti návrhu, tvorby modelů a vývoje prototypu následuje výběr ilustrativních obrázků z vývoje uHBK 1 (vizualizace, konstrukce a finální podoba).



**Obrázek 8.** Ukázky modelů a vizualizace prototypu uHBK 1 navrženého v software SolidWorks.



**Obrázek 9.** Ukázka z průběhu sestavování prototypu uHBK 1.



**Obrázek 10.** Dokončený funkční vzorek uHBK 1.

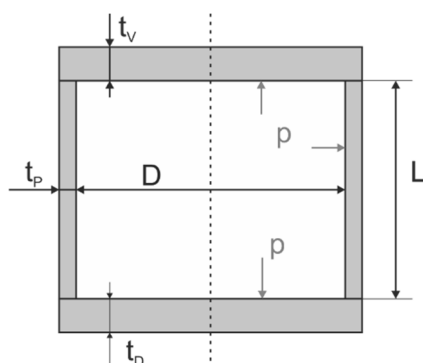
### 7.3 Typ uHBK 2

Po zkušenostech získaných při konstrukci uHBK 1 byla navržena druhá varianta komůrky s větším objemem, kruhovým průřezem, vertikální pracovní polohou a požadovaným pracovním přetlakem 1,5 MPa. Konstrukčním materiálem je nerezová ocel (AISI 316-L). Komůrka má zakomponovány dva průzory z materiálu PMMA (Perspex®).

Spodní průzor umožňuje díky nemagnetickým vlastnostem PMMA využívat magnetické míchání roztoků uvnitř komůrky, aniž by byla míchačka umístěna uvnitř komůrky. Horní průzor z PMMA umožňuje externí osvětlení vnitřních prostor a využití magnetické manipulace. Komůrka umožňuje temperaci svého vnitřního prostředí, regulaci vnitřního osvětlení a aktivní cirkulaci plynů. Komůrka je vybavena řídicí jednotkou, která je umístěná na čelním panelu, umožňuje nezávisle měřit 3 teploty, vnitřní tlak, reguluje osvětlení a ventilaci v komoře a umožňuje logování měřených veličin na SD a komunikaci s PC. Pro ovládání je vybavena sedmipalcovým barevným dotykovým displejem. Řídicí jednotka byla dle požadavků vyvinuta firmou ELVO. Konstrukce i parametry komůrky plně odpovídají původním požadavkům.

#### Výpočet maximálního dovoleného namáhání a pevnostní podmínky uHBK 2

Mikrohyperbarická komůrka uHBK 2 je tenkostěnná nádoba. Vnitřní přetlak působí na stěny nádoby a způsobuje jeho namáhání. Při překročení namáhání dochází k nevratnému poškození stěny nádoby. Z tohoto důvodu se stanovuje minimální tloušťka stěny, maximální dovolené namáhání a pevnostní podmínka pro maximální konstrukční tlak nádoby. Rozměry nádoby a parametry materiálů potřebné pro výpočty jsou:



#### Rozměry tlakové nádoby:

$D = 203 \text{ mm}$   
 $L = 163 \text{ mm}$   
 $t_{PL} = 8 \text{ mm}$   
 $t_v = 20 \text{ mm}$   
 $t_D = 20 \text{ mm}$

#### Maximální pracovní tlak:

$p_{MAX} = 2 \text{ MPa}$

#### Materiálové vlastnosti:

Mez kluzu AISI 316-L

$R_e = 137 \text{ MPa}$

**Bezpečnostní koeficient:**  $k = 3$

**Přídavek na korozi a výrobní tolerance:**  $c = 1 \text{ mm}$

Prvním krokem je výpočet maximálního dovoleného namáhání válcové skořepiny  $\sigma_D$ :

$$\sigma_D = \frac{R_e}{k} = \frac{137}{3} = 45,6 \text{ MPa} \quad (42)$$

Výpočtová tloušťka stěny pláště bez přídavků pro maximální konstrukční přetlak je vypočtena ze vztahu:

$$s_R = \frac{p \cdot D}{2 \cdot \sigma_D - p} = \frac{2 \cdot 200}{2 \cdot 45,6 - 2} = \frac{400}{89,2} = 4,48 \text{ mm} \quad (43)$$

Minimální tloušťka stěny pláště je  $s \geq s_R + c = 4,48 + 1,0 = 5,48 \text{ mm}$ . Zvolená konstrukční tloušťka pláště skořepiny je 8 mm, tato tloušťka je tedy větší než minimální vypočtená.

Dále je nutné provést hodnocení maximálního dovoleného napětí v plášti skořepiny a vyhodnotit pevnostní podmínku. Maximální dovolené napětí  $\sigma_{Red}$  by nemělo přesáhnout maximální dovolené namáhání skořepiny  $\sigma_D$ . Při výpočtu je použita transformovaná Laplaceova rovnice a rovnice rovnováhy pro vhodně zvolený řez. Pomocí těchto dvou rovnic je možné vyřešit napjatost (membránovou) v tenkostěnné nádobě. Postup stanovení meridiánového napětí, obvodového (tečného) napětí, meridiánového poloměru křivosti a obvodového poloměru křivosti lze nalézt v literatuře (Lenert 1998; Janíček 2004). Rovnice hlavních napětí (obvodového a meridiánového) jsou vyjádřeny jako:

$$\sigma_1 = \sigma_t = \frac{p \cdot D}{2 \cdot t_{PL}} \quad (44)$$

$$\sigma_2 = \sigma_m = \frac{p \cdot D}{4 \cdot t_{PL}} \quad (45)$$

Výsledné rovnice nejsou funkcemi polohy a rovnice platí pro celý plášť nádoby. Rovnice vyjadřují (po dosazení číselných hodnot) maximální hodnoty napětí (extrémy). Pro stanovení pevnostní podmínky lze využít např. hypotézu HMH, kde platí:

$$\sigma_{Red} = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 - \sigma_1 \cdot \sigma_2} \quad (46)$$

Po dosazení vztahů pro hlavní napětí, vyjádřených vztahy (44) a (45), je hodnota maximálního dovoleného (redukovaného) napětí stěn skořepiny vypočtena jako:

$$\sigma_{Red} = \sqrt{\left(\frac{p \cdot D}{2 \cdot t_{PL}}\right)^2 + \left(\frac{p \cdot D}{4 \cdot t_{PL}}\right)^2 - \left(\frac{p \cdot D}{2 \cdot t_{PL}}\right) \cdot \left(\frac{p \cdot D}{4 \cdot t_{PL}}\right)} \quad (47)$$

$$\sigma_{Red} = \sqrt{\left(\frac{2 \cdot 203}{2 \cdot 8}\right)^2 + \left(\frac{2 \cdot 203}{4 \cdot 8}\right)^2 - \left(\frac{2 \cdot 203}{2 \cdot 8}\right) \cdot \left(\frac{2 \cdot 203}{4 \cdot 8}\right)}$$

$$\sigma_{Red} = \sqrt{781,25 - 312,5} = \sqrt{468,75} \quad (48)$$

Podmínku Mohrovy hypotézy pevnosti lze zapsat ve tvaru:  $\sigma_{\text{Red}} \leq \sigma_{\text{D}}$  a porovnáním vypočtených hodnot, tedy  $\sigma_{\text{Red}} = 21,6 \text{ MPa} \leq \sigma_{\text{D}} = 45,6 \text{ MPa}$ , je tato podmínka splněna a skořepina navržené tlakové nádoby vydrží maximální konstrukční přetlak 2 MPa.

Pro dno a víko, které jsou svařením, resp. připojením k přírubě víka, považované za vetknuté tenké desky, je opět nutné vypočítat maximální dovolené napětí při působícím tlaku dle vztahu:

$$\sigma_{\text{max}} = \frac{3}{4} \cdot p \cdot \left(\frac{r}{t}\right)^2 \quad (49)$$

Po dosazení hodnot pro dno a víko dostáváme:

$$\sigma_{\text{max}} = \frac{3}{4} \cdot p \cdot \left(\frac{r}{t}\right)^2 = \frac{3}{4} \cdot 2 \cdot \left(\frac{101,5}{20}\right)^2 = 1,5 \cdot 25,75 \quad (50)$$

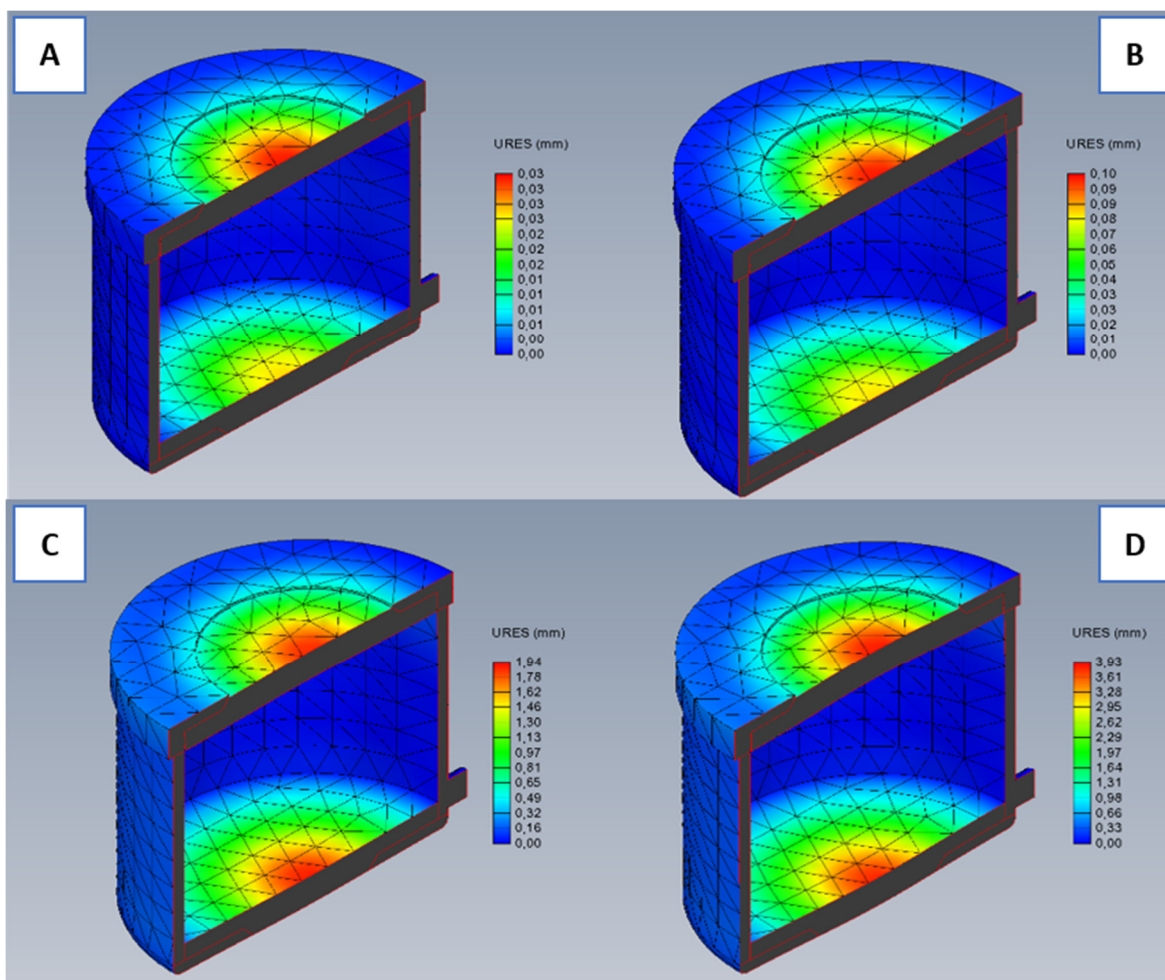
$$\sigma_{\text{max}} = 38,6 \text{ MPa} \quad (51)$$

Podmínku pevnosti lze zapsat ve tvaru:  $\sigma_{\text{max}} \leq \sigma_{\text{D}}$  a porovnáním vypočtených hodnot, tedy  $\sigma_{\text{max}} = 38,6 \text{ MPa} \leq \sigma_{\text{D}} = 45,6 \text{ MPa}$ , je tato podmínka splněna a víko i dno navržené tlakové nádoby vydrží přetlak 2 MPa. (Černocho 1968; Lenert 1998; Janíček 2004)

Výsledky výpočtů ukazují, že navržené parametry konstrukce tlakové nádoby jsou dostatečně dimenzovány (bezpečnostní koeficient  $k = 3$ ) pro maximální konstrukční přetlak 2 MPa.

## Simulace tlakového namáhání uHBK 2

Mechanické vlastnosti návrhu konstrukce uHBK 2 byly simulovány pomocí specializovaného software SolidWorks Simulations. Na obrázku 11 jsou výsledky deformací tlakové nádoby způsobené tlakovým namáháním pro zvolené pracovní přetlaky. Stupnice URES (mm) a její barevný průmět do výsledků odpovídá poměrové deformaci oproti výchozímu stavu (při nulovém přetlaku). Získané vizualizace tlakových deformací odpovídá konstrukčním předpokladům.



**Obrázek 11.** Simulace tlakového namáhání jádra uHBK 2. Část A zobrazuje deformaci při přetlaku 100 kPa; B při přetlaku 300 kPa; C při přetlaku 1,0 MPa; D při přetlaku 2,0 MPa.



## Parametry uHBK 2

Při konstrukci této komůrky se při tlakové vodní zkoušce ukázalo, že na simulační SW nelze vždy spoléhat, neboť v reálných testech došlo k její deformaci díky změnám v kvalitě materiálu při obrábění. Konstrukce byla optimalizována a byla vybrána jiná technologie obrábění. Nové dynamické tlakové zkoušky upravené konstrukce ukázaly spolehlivost optimalizace konstrukce komůrky při zachování původních parametrů. Nejvyšší pracovní přetlak varianty uHBK 2 byl na základě výpočtů a výsledků simulace poměrné deformace stanoven 1,5 MPa. Pro tento přetlak byla úspěšně provedena tlaková vodní zkouška a nastaven pojistný ventil.

**Tabulka 7.** Specifikace a parametry dokončené mikrohyperbarické komůrky uHBK 2

- Malá přetlaková hyperbarická komůrka s válcovým profilem vnitřních prostor, s užitným objemem 6,5 l a maximálním pracovním přetlakem 1,5 MPa.
- Konstrukce nádoby z nerezové oceli a PMMA.
- Kapalinová temperace vnitřního prostoru.
- Barevný dotykový ovládací panel:
  - Měření vnitřního tlaku a aktuální změny tlaku (kPa/s).
  - Možnost nezávislého měření tří teplot (PT100).
  - Přímá regulace osvětlení vnitřních prostor a regulace vnitřní ventilace.
  - Logování minimálních a maximálních hodnot, stopky, zvuková signalizace překročení limitních hodnot, kalibrace měřených hodnot.
  - Záznam vybraných měřených parametrů na SD kartu.
- Další významné vlastnosti uHBK 2:
  - Dva regulovatelné vstupní a jeden regulovatelný výstupní port pro plyny se zpětným ventilem.
  - Integrovaná magnetická míchačka s plynulou regulací otáček.
  - Datové propojení vnitřních prostor (8 vodičů).
  - Možnost připojení spotřebičů na napájení 12/24 VDC.

**Maximální pracovní přetlak:** 1,5 MPa

**Vnitřní rozměry (ØxV):** 22 x 20 cm

**Vnější rozměry (ŠxVxH):** 50 x 25 x 50 cm

**Hmotnost:** 24 kg

**Rychlost tlakových změn:** Rychlost plnění: 0,1 – 50 kPa/s

Rychlost vypouštění: 0,1 – 100 kPa/s

**Rychlost teplotní změny vnitřního prostředí:** 0,5 - 1,0 °C/s

**Počet vstupů/výstupů plynu:** 2/1 (regulovatelné)

**Rozsah temperace:** - 5 až + 70°C (při použití nemrznoucí kapaliny)

**Měřené parametry:** 3x teplota (PT 100), 1x tlak (absolutní, rozsah 0 až 2,0 MPa)

**Další vlastnosti:** Datové propojení (8 vodičů), magnetické míchání, průzor, řízení vnitřního osvětlení a ventilace

## Fotodokumentace uHBK 2

Pro ilustraci rozsahu a komplikovanosti návrhu, tvorby modelů a vývoje prototypu následuje výběr ilustrativních obrázků z vývoje uHBK 2 (vizualizace, konstrukce a finální podoba).



**Obrázek 12.** Ukázky modelů a vizualizace prototypu uHBK 2 navrženého v software SolidWorks



**Obrázek 13.** Ukázka z průběhu sestavování prototypu uHBK 2



**Obrázek 14.** Ukázka funkčního prototypu uHBK 2 a realizování experimentů

## 8. HODNOCENÍ VLIVU HBO EXPOZICE NA HFL1

U pacientů podstupujících léčbu hyperbarickou oxygenoterapií je zvýšeným parciálním tlakem kyslíku nejvíce exponována alveolární tkáň (Han et al. 2018; Pagano a Barazzone-Argiroffo 2003; Tang et al. 2008).

Parametry expozice HBO byly zvoleny podle schválených terapeutických limitů doporučujících maximální tlak kyslíku 300 kPa a 2 hodiny trvání isokomprese (Ay et al. 2007; Sinan et al. 2016; Poyrazoglu et al. 2015). Počet HBO terapeutických expozic používaných v klinické medicíně není pevně standardizován, závisí na indikaci a zdravotním stavu pacienta a může se pohybovat v rozmezí od několika do 60 expozic ročně (Mathieu et al. 2017). V experimentech na zvířatech se počet expozic HBO obvykle pohybuje mezi 1 až 15 (Ay et al. 2007; Ding et al. 2018; Henrique et al. 2018; Sun et al. 2017). Studie vlivu HBO na *ex vivo* modely používající různé typy buněk obvykle uvádějí od 1 do 7 expozic HBO (Kang et al. 2004; Dimitrijevič et al. 1999; Roberts a Harding 1994) a dokumentují, že účinek expozice je detekovatelný již po jediné expozici.

Pro prováděné experimenty byly vybrány podmínky napodobující chronickou léčbu HBO na buněčném modelu lidských fetálních plicních fibroblastů HFL1. Hodnocen byl její vliv na buněčnou proliferaci, morfologii, hustotu a činnost mitochondrií a spotřebu kyslíku HFL1 ve vztahu k buněčné antioxidační kapacitě.

Hodnocení buněčných změn vyvolaných HBO pomocí měření mitochondriální spotřeby kyslíku (HRR – vysoce účinná respirometrie) nebylo dle provedené rešerše dostupné literatury a publikací zatím použito.

### 8.1 Buněčný materiál

Buněčná linie lidských fetálních plicních fibroblastů (HFL1) byla zakoupena od společnosti ATCC (Rockville; Maryland, USA) pod označením ATCC® CCL-153™. Buňky byly kultivovány podle doporučení výrobce v médiu F-12K, tj. Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (ATCC® 30-2004™). Médium bylo doplněno o následující suplementy: 10% (v/v) FBS, 100 U/ml penicillin a 100 mg/ml streptomycin (PAA Laboratories GmbH; Pasching; Austria) a 2,5 mmol/l L-glutamine (Gibco; Life Technologies; Paisley, UK).

Kultivace probíhala ve standardních podmínkách v inkubátoru (vzduch + 5 % CO<sub>2</sub>; 100% RH; 37°C). Při pasážování buněk bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty 1% roztokem PBS. Následně byl přidán roztok 0,05% trypsin/0,02% EDTA v PBS a buňky byly krátkodobě inkubovány do doby, než došlo k jejich uvolnění od povrchu kultivační nádoby.

Vzniklá suspenze byla smísená s 10 násobkem kultivačního média pro inhibici trypsinu, řádně rozpipetována a přemístěna do odměrné zkumavky. Množství sklizených buněk v objemu bylo stanoveno Bürkerovou hemocytometrickou metodou. Pro veškeré pokusy byly použity pouze buněčné pasáže č. 3.

## 8.2 Protokol HBO expozice

Příprava ovlivňovaných a kontrolních buněk probíhala vždy dle stejného protokolu. Buňky, určené pro expozici hyperbarické hyperoxie (HBO), byly vysety do kultivačního plastu a po dobu 24 hodin ponechány v normobarických podmínkách inkubátoru (vzduch + 5 % CO<sub>2</sub>; 100% RH; 37°C). Poté byly po dobu 5 dní vystavovány HBO podmínkám po dobu 2 hodin denně. Hodnoty absolutních parciálních tlaků směsi použitého plynu v hyperbarické komůrce byly: 5 kPa CO<sub>2</sub> + 295 kPa O<sub>2</sub>, teplota prostředí byla udržována na 37°C a vlhkost udržována na 100% RH. Po skončení expozice byly navráceny do inkubátoru a dále kultivovány za normálních podmínek (vzduch + 5 % CO<sub>2</sub>; 100% RH; 37°C). Kontrolní buňky byly po dobu expozice inkubovány v normálních podmínkách. Hodnocení buněk bylo provedeno až po 24 hodinách od poslední HBO expozice.

Při intermitentní HBO expozici je v kultivačním médiu rozpuštěno významně vyšší množství kyslíku než v případě média kontrolních buněk kultivovaných pouze v inkubátoru. Hodnotu Henryho konstanty pro rozpuštěný kyslík v kultivačním médiu lze vypočítat za použití experimentálně odvozených hodnot rovnovážného rozpuštěného kyslíku (Place et al. 2017). U většiny komerčně dostupných kultivačních médií pro lidské buněčné linie je rozpustnost kyslíku obdobná. Jejich iontová síla (suma všech elektricky nabitých částic přítomných v roztoku) je v rozmezí 150 – 200 mmol/l, tedy ekvivalentu průměrné hodnoty iontové síly lidské plazmy (Wagner et al. 2011).

Při teplotě okolí (RT) 37 °C, atmosférickém tlaku vzduchu 101,08 kPa (760 mmHg) v inkubátoru (37 °C, 100% RH, 5 % CO<sub>2</sub>) parciální tlak kyslíku nad hladinou média 18,8 kPa (141,4 mmHg). Teoretická extrapolovaná koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu za těchto podmínek má hodnotu 0,194 mmol/l (Koppenol a Butler 1985). Hodnota Henryho konstanty rozpustnosti kyslíku má za těchto podmínek hodnotu 97 Pa·m<sup>3</sup>/mol (728,7 mmHg/mmol). Pro médium vystavené HBO směsi plynu při tlaku 300 kPa (pO<sub>2</sub> = 295 kPa; pCO<sub>2</sub> = 5 kPa), teplotě 37 °C, 100% vlhkosti, 5 % CO<sub>2</sub>, je teoretická extrapolovaná koncentrace rozpuštěného kyslíku 2,77 mmol/l. Tato hodnota je téměř 15x

vyšší než v případě množství rozpuštěného kyslíku u buněk kultivovaných pouze v inkubátoru.

Vzhledem k délce expozice, použitému objemu kultivačního média, stabilnímu tlaku a koncentraci kyslíku v prostředí nad hladinou média, difuzní konstantě kyslíku kultivačního média a nízké míře spotřeby kyslíku (OCR) kultivované linie lze systém zjednodušit a zanedbat rozdíl koncentrace mezi svrchní a spodní vrstvou média. V případech běžných kultivací s atmosférickým kyslíkem je situace komplikovanější, jak je uvedeno v článku (Place et al. 2017).

### 8.3 Hodnotící metody

Pro hodnocení studia účinku fyzikálních podmínek v hyperbarické komoře na buňky byly vybrány níže specifikované metody. Jedná se o běžně používané metody hodnocení (v dostatečném rozsahu verifikované v odborné literatuře), k jejichž výběru přispěla také dosavadní zkušenost s jejich prováděním a hodnocením a také dostupnost potřebné přístrojové techniky a materiálu na pracovištích Lékařské fakulty v Plzni.

#### Antioxidační kapacita kultivačního média

Buňky živého organismu v průběhu svého buněčného života prakticky nepřetržitě produkují volné radikály a reaktivní kyslíkové radikály ROS (Reactive Oxygen Species). Volné radikály mohou být definovány jako molekuly, případně molekulové fragmenty, obsahující jeden nebo více nepárových elektronů v atomových či molekulových orbitalech. Tyto nepárové elektrony vznikající štěpením vazby, přijetím nebo ztrátou elektronu, určují vysoký stupeň reaktivity volných radikálů. Hlavními zdroji volných radikálů jsou lyzosomy a peroxisomy, buňky schopné fagocytózy, biotransformační procesy na endoplazmatickém retikulu, Fentonova reakce přechodných kovů a některé fyzikální faktory jako UV nebo rentgenové záření. Jedním z procesů, u nichž může také docházet ke vzniku volných radikálů, je dýchací řetězec v mitochondriích. Reakce volných radikálů a případně látek neradikálové povahy s biomakromolekulami, jsou nejčastější příčinou poškození buněčných struktur, buněk a celých tkání.

V těle jsou buňky v kontaktu s krví a tkáňovými tekutinami obsahujícími antioxidanty, které je chrání před oxidačním poškozením. Při *in vitro* podmínkách je tato ochrana ještě mnohem důležitější, protože jsou buňky vystaveny vyšší koncentrací kyslíku než v těle, a proto podléhají oxidačnímu stresu. Z tohoto důvodu je vhodné zjistit, v jaké míře dochází u kultivačního média při hyperbarické expozici ke změnám antioxidační kapacity. Celková

antioxidační kapacita (TAC; Total Antioxidant Capacity) je užitečným odhadem výsledné aktivity antioxidantů v použitém kultivačním médiu (Lewinska et al. 2007; Halliwell 2003; Rubin 1997).

**TEAC assay** - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) je metoda založená na měření schopnosti antioxidantů, které jsou přítomny ve vzorku média, zhášet volné radikály. Principiálně se jedná o chemickou reakci ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonová kyselina)) vedoucí při inkubaci k vytvoření ABTS radikálu (ABTS<sup>+</sup>). ABTS<sup>+</sup> má modrozelenou barvu s maximální absorpcí na vlnové délce  $\lambda_{\text{abs}} = 734 \text{ nm}$ . Přítomné antioxidanty zhášejí radikál ABTS<sup>+</sup> a snižují tak absorbanci při dané vlnové délce v míře, která je úměrná jejich koncentraci ve vzorku (Miller et al. 1993; Erel 2004). Existují různé verze TEAC assays, lišící se způsobem generování kyslíkových radikálů, v našem případě byl použit persulfát draselný. Reakční rychlost redukce antioxidantů je kalibrována pomocí Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ve vodě rozpustného analogu vitamínu E, a výsledky testu jsou vyjádřeny v mmol/l tohoto Trolox standardu.

**FRAP assay** - Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) je stanovení založené na principu redukce komplexu tripyridyltriazinu (Fe<sub>3</sub>-TPTZ) železitého na železnatý tripyridyltriazin (Fe<sub>2</sub>-TPTZ) antioxidanty vzorku při nízkém pH. Výsledný produkt (Fe<sub>2</sub>-TPTZ) má modrofialovou barvu s absorpčním maximem při vlnové délce  $\lambda_{\text{abs}} = 593 \text{ nm}$ . Pro kalibraci se používají vodné roztoky se známou koncentrací železa (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) a hodnoty jsou vyjádřeny jako mmol/l FeSO<sub>4</sub> (Benzie a Strain 1996).

**Metoda** - Detailní postup stanovení je popsán v původním článku Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: An update (Rubio et al. 2016). Hodnocení antioxidační kapacity bylo provedeno pro sadu několika různě ovlivněných vzorků. Jednalo se o vzorek čistého nového kultivačního média F12-K se suplementy a vzorek čistého média se suplementy vystaveného 2 hodinové expozici v hyperbarické komůrce (5 kPa CO<sub>2</sub> + 295 kPa O<sub>2</sub>). Další vzorky byly odebrány s HFL1 buňkami, které byly po dobu 5 dní exponovány v hyperbarické komůrce, a poslední vzorek byl odebrán z kultivačních nádob kontrolních buněk. Pro metodu TEAC bylo 200  $\mu\text{l}$  z každého vzorku smíšeno s 2 ml činidla obsahujícího radikál ABTS<sup>+</sup>. Pro metodu FRAP bylo 200  $\mu\text{l}$  z každého vzorku média smíšeno s 2 ml činidla obsahujícího TPTZ. Absorbance vzorků byly odečítány po 10 minutách inkubace při teplotě okolí (RT) a při vlnové délce  $\lambda_{\text{abs}} = 734 \text{ nm}$  pro antioxidační kapacitu Trolox ekvivalentu (TEAC) a redukční vlastnosti (FRAP) při  $\lambda_{\text{abs}} = 593 \text{ nm}$ . Jako slepý vzorek byl použit objem 200  $\mu\text{l}$  destilované vody. Celková antioxidační kapacita vzorků médií byla

vyjádřena koncentrací v mmol/l Troloxu a schopnost média redukovat železitý iont jako koncentrace v mmol/l FeSO<sub>4</sub>.

### **Hodnocení růstu buněk**

Pro hodnocení a porovnání růstu ovlivňovaných a kontrolních buněk byla použita Bürkerova hemocytometrická metoda. Buňky byly vysety v počtu 15 000 buněk do 24 jamkových kultivačních destiček (TPP®) s objemem 1ml média. V průběhu kultivace nebylo přidáváno ani měněno žádné médium. Ovlivňování probíhalo dle popsaného kultivačního protokolu po dobu 5 dní. Každý den, tj. 2 až 5 den experimentu, a následně po 24 hodinách od poslední expozice, byly ovlivňované a kontrolní buňky sklizeny vždy z 3 jamek a jejich množství bylo spočteno jako průměrná hodnota z 6 polí Bürkerových komůrek. Výsledná hodnota počtu buněk je vyjádřena jako množství buněk v 1 ml média (bb/ml).

### **Buněčná viabilita**

Pro porovnání životaschopnosti ovlivněných a kontrolních buněk, tj. schopnost buněk se množit a vykazovat metabolickou aktivitu v daných podmínkách a kvantitativně rozlišit živé a mrtvé buňky, byla použita metoda fluorescenčního barvení pomocí kitu by PrestoBlue® viability reagent (Invitrogen, Life Technologies, Prague, CZ). Reagencie využívají enzymové mitochondriální aktivity u živých buněk, které redukují nefluorescenční modrý resazurin na fluorescenční růžový resorufin.

10 000 buněk bylo vyseto 96 jamkových kultivačních destiček (TPP®) v objemu 400 µl kultivačního média. Ovlivňování probíhalo dle popsaného kultivačního protokolu po dobu 5 dní. V průběhu kultivace nebylo přidáváno ani měněno žádné médium. 24 hodin po poslední expozici byly buňky (HBO a kontrolní) obarveny postupem dle instrukcí výrobce kitu. Pro kvantitativní stanovení počtu živých buněk v obou vzorcích byl použit bottom-read fluorescence microplate reader Synergy H1 (Biotek, Winooski, Vermont, USA). Použitá excitační vlnová délka byla  $\lambda_{ex} = 560$  nm a emisní vlnová délka  $\lambda_{em} = 590$  nm.

### **Hodnocení změn buněčné morfologie**

Pro kvalitativní vyhodnocení změn morfologie ovlivněných a kontrolních buněk byla použita metoda hodnocení plochy, obvodu a index cirkularity (Holubova et al. 2012). Index cirkularity vypovídá o tvaru buňky. Hodnota blíží se k 1 znamená dokonale kruhovitý tvar buňky, hodnota blíží se k 0 indikuje charakter hvězdicovitého mnohoúhelníku.

Pro hodnocení bylo použito 59 HBO ovlivněných a 55 kontrolních nezávislých a náhodně vybraných buněk z 10 různých zorných polí. Fotografie buněk byly nasnímány fázovou mikroskopií v procházejícím světle při zvětšení 60x pomocí inverzního mikroskopu Olympus IX 81 (Olympus, Tokio, Japan) osazeným kamerou Hamamatsu Orca-ER. Fotografie byly hodnoceny softwarem QuickPHOTO Industrial 2.3 software (Promicra Ltd., Prague, CZ). Vybraným exponovaným a kontrolním HFL1 buňkám byl v software ohraničen jejich obvod a následně vypočten podle vnitřního algoritmu SW obvod a plochu buněk. Index cirkularity byl vypočten dle vztahu (52):

$$f_{\text{CIRC}} = 4 \cdot \pi \times \left( \frac{\text{plocha}}{\text{obvod}^2} \right) \quad (52)$$

### **Imunofluorescenční hodnocení buněčné morfologie**

Lze předpokládat, že odlišné fyzikální podmínky (předně zvýšený tlak a výrazně vyšší koncentrace rozpuštěného kyslíku v kultivačním médiu) vyvolají měřitelnou odezvu v buněčné struktuře. K porovnání změn v morfologii buněčné struktury mezi ovlivněnými a kontrolními buňkami byly vybrány imunofluorescenční metody umožňující zobrazení struktury buněčného cytoskeletu (vinkulin, vimentin, aktin) a mitochondriální sítě.

Vimentin je cytoskeletální složka zodpovědná za udržování integrity buněk, vyskytuje se v sítích mikrotubulů a aktinových vláken, hraje významnou roli při podpoře a ukotvení polohy organel v cytosolu a poskytuje buňkám pružnost v případě vystavení mechanickému namáhání (Goldman et al. 1996). Vinkulin je membránově-cytoskeletální protein fokálních adhezí a je spojen s fokální přilnavostí. Jeho zvýrazněním lze zobrazit míru adheze buňky k povrchu (Goldmann a Ingber 2002). Aktin je strukturní (globulární) protein, polymerující do dlouhých vláken (mikrofilament), která tvoří součást cytoskeletu buňky. Vlákna aktinu určují tvar buňky, poskytují jí oporu, umožňují pohyb uvnitř buňky, pohyb buňky samotné. Při dělení umožňují zaškrvení a oddělení dceřiných buněk (Lodish et al. 2008). Zvýrazněním mitochondriální sítě je možné získat kvalitativní informaci o množství mitochondrií, jejich lokalizaci, viabilitě a struktuře této sítě.

HFL1 buňky byly vysety v četnosti 40 000 buněk do 12 jamkových kultivačních destiček (TPP®) v objemu 400 µl kultivačního média. Ovlivňování probíhalo dle popsaného kultivačního protokolu po dobu 5 dní. V průběhu kultivace nebylo přidáváno ani měněno žádné médium.

**Vimentin, Vinkulin** - Imunofluorescenční barvení buněk probíhalo 24 hodin po poslední HBO expozici kitem Image-iT® Fixation/Permeabilization Kit (Life Technologies). Byly fixovány 4%



roztokem formaldehydu po dobu 15 minut, dále byly buňky permeabilizovány po dobu 15 minut při teplotě okolí. Finálně byly vzorky ponechány po dobu 60 minut v 3% roztoku BSA (*bovine serum albumin*). BSA protein se váže na nespecifická vazebná místa, čímž zvyšuje pravděpodobnost, že se budou imunofluorescenční protilátky vázat pouze na cílené antigeny. Blokátor BSA také zlepšuje citlivost snížením šumu pozadí, protože místa jsou pokryta mírně nereaktivním proteinem. Po každém kroku byl buněčný materiál 3x promyt 1% roztokem PBS.

Imunofluorescenční značení probíhalo podle protokolu protilátek. K připraveným vzorkům byly přidány primární monoklonální protilátky: Anti-Vinculin (V9131, Sigma-Aldrich) a Anti-Vimentin (V5255, Sigma-Aldrich) v ředění 1:100 a inkubovány 24h při 4 °C. Následně byly přidány sekundární protilátky Anti-Mouse IgG-Atto 488 goat antibody (62197, Sigma-Aldrich, CZ;  $\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 522 \text{ nm}$ ) v ředění 1:400 a Anti-Mouse IgM-FITC goat antibody (F9259, Sigma-Aldrich;  $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) v ředění 1:125. Analýza fluorescenční odezvy a obrazová data byla provedena na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81 (Olympus; Tokio, Japan) vybaveným systémem Cell-R system se zvětšením 40x, 100x, a 400x.

**Aktin** - Pro fluorescenční zvýraznění aktinových vláken byl k HBO ovlivněným a kontrolním HFL1 vzorkům přidán roztok Phalloidin-Atto 488 (49409, Sigma-Aldrich). Phalloidin s fluorescenčními agens je využíván jako užitečný nástroj pro zkoumání distribuce F-aktinu a jeho vláken v buňkách. Vmezeňuje se do struktury F-aktinu mezi jednotlivé monomerní jednotky a vytváří tak vzájemné pevné spojení těchto přilehlých podjednotek. Intenzitu fluorescenční odezvy lze použít, v případě saturace phalloidinem, jako kvantitativní měřítko stanovení množství aktinu v buňkách (Cooper 1987). Obarvená sklíčka s buňkami byla následně trvale fixována pomocí ProLong® Gold Antifade Mountant (Invitrogen, Life Technologies, Prague, CZ), kapalinou obsahující chemické komponenty určené k ochraně fluorescenčních barviv před vyblednutím (fotobleaching) během fluorescenční obrazové analýzy. Analýza fluorescenční odezvy ( $\lambda_{\text{ex}} = 501 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 523 \text{ nm}$ ) a obrazová data byla provedena na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81 vybaveným systémem Cell-R system se zvětšením 40x, 100x a 400x.

**MitoTracker** - Mitochondriální síť byla fluorescenčně vizualizována pomocí MitoTracker™ Red CMXRos kit (M7512; Thermo Fisher Scientific). Do kultivačních misek s HBO a kontrolami v objemu 1 ml kultivačního média bylo 24 hodin po poslední expozici přidáno 0,5  $\mu\text{l}$  barviva v koncentraci 1 mmol/l. Analýza fluorescenční odezvy ( $\lambda_{\text{ex}} = 579 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 599 \text{ nm}$ )

a obrazová data byla hodnocena na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81 (Olympus; Tokio, Japan) osazeným kamerou Hamamatsu Orca-ER a při zvětšení 100x.

### **Aktivita citrát syntázy (CS)**

Enzym citrát syntáza (CS) hraje klíčovou roli v metabolické dráze (Krebsův cyklus) aerobních organismů (Wiegand a Remington 1986). CS se nachází v mitochondriální matrix a běžně se používá jako kvantitativní marker přítomnosti intaktních mitochondrií (Mogensen et al. 2006; Rabøl et al. 2009). Spektrofotometrickým porovnáním množství CS u ovlivněných a kontrolních buněk lze stanovit, zda a v jaké míře dochází k poklesu či nárůstu množství mitochondrií v buňce.

Množství mitochondrií ve vzorcích buněk bylo stanoveno měřením aktivity enzymu CS. Použité médium se skládalo z 0,1 mmol/l kyseliny 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic), 0,25 % Triton-X, 0,5 mmol/l oxalacetátu, 0,31 mmol/l acetylkoenzymu A, 5  $\mu$ mol/l EDTA, 5 mmol/l triethanolamin hydrochloridu a 0,1 mol/l Tris-HCl a pH bylo upraveno na 8,1 (Kuznetsov et al. 2002). Z komůrek oxygrafu bylo odebráno 200  $\mu$ l homogenizovaného buněčného obsahu, ke kterému bylo přidáno 800  $\mu$ l analytického média kitu. Aktivita enzymu byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm, teplotě 30°C a po dobu 200 s. Výsledná hodnota je vyjádřena jako 1 milli-international units na  $10^6$  buněk (1mU/ $10^6$ ).

### **Aktivita superoxid dismutázy (SOD)**

Oxidační stres, který je způsobený reaktivními formami rozpuštěného kyslíku ve formě superoxidu ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylových radikálů ( $OH^{\bullet}$ ), představuje nerovnováhu mezi kyslíkovými radikály a antioxidační obranou organismu a vede k poškození buněk. Rozpuštěný superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) může dále reagovat s  $H_2O_2$  a vytvářet atomární formu kyslíku a hydroxylové radikály, které jsou ještě více reaktivní a cytotoxické než  $O_2^{\bullet-}$  nebo  $H_2O_2$ . Antioxidační enzymy jsou důležitou součástí obrany vůči oxidačnímu stresu a mezi nedůležitější z nich patří superoxid dismutáza (SOD). SOD je důležitý enzym buněčné obrany proti kyslíkové toxicitě odpovědný za eliminaci superoxidového radikálu ( $O_2^{\bullet-}$ ), čímž chrání buňky před poškozením spojeným s volnými radikály. Je zřejmé, že v prostředí se zvýšenou (HBO) koncentrací vzdušného a tedy i rozpuštěného kyslíku bude docházet ke vzniku vyšší koncentrace superoxidu. Hodnocením aktivity SOD je tedy možné zjistit, zda a jak účinně se buňky exponované HBO brání, tedy s jakou intenzitou dochází k produkci SOD oproti kontrolním buňkám, které jsou kultivovány za normálních podmínek.

Aktivita SOD v exponovaných a kontrolních buňkách byla stanovena kitem SOD Assay Kit (19160, Sigma-Aldrich, CZ). Metoda stanovení spočívá v měření míry inhibice redukce přidávaného substrátu (WST-1) enzymem SOD. Do 96 jamkových kultivačních destiček (TPP®) bylo vysazeno 10 000 HFL1 buněk v objemu 400 µl kultivačního média, které byly následně exponovány v komůrce po dobu 5 dní podle uvedeného protokolu. Současně s tím bylo vysazeno stejné množství kontrolních buněk. V průběhu kultivace nebylo přidáváno ani měněno žádné médium. Příprava vzorků byla provedena dle protokolu výrobce. Absorbance úměrná inhibiční aktivitě SOD byla odečtena při vlnové délce 450 nm za použití čtečky Synergy H1 (Biotek, Winooski, Vermont, USA). Aktivita SOD byla vypočtena podle rovnice (53):

$$SOD \text{ activity (inhibition rate [\%])} = \frac{(A_{blank1} - A_{blank3}) - (A_{sample} - A_{blank2})}{(A_{blank1} - A_{blank3})} \times 100 \quad (53)$$

## 8.4 Mitochondriální respirometrie (HRR)

Mitochondriální respirometrie (HRR, High Resolution Respirometry) je využívána k hodnocení mitochondriální činnosti (respirace, mitochondriální spotřeby kyslíku). Metoda je založena na detekci minimálních změn koncentrace kyslíku (OCR, oxygen consumption rate, měření spotřeby kyslíku) v uzavřeném systému vizolovaných mitochondriích, buněčných kulturách, nebo ve vzorcích lidské tkáně v uzavřené komoře oxygrafu (Hütter et al. 2006; Makrečka-Kuka et al. 2015).

Mitochondriální respirace je hodnocena sledováním několika respiračních stavů. Tyto respirační stavy oxidativní fosforylace, popisující její aktuální rozpřažení (tj. snížení účinnosti využití elektronů pro pumpování protonů), se označují jako ROUT, LEAK, OXPHOS a ETS (Pesta a Gnaiger 2012).

**Respirační stav ROUT** odpovídá klidovému dýchání intaktních buněk suspendovaných v měřicím médiu v komůrce oxygrafu (Pesta a Gnaiger 2012; Gnaiger 2014).

**Respirační stav LEAK** je spřažený respirační stav při nejnižší spotřebě kyslíku na vnitřní mitochondriální membráně (IMM) a dochází k němu při absenci ADP přidáním substrátů do mitochondriální suspenze pro tvorbu redukčních koenzymů. LEAK vyjadřuje stav nejvyššího mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) na vnitřní mitochondriální membráně při spotřebě kyslíku a transportu vodíkových protonů kvůli kompenzaci unikajících či prosakujících protonů skrz IMM do mitochondriální matrix nezávisle na ATP syntáze. K výslednému LEAK stavu se připočítávají protony, které jsou využity pro nefosforylační reakce na IMM (např. transport látek) (Pesta a Gnaiger 2012; Gnaiger 2014).

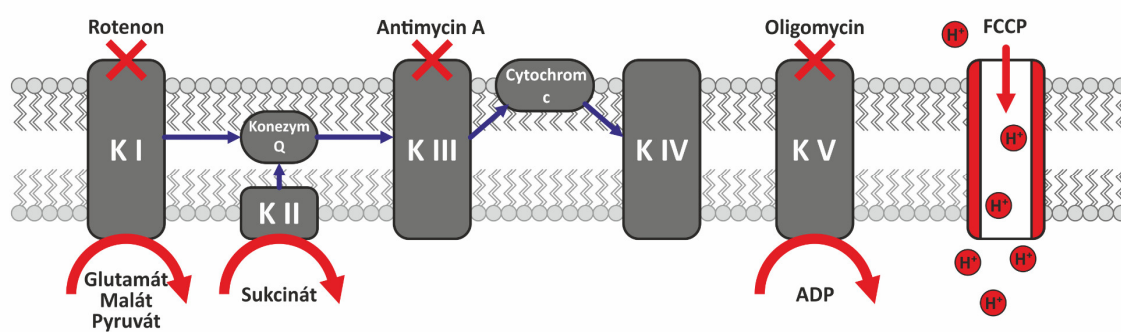
**Respirační stav OXPHOS** (Oxidative Phosphorylation) reflektuje situaci na vnitřní mitochondriální membráně při fosforylaci ADP na ATP. Pro průběh fosforylace je nutná přítomnost funkčního enzymu ATP syntázy. Fosforylace probíhá současně s přesunem vodíkových iontů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Transportem protonů ve směru elektrochemického gradientu dojde ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu, který zrychlí transport protonů jednotlivými respiračními komplexy a zrychlí tok elektronů v respiračním systému. Děj vede ke zvýšení spotřeby kyslíku (OCR), který je zaznamenáván (Pesta a Gnaiger 2012; Gnaiger 2014).

**Respirační stav ETS** (Kapacita elektrontransportního systému) reprezentuje stav komplexů mitochondriální respirace při maximální možné rychlosti. Výsledná spotřeba kyslíku vyjadřuje maximální kapacitu přenášet elektrony přes elektronový transportní

systém. Stav ETS je indukován přidáním rozpřahovačů způsobujících rozpřažení oxidativní a fosforylační složky respiračního systému. Jedná se o chemické molekuly (protonofory) snadno přijímající a uvolňující vodíkový proton, které se mohou díky své lipofilní povaze vmezeřit do mitochondriální membrány. Pokud je mitochondriální membrána maximálně nasycena protonoforem, dojde k přestupu maximálního množství vodíkových iontů ve směru koncentračního gradientu a kompletnímu zániku mitochondriálního membránového potenciálu. V tomto stavu je možné zajistit, jakou maximální kapacitu mají komplexy ETS pro pumpování vodíkových protonů. Celková kapacita toku elektronů respiračním systémem je vyjádřena spotřebou kyslíku (OCR) (Pesta a Gnaiger 2012; Gnaiger 2014).

Hodnocení buněčné respirace bylo provedeno v přístroji Oxygraph-2k (OROBOROS, Innsbruck, Rakousko). Přístroj obsahuje dvě Clarkovy kyslíkové elektrody v komůrkách o objemu 2 ml. Komůrky jsou vyrobeny z duranového skla, jsou speciálními materiály izolované od okolního prostředí a zabraňují tak difuzi kyslíku do média v komůrce. Mají velmi přesnou kontrolu teploty (až na 0,001 °C). Konstrukce umožňuje v oxygrafu rozpoznávat změny úrovně rozpuštěného kyslíku o hodnotě koncentrace až 1 pmol/s·ml. Oxygraph-2k je tedy vhodným nástrojem pro studium mitochondriální fyziologie (Hütter et al. 2006; Makrečka-Kuka et al. 2015; Pesta a Gnaiger 2012).

Výběrem vhodného protokolu, tj. přidáváním vhodných substrátů a inhibitorů, lze sledovat aktivitu jednotlivých komplexů elektronového transportního řetězce.



**Obrázek 15.** Schématické zobrazení působení substrátů, inhibitorů a dalších látek na funkci systému oxidativní fosforylace. K I – komplex I, K II – komplex II, K III – komplex III, K IV – komplex IV, komplex V (ATP syntáza).

Substrátem pro komplex I je kombinace pyruvátu, malátu a glutamátu. Pro inhibici komplexu I je používán rotenon. Substrátem pro komplex II je sukcinát. Přidáním antimycinu A dochází přes komplex III k inhibici celého elektronového transportního řetězce (Pesta a Gnaiger 2012). Dále je využíváno rozpojovačů (jako je např. FCCP, CCCP, atd.), které

umožňují rozpojení elektronového transportního řetězce a cyklu oxidativní fosforylace, což má za následek přerušení činnosti ATP syntázy. Jejich inhibice vede ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu, způsobující zvýšenou spotřebou kyslíku (Pesta a Gnaiger 2012; Gnaiger 2014).

400 000 buněk bylo vyseto na 90 mm Petriho misku v objemu 10 ml kultivačního média F12K. Následně byla provedena intermitentní expozice dle protokolu popsánoho výše.

Pro zajištění dostatečného množství dat pro statistické hodnocení byla kultivace opakována v uvedeném množství: HBO (n = 7) a kontrolní buňky (n = 15). Rozdíl v množství vzorků byl způsoben zvýšenými ztrátami HBO ovlivněných buněk zapříčiněných sníženou viabilitou a sníženou odolností při sklizení. Respirometrické experimenty byly prováděny v přístroji Oxygraph-2k ve skleněných komůrkách o objemu 2 ml a teplotě 37 °C. Spotřeba kyslíku (OCR, Oxygen consumption rate) byla měřena v médiu MIRO5 (složení: 0,5 mmol/l kyseliny ethylenglykoltetraoctové; 3 mmol/l  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 60 mmol/l K-laktobionátu; 20 mmol/l taurinu, 10 mmol/l  $KH_2PO_4$ ; 20 mmol/l HEPES; 110 mmol/l D-sacharózy a 1 g/l albuminu bez mastných kyselin). Médium bylo ekvilibrované vzduchem (Pesta a Gnaiger 2012). Sklizené buňky byly injikovány do komor, smíchány s médiem MIRO5 a následně spočítány Bürkerovou hemocytometrickou metodou. Průměrný počet buněk byl cca  $5 \times 10^5$  na komoru oxygrafu, což je dle zkušeností týmu mitochondriální laboratoře stále ještě dostatečné množství pro změření dostatečně silného signálu spotřeby kyslíku.

Po uzavření komůrek oxygrafu od okolního prostředí byla změřena respirační aktivita intaktních buněk (ROUT). Následně byla buněčná membrána permeabilizována digitoninem (5  $\mu g/ml$ ) a postupnou aplikací kombinace substrátů, inhibitorů a odpojovačů do komor byly stanoveny následující respirační stavy.

Stav LEAK byl indukován přidáním substrátů, které poskytují elektrony komplexu I (malát, 2 mmol/l) a flavoproteinu pro přenos elektronů (ETF palmitoylkarnitin, 20  $\mu mol/l$ ). Stav oxidativní fosforylace P(Pal) byl vyvolán přidáním adenosindifosfátu (ADP, 5 mmol/l). Míra permeabilizace buněčné membrány byla zjištěna přidáním cytochromu c (10  $\mu mol/l$ ). Následně byla mitochondriální respirace zvýšena přidáním substrátů komplexu I - glutamátu (10 mmol/l; P(PalG)) a pyruvátu (5 mmol/l; P(PalGP)). OXPHOS(PalGPS) byl indukován substrátem komplexu II - sukcinátem (10 mmol/l).

Stavu E(PalGPS), tj. maximální kapacity elektron-transportního systému, bylo dosaženo titrací rozpřahovače trifluorocarbonylcyanide fenylhydrazon (FCCP; titrační krok 0,05  $\mu mol/l$ ). Stav E(S), tj. odpojení aktivity komplexu II, byl vyvolán inhibicí komplexu I

rotenonem (0,5  $\mu\text{mol/l}$ ). Zbytková spotřeba kyslíku po inhibici komplexu III (ROX) byla indukována přidáním antimycinu A (2,5  $\mu\text{mol/l}$ ). Aktivita komplexu IV byla stanovena současnou aplikací dihydrochloridu N, N, N', N'-tetramethyl-p-fenylendiaminu (TMPD; 0,5 mmol/l) a askorbátu (2 mmol/l).

**Tabulka 8.** Použitý respirometrický protokol s použitými substráty a objemy pro analýzu respirace plicních fibroblastů

Pořadí	Zkratka	Množství	Název látky	Působení
1	<b>Dig</b>	5 $\mu\text{g/ml}$	Digitonin	Permeabilizace plazmatické membrány
2	<b>M</b>	2 mmol/l	Malát	Substrát přinášející e <sup>-</sup> Komplexu I
	<b>Pal</b>	20 $\mu\text{mol/l}$	Palmitoylkarnitin	Substrát ETF; stav LEAK
3	<b>ADP</b>	5 mmol/l	Adenosindifosfát	Substrát ATP syntázy; stav P(Pal)
4	<b>cyt c</b>	10 $\mu\text{mol/l}$	Cytochrom c	Kontrola integrity vnější mito membrány
5	<b>G</b>	10 mmol/l	Glutamát	Substrát přinášející e <sup>-</sup> Komplexu I; P(PalG)
	<b>P</b>	5 mmol/l	Pyruvát	Substrát přinášející e <sup>-</sup> Komplexu I; P(PalGP)
6	<b>S</b>	10 mmol/l	Sukcinát	Substrát Komplexu II; P(PalGPS)
7	<b>FCCP</b>	titrační krok: 0,05 $\mu\text{mol/l}$	FCCP	Rozpřahovač (protonofor); E(PalGPS)
8	<b>Rot</b>	0,5 $\mu\text{mol/l}$	Rotenon	Inhibitor Komplexu I; stav E(S)
9	<b>AmA</b>	2,5 $\mu\text{mol/l}$	Antimycin A	Inhibitor Komplexu III; stav ROX
10	<b>TMDP</b>	0,5 mmol/l	TMPD	Substrát Komplexu IV; stav CIV
	<b>A</b>	2 mmol/l	Askorbát	Udržuje TMPD v redukováném stavu

Spotřeba kyslíku (OCR) byla analyzována on-line pomocí softwaru DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko), a zobrazována jako záporná časová derivace koncentrace kyslíku v komůrce oxygrafu.

Hodnota OCR je vyjádřena v pmol O<sub>2</sub>/(10<sup>6</sup> buněk) a korigovaná na zbytkovou spotřebu kyslíku (ROX), chemické a přístrojové pozadí.

## 8.5 Hodnocení dat a statistické zpracování

Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  SD. Statistické rozdíly byly analyzovány pomocí software OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA, 2017). Po testování normality rozložení a homogenity rozptylu byla podle vhodnosti provedena srovnání dat pomocí Studentova T-testu nebo Mann-Whitneyho U-testu. Výsledky byly považovány za statisticky významně odlišné, pokud byla výsledná p-hodnota nižší než 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 9. VÝSLEDKY

### 9.1 Mikrohyperbarická komůrka uHBK

#### Použitelnost pro buněčné experimenty

Buňky v mikrohyperbarické komůrce je možné bez problémů kultivovat. Komůrka je využitelná pro *in vitro* experimenty s nejrůznějším složením atmosféry za normálních i hyperbarických podmínek (normoxie, hypoxie, hyperoxie, normokapnie, hypokapnie, hyperkapnie) a při různých hodnotách vnitřní teploty. V průběhu přípravy buněčného materiálu pro hodnocení vlivu intermitentní expozice HFL1 nedošlo u mikrohyperbarické komůrky uHBK 2 k žádným technickým závadám ani provozním potížím.

Hyperbarická komůrka uHBK 1 byla úspěšně využita při studiu zvýšené účinnosti fotodynamické terapie (FDT) při použití HBO expozice na buněčných kulturách (Bajgar et al. 2014).

#### Patentová ochrana

Nová technologie mikrohyperbarických komůrek je úspěšně chráněna národním (CZ) patentem ÚPV pod číslem 305989 a názvem „Mobilní hyperbarická minikomora“. Původci: Kolářová, Bajgar, Tománková, Bolek L, Dejmek, Bolek M, Růžička, Beneš. Patent byl publikovaný dne 27. 4. 2016. (Zastoupení – Patentová kancelář Ing. Petr Soukup, Olomouc).

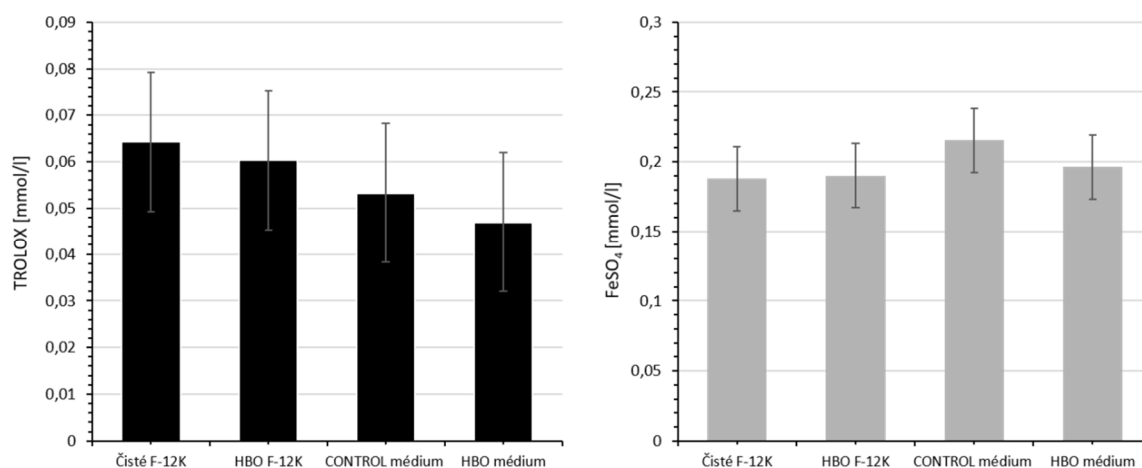


## 9.2 Intermitentní expozice HBO

Cílem provedených experimentů bylo zhodnotit vybranými metodami vliv intermitentní hyperbarické hyperoxie (HBO) na buněčnou linii lidských plicních fibroblastů HFL1 a posoudit změny buněčné morfologie, viability, hustoty, mitochondriální struktury a spotřeby kyslíku HFL1 ve vztahu k buněčné antioxidační kapacitě.

### Antioxidační kapacita média

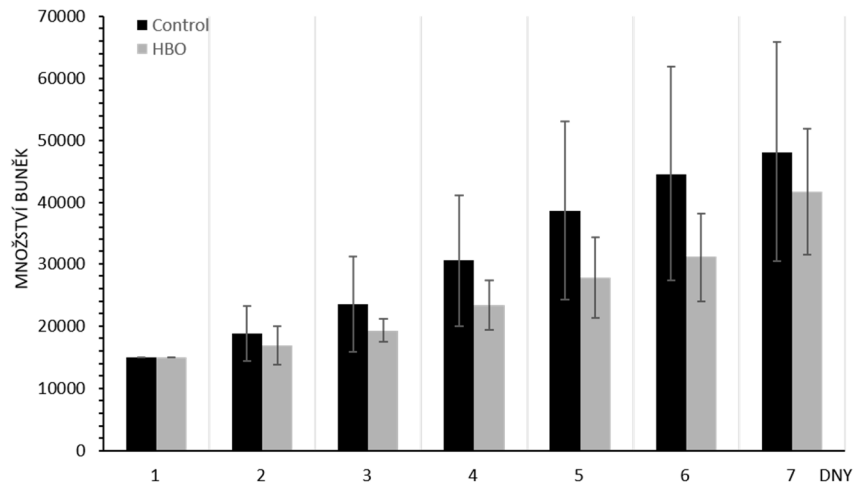
Antioxidační kapacita kultivačního média byla stanovena spektrofotometrickými metodami TEAC a FRAP. Ani jedna metoda nezjistila žádný statisticky významný rozdíl mezi médiem čistým, médiem exponovaným v HBO, médiem z buněčných kultur odebraném po 6 dnech inkubace při HBO podmínkách a médiem odebraným z kontrolních buněk (graf 2).



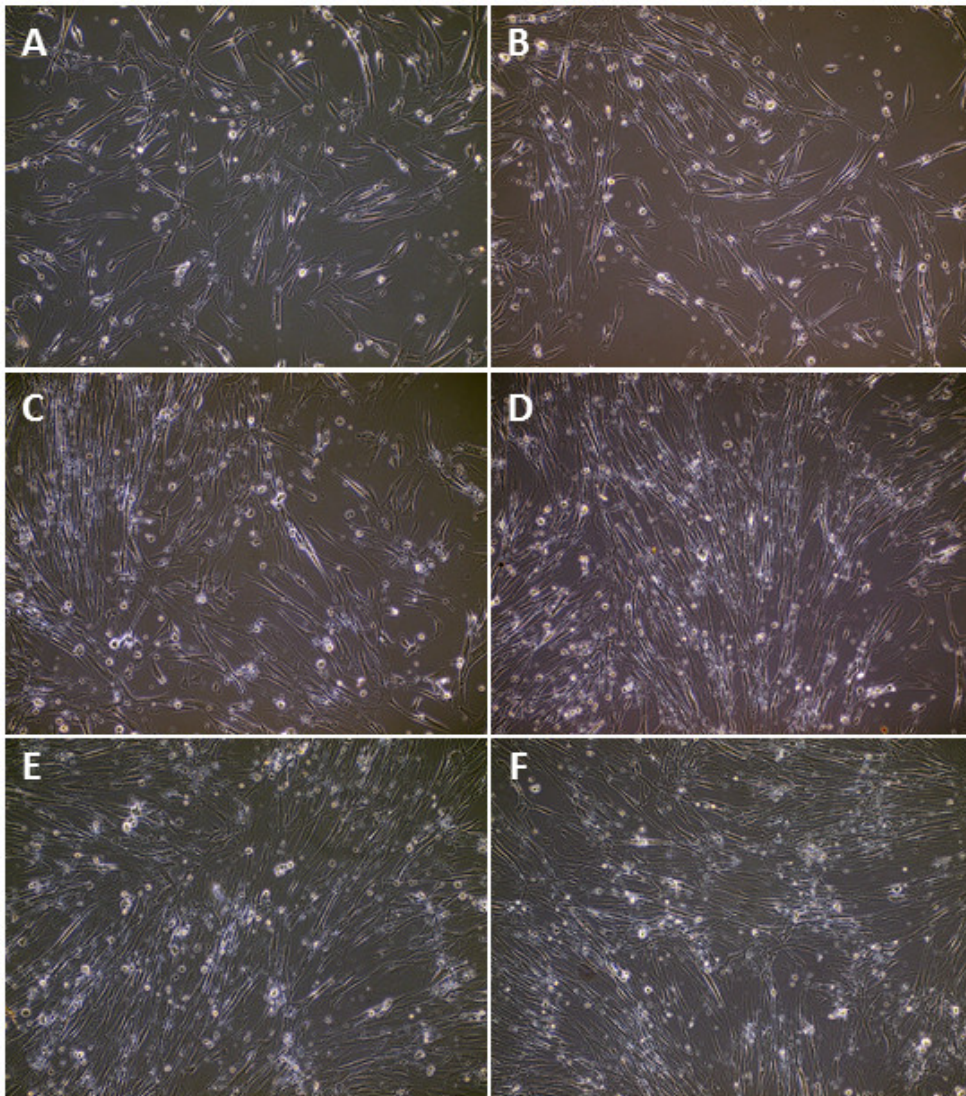
**Graf 2.** Porovnání antioxidační kapacity hodnocených kultivačních médií (TEAC, FRAP).

### Hodnocení růstu buněk

Buňky vystavené intermitentní HBO expozici vykazovaly tendenci k pomalejšímu růstu, počet buněk se však významně nelišil od kontrolních buněk (graf 3). Ani vizuální porovnání charakteru růstu HBO a kontrolní linie nevykazovaly viditelné změny (obrázek 16).



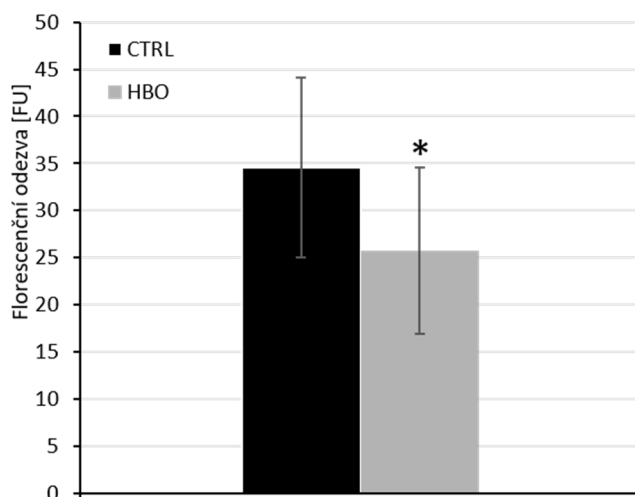
**Graf 3.** Hodnocení růstu buněk HFL1. Rychlost růstu vyjádřená počtem buněk na 1 ml se mezi kontrolní linií a HBO exponovanými fibroblasty nelišila.



**Obrázek 16.** Porovnání charakteru růstu buněčné linie HFL1 v průběhu kultivace. A, C, E - buňky exponované HBO ve dnech 0 (A), 3 (C) a 5 (E); B, D, F - neexponované kontrolní buňky ve dnech 0 (B), 3 (D) a 5 (F).

## Buněčná viabilita

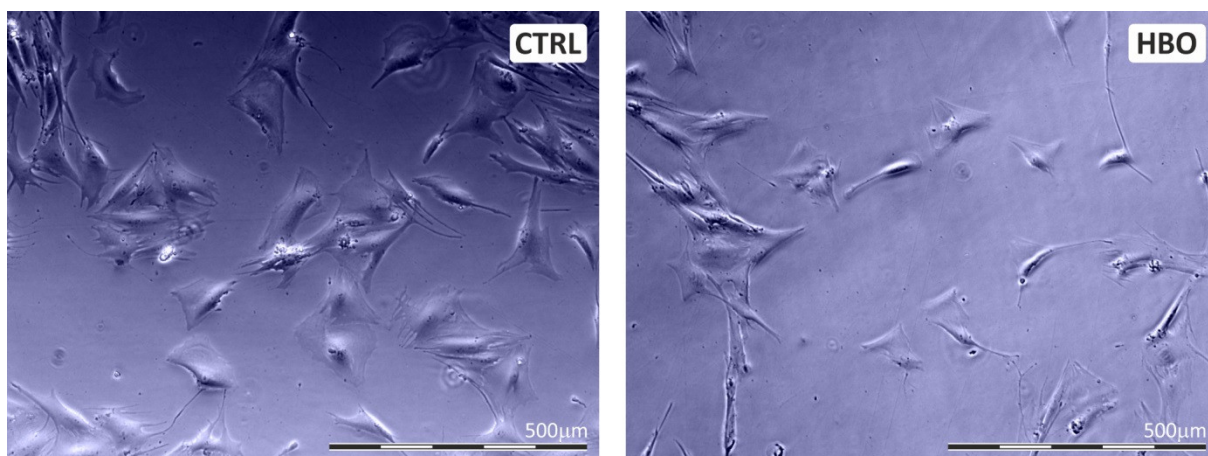
Životaschopnost buněk stanovená činidlem PrestoBlue® je vyjádřena ve fluorescenčních jednotkách (FU). HFL1 buňky vystavené intermitentní HBO vykazovaly signifikantně nižší hodnotu signálu ( $25,77 \pm 8,84$  FU) ve srovnání s kontrolními buňkami ( $34,56 \pm 9,59$  FU). Vyšší hodnoty fluorescence korelují s větší celkovou metabolickou aktivitou a viabilitou buněk ( $p < 0,001$ ).



**Graf 4.** Buněčná viabilita - fluorescenční odezva činidla PrestoBlue®.

## Hodnocení změn buněčné morfologie

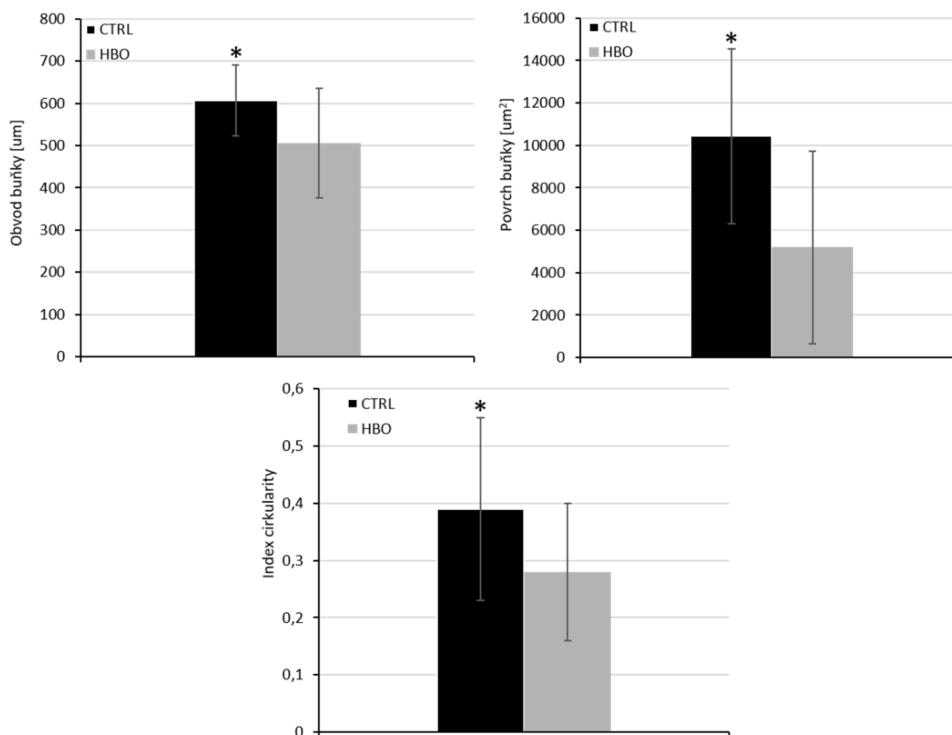
Mikroskopie ve fázovém kontrastu ukázala některé rozdíly v morfologii buněk mezi kontrolní a HBO skupinou (obrázek 17).



**Obrázek 17.** Fázově kontrastní mikroskopie lidských fibroblastů HFL1 podrobené kontrolním (CTRL) nebo hyperbarickým (HBO) podmínkám při zvětšení 60 $\times$ .

Všechny fibroblasty měly mesenchymální morfologii vřetenovitého tvaru, nicméně kontrolní buňky zabíraly významně větší plochu ( $10\,432 \pm 4\,119 \mu\text{m}^2$  vs.  $5\,199 \pm 1\,863 \mu\text{m}^2$

u buněk exponovaných HBO,  $p < 0,001$ ), měly větší obvod ( $606 \pm 84 \mu\text{m}$  vs.  $506 \pm 130 \mu\text{m}$  u buněk po HBO,  $p < 0,001$ ) a vykazovaly mírně, avšak podstatně vyšší indexy cirkularity než HBO buňky ( $0,39 \pm 0,16$  vs.  $0,28 \pm 0,12$ ; kontrola vs. HBO;  $p < 0,001$ ). Porovnání je zobrazeno v grafu 5.



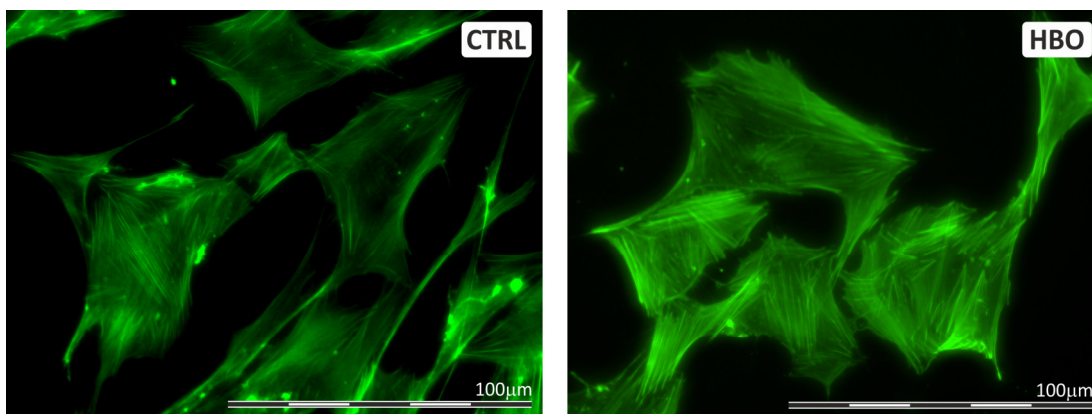
**Graf 5.** Porovnání povrchu, obvodu a indexu cirkularity ovlivněných a kontrolních HFL1.

### Imunofluorescenční hodnocení

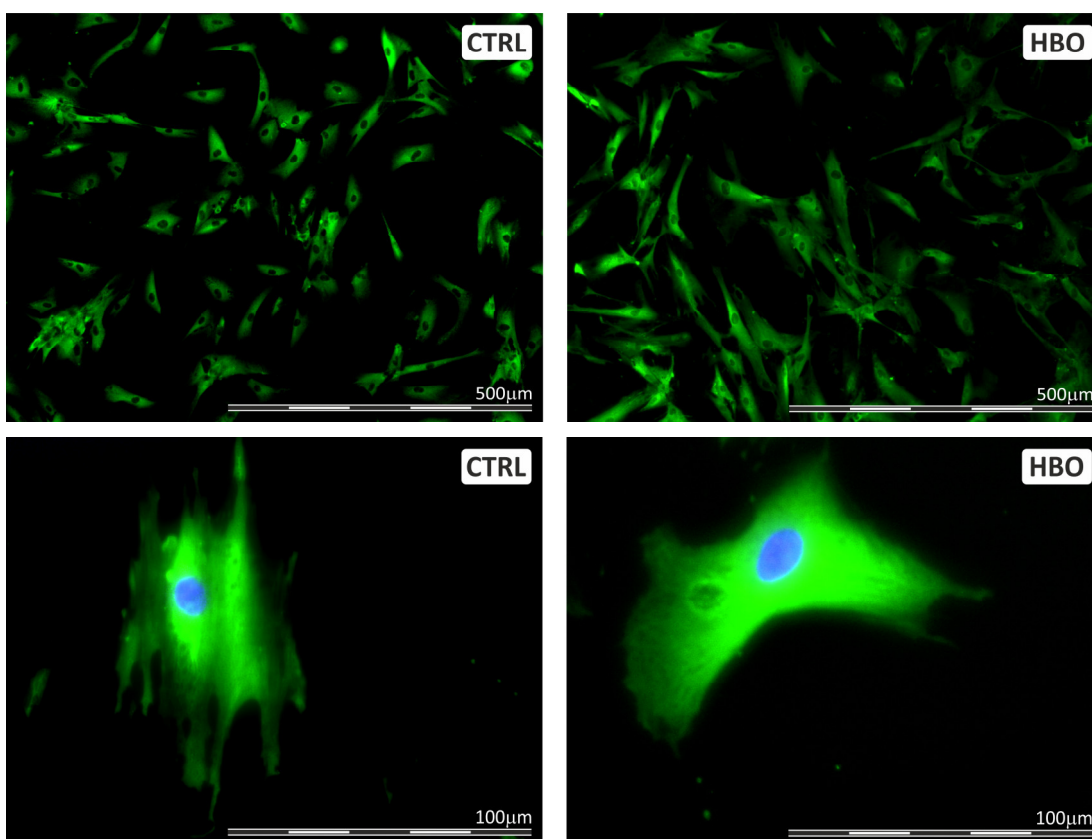
Pro porovnání morfologie cytoskeletu byly fibroblasty označeny speciálními protilátkami (vimentin a vinkulin) a aktinovým značením s TRITC-konjugovaným phalloidinem. Analýza cytoskeletu ukázala, že obě skupiny buněk mají mesenchymální morfologii bez viditelných rozdílů (obrázek 18).

HBO i kontrolní buňky exprimovaly vinkulin-positivní fokální adheze rozmístěné rovnoměrně na celém povrchu. Fibroblasty exponované HBO však vykazovaly menší plochu adheze oproti kontrolním buňkám, což odpovídá výsledkům kvantifikace buněčného povrchu. Jádra obou skupin buněk měla převážně elipsoidní tvar a většina z nich byla lokalizována centrálně (obrázek 19).

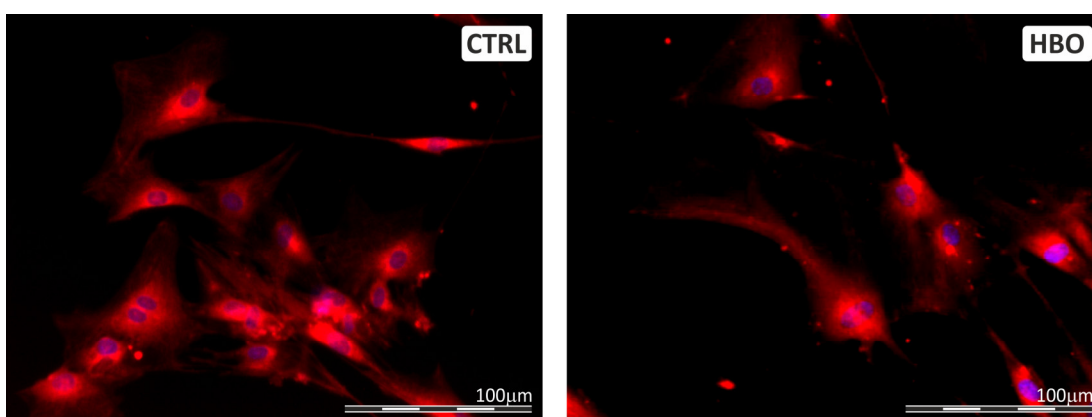
Výsledky kvalitativní mitochondriální analýzy pomocí fluorescenčního značení MitoTracker neukázaly mezi HBO a kontrolními fibroblasty žádné zjevné rozdíly v množství, lokalizaci mitochondrií nebo struktuře mitochondriálních sítí. Všechny buňky měly více organel lokalizovaných v okolí jádra (obrázek 20).



**Obrázek 18.** Fluorescenční barvení aktinových vláken cytoskeletární struktury (200x).



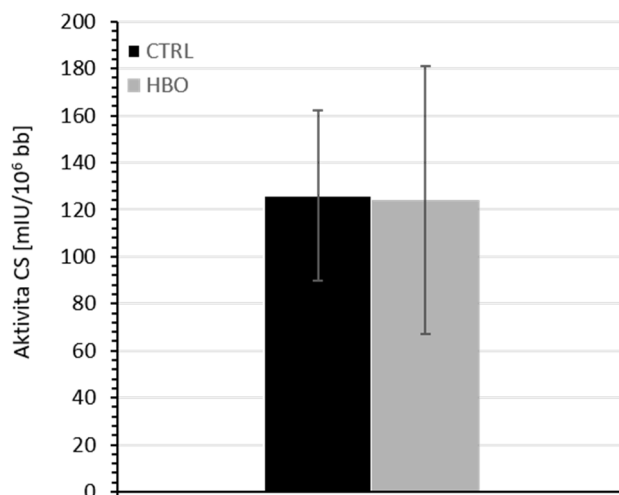
**Obrázek 19.** Fluorescenční barvení fokálních adhezí vinkulinem (60x) a vimentinem (200x).



**Obrázek 20.** Fluorescenční barvení mitochondriální sítě MitoTracker (160x).

### Aktivita citrát syntázy (CS)

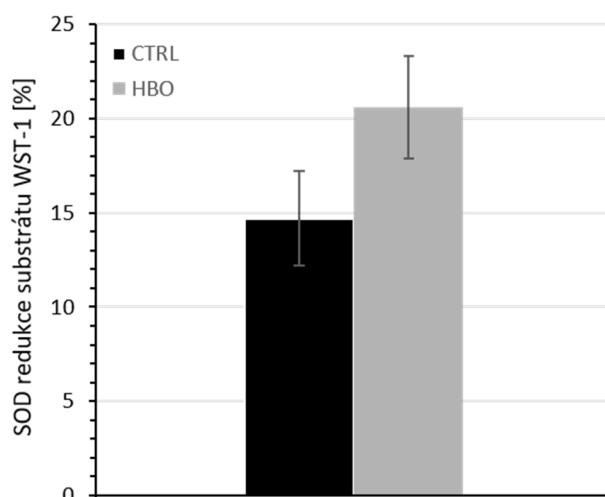
Aktivita citrát syntázy (CS) u kontrolních fibroblastů vykazovala hodnotu  $126 \pm 36$  mU/( $10^6$  buněk). U buněk ovlivněných intermitentní expozicí HBO byla hodnota  $124 \pm 5$  mU/( $10^6$  buněk). Porovnání výsledků naznačuje, že HBO nijak významně neovlivňuje množství mitochondrií v buňkách HFL1 ani aktivitu CS.



**Graf 6.** Porovnání aktivity citrát syntázy u HBO a kontrolních buněk.

### Aktivita superoxid dismutázy (SOD)

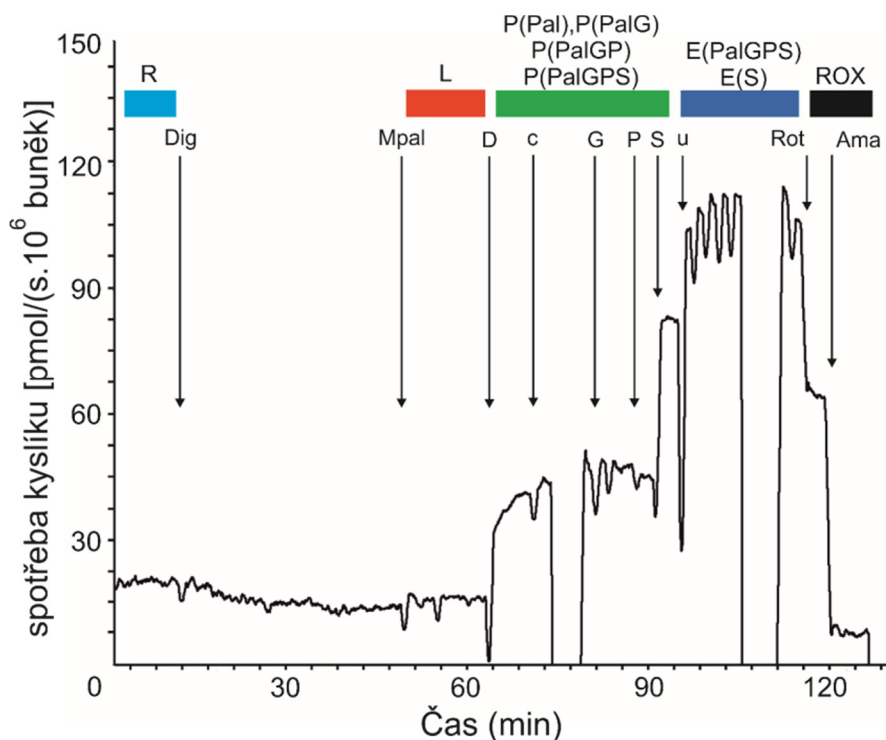
Aktivita SOD, vyjádřená jako míra inhibice redukce testovaného substrátu WST-1, byla signifikantně vyšší u buněk HBO ( $20,6 \pm 2,7$  %) ve srovnání s kontrolami ( $14,7 \pm 2,5$  %);  $p < 0,001$ ).



**Graf 7.** Porovnání aktivity SOD u HBO a kontrolních buněk.

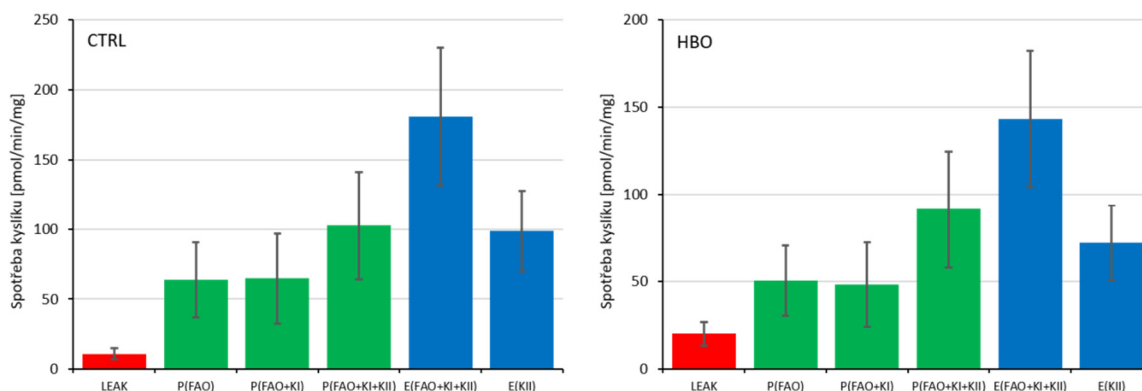
### 9.3 Mitochondriální respirometrie (HRR)

Mitochondriální respirace hodnotí respirační stavy sledovaných buněk. Tyto respirační stavy popisující aktuální spřažení/rozpřažení oxidativní fosforylace ROUT, LEAK, OXPHOS a ETS (Pesta a Gnaiger 2012). Příklad titračního protokolu s průběhem spotřeby kyslíku v permeabilizovaných kontrolních buňkách HFL1 je znázorněn v grafu 8.



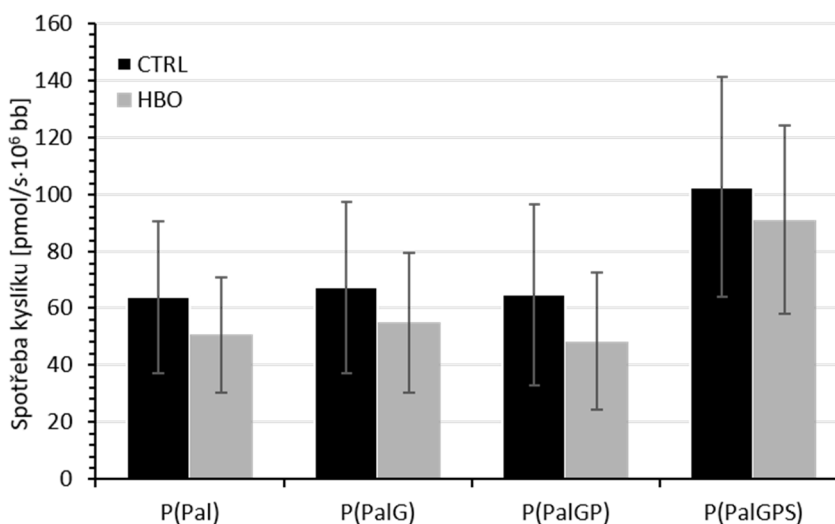
**Graf 8.** Příklad titračního protokolu substrátů-rozpřahovačů pro kontrolní HFL1 buňky se substráty pro elektron-transferující flavoprotein (ETF), Komplex I a Komplex II. Černá křivka = spotřeba kyslíku vyjádřená na  $10^6$  kontrolních buněk. Substráty: Dig = digitonin, M = malát, Pal = palmitoylkarnitin, D = ADP, c = cytochrom c, G = glutamát, P = pyruvát, S = sukcinát, u = FCCP, Rot = rotenon, Ama = antimycin A.

Spotřeba kyslíku ve stavu ROUTINE (ROUT) HFL1 fibroblastů exponovaných intermitentní expozicí HBO měla hodnotu  $35,0 \pm 13,5$  pmol/(s ·  $10^6$  buněk) a nijak významně se nelišila od naměřené hodnoty  $31,6 \pm 8,5$  pmol/(s ·  $10^6$  buněk) intaktních kontrol. Hodnota stavu LEAK, změřená po permeabilizaci mitochondriální membrány digitoninem (Dig) za přítomnosti malátu (M) a palmitoylkarnitinu (Pal), byla u HBO exponovaných buněk signifikantně vyšší, tj.  $20,2 \pm 6,9$  pmol/(s ·  $10^6$  buněk) ve srovnání s kontrolními fibroblasty, u kterých byla zjištěna hodnota  $10,9 \pm 4,0$  pmol/(s ·  $10^6$  buněk);  $p < 0,001$ . Průměrné hodnoty měřených respiračních stavů kontrolních a HBO fibroblastů HFL1 zobrazuje graf 9.



**Graf 9.** Průměrné hodnoty měřených respiračních stavů kontrolních a HBO fibroblastů HFL1. Stavů jsou označeny podle metabolizovaných substrátů a zapojených respiračních komplexů.

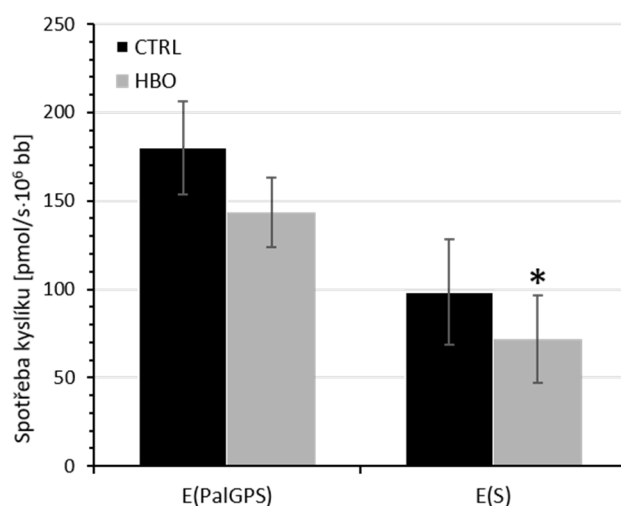
Respirační stavy OXPHOS P(Pal), P(PalG), P(PalGP), a P(PalGPS) nebyly HBO expozicí významně ovlivněny. Změřené výsledky těchto respiračních stavů kontrolních a HBO fibroblastů HFL1 zobrazuje graf 10.



**Graf 10.** Mitochondriální dýchání - fosforylační (P (Pal)) spotřeba kyslíku po přidání substrátů Pal (komplexu I), G, P (substráty dodávají elektrony komplexu I).

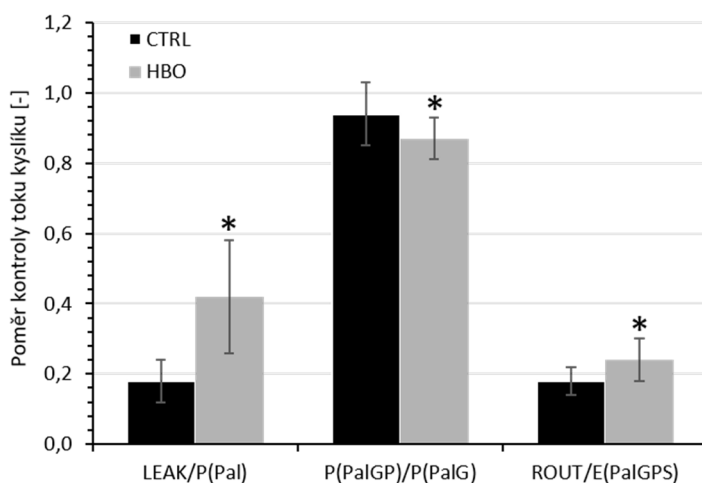
Hodnota stavu ETS E(PalGPS) nebyla HBO expozicí významně ovlivněna, nicméně hodnota stavu E(S), tj. mitochondriální elektron-transportní kapacita po inhibici komplexu I rotenonem (Rot), byla u HBO fibroblastů významně nižší:  $72,0 \pm 21,4$  pmol/(s · 10<sup>6</sup> buněk) ve srovnání s hodnotou  $98,6 \pm 29,1$  pmol/(s · 10<sup>6</sup> buněk) u kontrolních buněk ( $p < 0,05$ ). Změřené výsledky těchto respiračních stavů kontrolních a HBO fibroblastů HFL1 zobrazuje graf 11.





**Graf 11.** Mitochondriální dýchání – maximální kapacita ETS E(PalGPS) po titraci FCCP, E(S) reprezentuje kapacitu ETS komplexu II po inhibici komplexu I rotenonem.

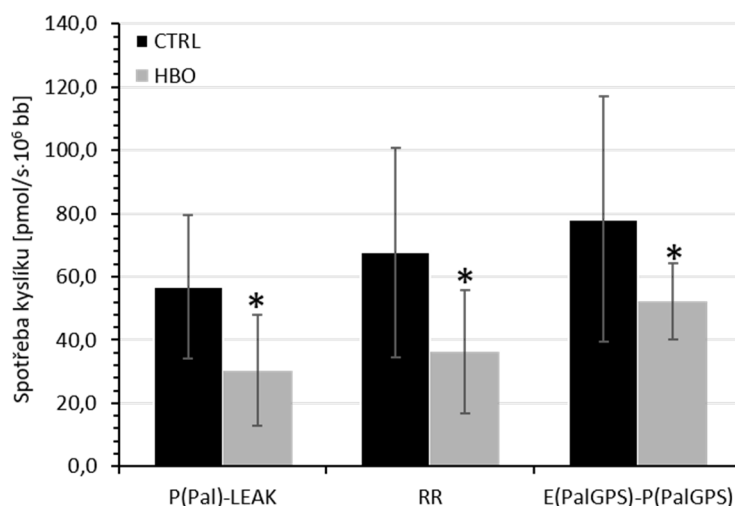
Porovnáním hodnot poměrů spotřeby kyslíku v průběhu mitochondriální respirace po ovlivnění jednotlivými substráty a inhibitory LEAK/P(Pal), P(PalGP)/P(PalG) a ROUT/E(PalGPS) lze zjistit relativní účinnost těchto intervencí. Index rozpřážení oxidace a fosforylace (tj. poměr LEAK/P(Pal)) byl u fibroblastů vystavených HBO signifikantně zvýšený ( $0,42 \pm 0,16$ ) ve srovnání s kontrolními buňkami ( $0,18 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ ). Mezi HBO a kontrolními fibroblasty jsou u těchto intervencí významné rozdíly (graf 12).



**Graf 12.** Mitochondriální respirace - poměry kontroly spotřeby kyslíku ukazují index rozpřážení LEAK/P(Pal), účinek na OXPPOS po přidání substrátu pyruvátu v poměru k předchozímu stavu (P(PalGP)/P(PalG)) a poměr základní a maximální možné spotřeby kyslíku vyjádřené jako ROUT/E(PalGPS).

Kapacita mitochondriální produkce ATP prostřednictvím metabolismu mastných kyselin je u HBO buněk pravděpodobně snížena. Tomu odpovídá rozdíl stavů OXPPOS (P(Pal)) a LEAK, který byl u HBO buněk významně nižší ( $30,4 \pm 17,5$  pmol/(s · 10<sup>6</sup> buněk)) oproti kontrolním fibroblastům ( $56,8 \pm 22,8$  pmol/(s · 10<sup>6</sup> buněk)),  $p < 0,05$ ; Graf 13).

Respirační rezerva (RR) stanovená jako rozdíl mezi maximálním spřaženým respiračním výkonem, ROUT a LEAK dýcháním ( $RR = P(\text{PalGPS}) - \text{ROUT} - \text{LEAK}$ ) odpovídá spotřebě kyslíku, kterou buňka může teoreticky využít k syntéze ATP v případě potřeby. RR byla v buňkách vystavených HBO signifikantně nižší ( $36,2 \pm 19,6 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ buněk})$ ) ve srovnání s kontrolními fibroblasty ( $67,7 \pm 33,3 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ buněk})$ );  $p < 0,01$ ; Graf 13).



**Graf 1.** Mitochondriální respirace - spotřeba kyslíku související s produkcí ATP (P(Pal)-LEAK), respirační rezerva (RR) a rezervní kapacita (E(PalGPS)-P(PalGPS)).

Přestože se celková spotřeba kyslíku pro fosforylaci P(PalGPS) a přenos elektronů E(PalGPS) mezi HBO a kontrolními fibroblasty významně nelišila (viz graf 10 a 11), rezervní kapacita, stanovená jako rozdíl mezi stavy E(PalGPS) a P(PalGPS), byla u buněk HBO významně nižší, což naznačuje omezení kapacity elektrontransportního systému.

V tabulce 9 jsou shrnuty výsledné statisticky zpracované měřené respirační stavy kontrolních a HBO plicních fibroblastů.

**Tabulka 9.** Hodnoty změřených respiračních stavů kontrolních a HBO fibroblastů

Respirační STAVY	CTRL	SD	HBO	SD	jednotky	
ROUT	31,6	8,5	35	13,5	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]	
LEAK	10,9	4	20,2	6,9	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]	
OXPHOS	P(Pal)	63,8	26,8	50,6	20,1	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]
	P(PalG)	67,4	30,3	54,9	24,6	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]
	P(PalGP)	64,7	32,0	48,3	24,1	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]
	P(PalGPS)	102,6	38,6	91,3	33,2	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]
ETS	E(PalGPS)	180,8	49,5	143,5	39,0	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]
	E(S)	98,6	29,1	72	21,4	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]
LEAK/P(Pal)	0,18	0,06	0,42	0,16	[-]	
P(PalGP)/P(PalG)	0,94	0,09	0,87	0,06	[-]	
ROUT/E(PalGPS)	0,18	0,04	0,24	0,06	[-]	
P(Pal)-LEAK	56,8	22,8	30,4	17,5	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]	
RR	67,7	33,2	36,2	19,6	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]	
E(PalGPS)-P(PalGPS)	78,2	38,7	52,3	12,1	[pmol/s · 10 <sup>6</sup> bb]	

## 10. DISKUZE

### 10.1 Mikrohyperbarická komůrka uHBK

Mikrohyperbarické komůrky uHBK 1 a uHBK 2 byly úspěšně otestovány provedenými experimenty. Jejich užité vlastnosti byly popsány výše. Nejbližší konkurenční technologie je hyperbarická komora HAUX TESTCOM 350/10. Porovnání a technologické výhody uHBK jsou shrnuty v následujícím srovnání.

TESTCOM váží cca 50 kg. Hmotnost uHBK komůrek je nižší, váží 9 kg a 24 kg, což zvyšuje jejich mobilitu. Materiál použitý na výrobu TESTCOM je železo, uHBK 1 je vyrobena z chemicky odolné slitiny hliníku a uHBK 2 z nerezové oceli, což snižuje riziko koroze. Objem TESTCOM je cca 20 l, uHBK 1 a 2 má užité objem 3 l, resp. 6,5 l. Mají tedy menší rozměry, zabírají méně místa, při experimentech mají menší spotřebu pracovních plynů a díky malému objemu a integrované temperaci pláště jsou schopné snáze a rychleji dosáhnout požadovaných hodnot teploty vnitřních prostor. Tuto vlastnost TESTCOM nemá. Mikrohyperbarická komůrka uHBK 2 má integrované magnetické míchací zařízení a disponuje průzory z PMMA, které lze použít pro osvětlování, magnetickou manipulaci ve vnitřních prostorech a pozorování průběhu experimentů. Obě komůrky jsou vybavené elektronickým měřením teploty, regulovatelným osvětlením a řízenou cirkulací vnitřní atmosféry. Oproti konkurenci disponuje uHBK 2 dotykovým elektronickým panelem umožňujícím nezávislé elektrické měření a zobrazování 3 teplot, měření a zobrazování tlaku a změny tlaku v čase, ovládat vnitřní osvětlení a cirkulaci vnitřní atmosféry. Zároveň umožňuje ukládání dat na SD paměťovou kartu nebo přes USB port do počítače. Komora TESTCOM není elektronikou vybavena vůbec. Komůrky uHBK mají minimálně jeden regulovaný vstup plynu s jemným krokem nastavení (uHBK 2 má 2 nezávislé vstupy) a zároveň regulovaný výstup plynu z tělesa komůrky a lze tedy regulovat tlakový gradient při náběhu a konci experimentů.

Z výsledků lze konstatovat, že se podařilo při vývoji technologie uHBK integrovat užité vlastnosti, které lze snadno, bezpečně a opakovatelně využívat pro přípravu ovlivněných buněčných linií při různých odlišných fyzikálních podmínkách a složení okolní atmosféry.

## 10.2 Vliv intermitentní expozice HBO na HFL1

Cílem provedeného výzkumu bylo zhodnotit účinky intermitentní expozice HBO na lidské plicní fibroblasty (HFL1). Hodnocení zahrnovalo využití kvalitativních a kvantitativních metod spolu s mitochondriální respirometrií (HRR) se zaměřením na vybrané parametry mitochondriální spotřeby kyslíku. Dle provedené rešerše dostupné literatury a publikací nebyla zatím tato metoda hodnocení HBO vlivu použita, interpretace získaných výsledků je komplikovaná.

Mitochondriální respirační stav LEAK charakterizuje spotřebu kyslíku ovlivněnou mitochondriální kompenzací úniku protonů a skluzu elektronů a protonů (Gnaiger 2014). Odráží také účinnost spřažení mitochondriálních respiračních stavů a produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Jastroch et al. 2010) a může představovat až 38 % bazálního metabolismu savců (Brand et al. 1994). Superoxidový anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) je primární ROS vzniklý v elektronovém transportním řetězci zejména díky úniku elektronů při jejich přenosu na molekuly kyslíku (Jastroch et al. 2010). Superoxid vzniká převážně v rámci respiračních komplexů I a III. Hlavní antioxidační obranný systém, superoxid dismutáza (SOD) jej převádí na peroxid vodíku (Fukai a Ushio-Fukai 2011). V literatuře je dobře zdokumentován fakt, že se během hyperbarické oxygenoterapie produkce ROS zvyšuje, nicméně oxidační citlivost se mění s typem buňky, parametry terapie HBO a počtem expozic (Jang et al. 2018; Korkmaz et al. 2008; Simsek et al. 2011). U klinických studií je o aktivitě SOD u pacientů léčených HBO uváděno naměřené zvýšení její aktivity souběžně se zvýšenou produkcí ROS a markery oxidativního stresu (Simsek et al. 2011), případně studie uvádí, že SOD kompenzuje oxidační poškození (Sun et al. 2017).

Ačkoliv se počet HBO a kontrolních buněk významně nelišil, parametry kvantifikující celkovou morfologii buněk jako plocha, obvod a kruhovitost byly u HBO exponovaných buněk významně nižší než u kontrol. Dokonce i v testu buněčné viability stanovené PrestoBlue® vykazovaly HBO exponované buňky snížený fluorescenční signál, tedy celkově menší buněčnou plochu.

U obou typů buněk bylo fluorescenční mikroskopií zobrazené obdobné množství mitochondrií a struktury mitochondriálních sítí, avšak test kvantifikující životaschopnost pomocí redukce nefluorescenčního resazurinu na fluorescenční resorufin mitochondriálními a cytoplazmatickými enzymy (Zalata et al. 1998) naznačoval narušený buněčný metabolismus buněk exponovaných HBO. Aktivita citrát syntázy (CS) byla u HBO a kontrolních buněk téměř

shodná, nicméně u buněk vystavených HBO byla detekovaná zvýšená aktivita SOD, pravděpodobně způsobená kompenzací oxidačního poškození (Sun et al. 2017).

Celková antioxidační kapacita (TAC) použitých kultivačních médií byla stanovena metodami FRAP a TEAC. Ani jedna metoda nezjistila žádný statisticky významný rozdíl mezi čerstvým médiem, HBO exponovaným médiem, médiem z buněčných kultur po 5 dnech HBO expozice a médiem z kontrolních buněk po stejné době kultivace.

Výsledky analýzy mitochondriální respirace ukazují, že u HFL1 fibroblastů podrobených intermitentní expozici HBO byl zvýšen mitochondriální respirační stav LEAK a index rozpřažení LEAK/P(Pal). Zvýšený respirační stav LEAK může souviset se zvýšenou tvorbou superoxidového aniontu v důsledku vyššího  $pO_2$ . Všechny parametry spojené s potenciální schopností buněk zvýšit spotřebu kyslíku a syntézu ATP, tj. rezervní kapacita (rozdíl  $E(PalGPS) - P(PalGPS)$ ), respirační rezerva stanovená jako celková kapacita  $P(PalGPS)$  po odečtení ROUT a LEAK respirace a volná kapacita OXPHOS, tj. kapacita  $P(Pal)$  korigovaná o LEAK respiraci (Gnaiger 2014), byly u buněk vystavených působení HBO významně nižší ve srovnání s kontrolními buňkami. Výsledek naznačuje, že HBO exponované fibroblasty mohou mít sníženou metabolickou schopnost při procesech náročných na energii, jako je růst a dělení.

Snížená aktivita komplexu II u HBO exponovaných buněk může být způsobena několika příčinami. Respirační komplex II je jedinou složkou propojující cyklus kyseliny citronové a mitochondriální přenos elektronů. Předpokládá se, že plně spřažený komplex II slouží jako zdroj rezervní respirační kapacity pro případ reakce metabolických sensorů na různé podmínky, jako je AMP-dependentní kináza nebo pyruvátdehydrogenáza (PDH) prostřednictvím mechanismu závislého na sirtuinu-3 (Pfleger et al. 2015). V našich experimentech nebyla aktivita PDH ani její exprese analyzována, nicméně účinek pyruvátu bylo možné použitým HRR protokolem stanovit (SUIT; substrate-uncoupler-inhibitor titration). Na mitochondriální spotřebu kyslíku indukovanou substráty pro ETF a komplex I (malát, palmitoylkarnitin a glutamát) měl pyruvát mírný, ale významný inhibiční účinek, jak patrně z poměru  $P(PalGP)/P(PalG)$ , který byl u buněk exponovaných HBO nižší ve srovnání s kontrolními fibroblasty. Je známo, že aktivita PDH je regulována v závislosti na oxidaci mastných kyselin (Chicco et al. 1991; Kelley et al. 1993; Scholz et al. 1978) a je inhibována PDH kinázami (Pfleger et al. 2015). Bylo zjištěno, že stimulace PDH prostřednictvím dichloracetátové deaktivace kinázy PDH, by mohla významně zvýšit nejen spotřebu kyslíku související s komplexem I, ale i aktivitu komplexu II (Pfleger et al. 2015). Výsledky provedených experimentů naznačují, že podmínky HBO mohou interferovat s regulací

mitochondriální respirace částečnou inhibicí aktivity komplexu II. Bylo také zdokumentováno, že komplex II může modulovat tvorbu superoxidu jinými komplexy elektronového transportního řetězce a jeho aktivita by mohla být inhibována peroxidem vodíku (Drose et al. 2011; Nulton-Persson a Szweda 2001). Při různých patologických stavech by však mohla být inhibice komplexu II zapojena do ochrany proti oxidativnímu stresu (Adebiyi et al. 2008; Jodeiri Farshbaf a Kiani-Esfahani 2017; Wojtovich a Brookes 2009).

Výsledky provedených experimentů naznačují, že u plicních fibroblastů HFL1, vystavených intermitentní expozici HBO, dochází ke snížení efektivní mitochondriální spotřeby kyslíku, projevující se zvýšením respiračního stavu LEAK. Jedná se o kompenzační reakci na zvýšení úniku protonů z mezimembránového prostoru do mitochondriální matrix, sníženou aktivitu komplexu II a sníženou spotřebu kyslíku v souvislosti s produkcí ATP při oxidaci mastných kyselin. Příčinu této mitochondriální dysfunkce indukované HBO je nutné hlouběji prozkoumat. Výsledky však naznačují, že by se mohlo jednat o obrannou reakci buňky proti zvýšenému oxidačnímu stresu.

### 10.3 Další směřování výzkumu

Provedená rešerše publikací a literatury shrnující současný stav základního výzkumu účinků hyperbarické oxygenoterapie (HBO) na buněčné úrovni ukázala, že je nutné mnoho dějů hlouběji prozkoumat.

Velkou výzvou je hledání vhodné antioxidační ochrany při HBO expozicích. Chybí potvrzení pozitivního účinku léčby HBO prokazaného klinickými studiemi na buněčné úrovni. Také chybí standardizace podmínek buněčných kultivací pro přiblížení se k fyziologickým podmínkám v lidském těle (Place et al. 2017) a optimalizace kultivačních roztoků pro toto hyperbarické prostředí.

Na trhu nejsou dostupné nástroje pro měření reálné koncentrace rozpuštěného kyslíku u izolovaných adherentních buněčných linií a není dostatečně prozkoumán fyzikálně chemický mechanismus difuze kyslíku v kultivačních médiích (Place et al. 2017).

Díky technologii uHBK, umožňující provádět přesné a opakovatelné expozice, lze připravit dostatečné množství ovlivněného buněčného materiálu, jehož výzkum by mohl přispět k hlubšímu pochopení reakcí na HBO a pravděpodobně by mohl přinést odpovědi na výše zmíněné otázky.

Ve spojení s metodou HRR bude možné účinek zvýšeného parciálního tlaku kyslíku při HBO na mitochondriální respiraci detailněji prostudovat, protože její vliv na mitochondriální

metabolismus není plně popsán (Jain 2017; Gail 1991). Detailnější výzkum vlivu expozice HBO na metabolickou aktivitu buněk a tkání by mohl přinést nové poznatky užitečné pro vyhodnocení prospěchu a rizik hyperbarické oxygenoterapie u zánětlivých a metabolických onemocnění (Schreml et al. 2010; Al-Waili a Butler 2006; Eltorai et al. 1986).

## 11. ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnotit vliv zvýšené koncentrace kyslíku na buňky a jejich metabolismus. Za tímto účelem bylo nutné vyvinout novou technologii malé hyperbarické komůrky, díky které bylo možné buněčný materiál k posouzení připravit. Hyperbarické komůrky uHBK 1 a uHBK 2 byly navrženy, zkonstruovány a využity pro přípravu buněčného materiálu. Technologie byla poté úspěšně ochráněna národním patentem.

Pro hodnocení vlivu hyperbarického kyslíku byly použity pulmonální fibroblasty HFL1, tedy buňky, které jsou na kyslík velmi citlivé (Han et al. 2018), i když zatím není přesně známo, jaký typ plicních buněk je toxicitou kyslíku ovlivněn nejvíce. V provedených experimentech byly použity intaktní fetální buňky, které nebyly ovlivněny žádnou patologií spojenou s klinickou terapií HBO (například otravou oxidem uhelnatým). Účinky HBO závisí také na věku a typu buněk, které jsou ovlivňovány (Gomez et al. 2012; Tolentino et al. 2006).

Za normoxické podmínky je považován parciální tlak kyslíku shodný s atmosférickou hodnotou, nicméně úroveň parciálního tlaku rozpuštěného kyslíku v tkáních je mnohem nižší a pohybuje se kolem 1 až 7 kPa. Pouze plicní tkáň je vystavena zvýšenému, tedy téměř atmosférickému tlaku kyslíku (15 kPa). Tlak kyslíku v buněčné kultuře nebyl stanoven přímým měřením, byl stanoven aproximací založené na  $pO_2$ ,  $pCO_2$  a výšce hladiny kultivačního média. V části práce, zaměřené na rozpustnosti plynů, byl uveden výpočet reálného  $pO_2$  kyslíku v kultivačních inkubátorech a jeho hodnota byla vypočtena na 18,6 kPa (140 mmHg). V prostředí inkubátoru je za normálních podmínek v kultivačním médiu na úrovni adheovaných buněk parciální tlak rozpuštěného kyslíku shodný s fyziologickými hodnotami (Wenger et al. 2015).

Pro hodnocení změn byly vybrány metody, které umožňují kvantitativně i kvalitativně posoudit, zda a v jakém rozsahu jsou buňky těmito podmínkami ovlivněny. Mitochondriální spotřeba kyslíku byla hodnocena metodou high-resolution respirometry (HRR), životaschopnost buněk hodnocena PrestoBlue®, morfologie analyzována rutinní fluorescenční mikroskopií a fázovým kontrastem. Byla zhodnocena aktivita superoxid dismutázy (SOD) a citrát syntázy (CS). HFL1 byly exponovány v HBO prostředí (295 kPa  $O_2$ ; 5 kPa  $CO_2$ ) 2 hodiny denně po dobu 5 po sobě jdoucích dní. Den po poslední HBO expozici vykazovaly buňky podstatně menší plochu a obvod, sníženou životaschopnost a zvýšenou aktivitu SOD. Nebyly zjištěny žádné změny v aktivitě CS ani v kvalitě mitochondriální sítě.



HRR odhalila sníženou mitochondriální spotřebu kyslíku, která se projevila snížením aktivity komplexu II a sníženou spotřebou kyslíku při oxidaci mastných kyselin.

Hodnocení buněčných změn vyvolaných HBO pomocí měření mitochondriální spotřeby kyslíku (HRR) nebylo dle provedené rešerše dostupné literatury a publikací zatím provedeno, jedná se tedy o nový přístup ve studiu účinků HBO.

Uvedené výsledky naznačují, že v podmínkách napodobujících intermitentní expozici HBO trpí plicní fibroblasty zhoršenou mitochondriální respirací spojenou s komplexem II a poruchou buněčného růstu i při zvýšené antioxidační obraně exponovaných buněk. Mechanismus této HBO-indukované mitochondriální dysfunkce je nutné v budoucnu dalším výzkumem hlouběji prozkoumat, stejně jako se zaměřit na hledání účinného způsobu další antioxidační ochrany.

## 12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADEBIYI, Adebowale, Elizabeth M MCNALLY a Jonathan H JAGGAR, 2008. Sulfonylurea receptor-dependent and -independent pathways mediate vasodilation induced by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers. *Molecular pharmacology* [online]. B.m.: American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, **74**(3), 736–43 [vid. 2018-05-06]. ISSN 1521-0111. Dostupné z: doi:10.1124/mol.108.048165
- AHMAD, Shama, Carl W. WHITE, L Y CHANG, Barbara K. SCHNEIDER a Corrie B. ALLEN, 2001. Glutamine protects mitochondrial structure and function in oxygen toxicity. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* [online]. **280**(4), L779-91 [vid. 2018-10-13]. ISSN 1040-0605. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.2001.280.4.L779
- AL-WAILI, Noori S a Glenn J BUTLER, 2006. *Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action*. [online]. 3. duben 2006. B.m.: Hindawi. [vid. 2018-10-12]. ISBN 1537-744X (Electronic)r1537-744X (Linking). Dostupné z: doi:10.1100/tsw.2006.78
- AL-WAILI, Noori S, Glenn J BUTLER, Jorge BEALE, Mahdi S ABDULLAH, R. W. Bill HAMILTON, Boke Y LEE, Paul LUCUS, Michael W. ALLEN, Richard L PETRILLO, Zev CARREY a Michael FINKELSTEIN, 2005. *Hyperbaric oxygen in the treatment of patients with cerebral stroke, brain trauma, and neurologic disease* [online]. 2005. [vid. 2018-08-07]. ISBN 0741-238X (Print)r0741-238X (Linking). Dostupné z: doi:10.1007/BF02849960
- AMBIRU, Satoshi, Nobuaki FURUYAMA, Mitsuo AONO, Fumio KIMURA, Hiroaki SHIMIZU, Hiroyuki YOSHIDOME, Masaru MIYAZAKI, Hideaki SHIMADA a Takenori OCHIAI, 2007. Hyperbaric oxygen therapy for the treatment of postoperative paralytic ileus and adhesive intestinal obstruction associated with abdominal surgery: Experience with 626 patients. *Hepato-Gastroenterology* [online]. **54**(79), 1925–1929 [vid. 2018-10-12]. ISSN 01726390. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18251130
- AY, Hakan, Turgut TOPAL, Bülent UYSAL, Mehmet ÖZLER, Sükrü ÖTER, Ahmet KORKMAZ a Kadir DÜNDAR, 2007. Time-dependent course of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects in rat lung and erythrocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [online]. **34**(8), 787–791 [vid. 2018-07-21]. ISSN 03051870. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04645.x
- BAJGAR, Robert, Hana KOLAROVA, Lukas BOLEK, Svatopluk BINDER, Klara PIZOVA a Adela HANAKOVA, 2014. High oxygen partial pressure increases photodynamic effect on HeLa cell lines in the presence of chloraluminium phthalocyanine. *Anticancer research* [online]. **34**(8), 4095–9 [vid. 2018-10-12]. ISSN 1791-7530. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075034
- BARCAL, Rudolf, Milada EMMEROVÁ a Milan HADRAVSKÝ, 2000. *Hyperbarie a Hyperbarická oxygenoterapie*. 1. vyd. Plzeň: Vydavatelství V. Kuna. ISBN 80-902017-7-6.
- BENSON, R M, L M MINTER, B A OSBORNE a E V GRANOWITZ, 2003. Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clinical and experimental immunology* [online]. B.m.: Wiley-Blackwell, **134**(1), 57–62 [vid. 2018-11-17]. ISSN 0009-9104. Dostupné z: doi:10.1046/J.1365-2249.2003.02248.X
- BENZIE, Iris F.F. a J.J. STRAIN, 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* [online]. **239**(1), 70–76 [vid. 2018-09-02]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1996.0292
- BITTERMAN, Haim, 2009. Bench-to-bedside review: Oxygen as a drug. *Critical Care* [online]. **13**(1), 205 [vid. 2018-10-12]. ISSN 1364-8535. Dostupné z: doi:10.1186/cc7151
- BITTERMAN, Noemi a Ariel BONEN, 2016. Design and Human Factors of Therapeutic Hyperbaric Chambers. *Aerospace Medicine and Human Performance* [online]. **87**(4), 397–405 [vid. 2018-10-12]. ISSN 23756314. Dostupné z: doi:10.3357/AMHP.4500.2016
- BOEREMA, I, N G MEYNE, W H BRUMMELKAMP, S BOUMA, M H MENSCH, F KAMERMANS, M STERN HANF a VAN AALDEREN, 1960. Life without blood. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*

- [online]. **104**, 949–954 [vid. 2018-10-12]. ISSN 0028-2162. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13802034>
- BORAB, Zachary, Michael D. MIRMANESH, Madeleine GANTZ, Alessandro CUSANO a Lee L.Q. PU, 2017. *Systematic review of hyperbaric oxygen therapy for the treatment of radiation-induced skin necrosis* [online]. duben 2017. [vid. 2018-05-06]. ISSN 18780539. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bjps.2016.11.024](https://doi.org/10.1016/j.bjps.2016.11.024)
- BRAND, Martin D, Lee Feng CHIEN, Edward K AINSCOW, David F S ROLFE a Richard K PORTER, 1994. *The causes and functions of mitochondrial proton leak* [online]. 30. srpen 1994. [vid. 2018-05-06]. ISBN 0005-2728. Dostupné z: [doi:10.1016/0005-2728\(94\)90099-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90099-X)
- BRUGNIAUX, Julien Vincent, Geoff B COOMBS, Otto F BARAK, Zeljko DUJIC, Mypinder S SEKHON a Philip N AINSLIE, 2018. Highs and lows of hyperoxia: physiological, performance, and clinical aspects. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* [online]. **315**(1), R1–R27 [vid. 2018-12-06]. ISSN 1522-1490. Dostupné z: [doi:10.1152/ajpregu.00165.2017](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00165.2017)
- BUCKLEY, Nick A, David N JUURLINK, Geoff ISBISTER, Michael H BENNETT a Eric J LAVONAS, 2011. Hyperbaric oxygen for carbon monoxide poisoning. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. (4), CD002041 [vid. 2018-07-21]. ISSN 14651858. Dostupné z: [doi:10.1002/14651858.CD002041.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD002041.pub3)
- CARREAU, Aude, Bouchra El HAFNY-RAHBI, Agata MATEJUK, Catherine GRILLON a Claudine KIEDA, 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. **15**(6), 1239–1253 [vid. 2018-12-06]. ISSN 15821838. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x)
- ČERNOCH, Svatopluk, 1968. *Strojně technická příručka 1*. 12. vyd. Praha: SNTL.
- CHICCO, A, R GUTMAN a Y B LOMBARDO, 1991. Biochemical abnormalities in the heart of rats fed a sucrose-rich diet: is the low activity of the pyruvate dehydrogenase complex a result of increased fatty acid oxidation? *Metabolism: clinical and experimental* [online]. **40**(1), 15–21 [vid. 2018-05-06]. ISSN 0026-0495. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1984563>
- COOPER, J A, 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology* [online]. **105**(4), 1473–8 [vid. 2018-08-20]. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3312229>
- DEGORORDO, Antonio, Federico VALLEJO-MANZUR, Katia CHANIN a Joseph VARON, 2003. *Diving emergencies* [online]. listopad 2003. [vid. 2018-10-08]. ISBN 0300-9572. Dostupné z: [doi:10.1016/S0300-9572\(03\)00236-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9572(03)00236-3)
- DIMITRIJEVICH, S D, S PARANJAPE, J R WILSON, R W GRACY a J G MILLS, 1999. Effect of hyperbaric oxygen on human skin cells in culture and in human dermal and skin equivalents. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **7**(1), 53–64 [vid. 2018-09-12]. ISSN 10671927. Dostupné z: [doi:10.1046/j.1524-475X.1999.00053.x](https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1999.00053.x)
- DING, Yuanyuan, Peng YAO, Tao HONG, Zhenkai HAN, Baisong ZHAO, Weimin CHEN a Guangyu ZHOU, 2018. Early hyperbaric oxygen effects on neuropathic pain and nitric oxide synthase isoforms in CCI rats. *Oncotarget* [online]. **9**(7), 7513–7521 [vid. 2018-07-21]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: [doi:10.18632/oncotarget.23867](https://doi.org/10.18632/oncotarget.23867)
- DROSE, S., Lea BLEIER, Ulrich BRANDT, Stefan DRÖSE, Lea BLEIER a Ulrich BRANDT, 2011. A Common Mechanism Links Differently Acting Complex II Inhibitors to Cardioprotection: Modulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Molecular Pharmacology* [online]. B.m.: American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, **79**(5), 814–22 [vid. 2018-05-06]. ISSN 0026-895X. Dostupné z: [doi:10.1124/mol.110.070342](https://doi.org/10.1124/mol.110.070342)
- DUŠKA, František a Jan TRNKA, 2007. *Biochemie v souvislostech, 1.díl – základy energetického metabolismu*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1116-3.
- EDWARDS, Melissa L., 2010. *Hyperbaric oxygen therapy. Part 1: History and principles* [online]. 4. květen 2010. B.m.: Wiley/Blackwell (10.1111). [vid. 2018-10-12]. ISBN 1476-4431

- (Electronic)r1476-4431 (Linking). Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-4431.2010.00535.x
- ELTORAI, I M, G B HART, M B STRAUSS, R MONTROY a G L JULER, 1986. The role of hyperbaric oxygen in the management of Fournier's gangrene. *International Surgery* [online]. **71**(1), 53–58 [vid. 2018-10-08]. ISSN 00208868. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3721757>
- EREL, Ozcan, 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry* [online]. **37**(4), 277–85 [vid. 2018-09-02]. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015
- FUKAI, Tohru a Masuko USHIO-FUKAI, 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. **15**(6), 1583–1606 [vid. 2018-05-06]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2011.3999
- GAIL, DB, 1991. Hyperbaric Oxygenation Therapy. *American Review of Respiratory Disease* [online]. **144**(6), 1414–1421 [vid. 2018-10-12]. ISSN 0003-0805. Dostupné z: doi:10.1164/ajrccm/144.6.1414
- GANONG, W. F., 2005. *Přehled lékařské fyziologie*. 20th vyd. Prague: Galén. ISBN 80-7262-311-7.
- GILL, A L a Chris N.A. BELL, 2004. *Hyperbaric oxygen: Its uses, mechanisms of action and outcomes* [online]. červenec 2004. [vid. 2018-10-12]. ISBN 1460-2725 (Print)r1460-2393 (Linking). Dostupné z: doi:10.1093/qjmed/hch074
- GNAIGER, Erich, 2014. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis* [online]. 4 th editi [vid. 2018-05-06]. ISBN 9783950239966. Dostupné z: [http://wiki.oroboros.at/images/f/fc/Gnaiger\\_2014\\_Mitochondr\\_Physiol\\_Network\\_MitoPathways.pdf](http://wiki.oroboros.at/images/f/fc/Gnaiger_2014_Mitochondr_Physiol_Network_MitoPathways.pdf)
- GOLDMAN, R D, S KHUON, Y H CHOU, P OPAL a P M STEINERT, 1996. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *The Journal of cell biology* [online]. **134**(4), 971–83 [vid. 2018-08-15]. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769421>
- GOLDMANN, Wolfgang H. a Donald E. INGBER, 2002. Intact Vinculin Protein Is Required for Control of Cell Shape, Cell Mechanics, and rac-Dependent Lamellipodia Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. B.m.: Academic Press, **290**(2), 749–755 [vid. 2018-08-15]. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/BBRC.2001.6243
- GOMEZ, Christian R., Gaylord J. KNUTSON, Kari B. CLIFTON, Claire A. SCHREIBER a Stanimir VUK-PAVLOVIĆ, 2012. Age-dependent response of murine female bone marrow cells to hyperbaric oxygen. *Biogerontology* [online]. **13**(3), 287–297 [vid. 2018-07-21]. ISSN 13895729. Dostupné z: doi:10.1007/s10522-012-9373-8
- HÁJEK, Michal., 2017. *Hyperbarická medicína* [online]. 1. vyd. B.m.: Mladá fronta [vid. 2018-09-19]. ISBN 9788020442352. Dostupné z: [https://ipac.svkkk.cz/arl-kl/cs/detail-kl\\_us\\_cat.10-1130832-Hyperbaricka-medicina/](https://ipac.svkkk.cz/arl-kl/cs/detail-kl_us_cat.10-1130832-Hyperbaricka-medicina/)
- HALL, John a A.C. GUYTON, 2005. *Textbook of medical physiology*. 11. vyd. B.m.: Saunders/Elsevier. ISBN 9781437700602.
- HALLIWELL, Barry, 2003. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS letters* [online]. **540**(1–3), 3–6 [vid. 2018-09-05]. ISSN 0014-5793. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12681474>
- HAN, C.H. H., Z.B. B. GUAN, P.X. X. ZHANG, H.L. L. FANG, L. LI, H.M. M. ZHANG, F.J. J. ZHOU, Y.F. F. MAO a W.W. W. LIU, 2018. Oxidative stress induced necroptosis activation is involved in the pathogenesis of hyperoxic acute lung injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **495**(3), 2178–2183 [vid. 2018-07-21]. ISSN 10902104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2017.12.100
- HAN, George a Roger CEILLEY, 2017. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in therapy* [online]. **34**(3), 599–610 [vid. 2018-08-07]. ISSN 1865-8652. Dostupné z: doi:10.1007/s12325-017-0478-y
- HENRIQUE, Pedro, Justino OLIVEIRA, Huberth ALEXANDRE, Richarlisson Borges de MORAIS, Karen

- RENATA, Nakamura HIRAKI, Ana PAULA, Coelho BALBI, Priscilla BARBOSA, Ferreira SOARES a Paula DECHICHI, 2018. Influence of hyperbaric oxygen on biomechanics and structural bone matrix in type 1 diabetes mellitus rats. *PLOS ONE* [online]. B.m.: Public Library of Science, **13**(2), 1–13 [vid. 2018-07-21]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0191694
- HEYBOER, Marvin, Tatyana N. MILOVANOVA, Susan WOJCIK, William GRANT, Mary CHIN, Kevin R. HARDY, David S. LAMBERT, Christopher LOGUE a Stephen R. THOM, 2014. CD34+/CD45-dim stem cell mobilization by hyperbaric oxygen - Changes with oxygen dosage. *Stem Cell Research* [online]. **12**(3), 638–645 [vid. 2018-10-12]. ISSN 18767753. Dostupné z: doi:10.1016/j.scr.2014.02.005
- HOLUBOVA, Monika, Martin LEBA, Markéta SEDMIKOVA, Luca VANNUCCI a Vratislav HORAK, 2012. Characterization of three newly established rat sarcoma cell clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* [online]. **48**(10), 610–618 [vid. 2018-07-21]. ISSN 1071-2690. Dostupné z: doi:10.1007/s11626-012-9563-3
- HOLY, Richard, Pavol PRAZENICA, Eva STOLARIKOVA, Petr DOSEL, Petra FUNDOVA, Daniel KOVAR a Jaromir ASTL, 2016. Hyperbaric oxygen therapy in tinnitus with normal hearing in association with combined treatment. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* [online]. **43**(3), 201–205 [vid. 2018-08-07]. ISSN 1066-2936. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27416687>
- HOPF, Harriet W., Matthew KELLY a Dag SHAPSHAK, 2008. Oxygen and the Basic Mechanisms of Wound Healing. In: *Physiology and Medicine of Hyperbaric Oxygen Therapy* [online]. B.m.: Saunders/Elsevier, s. 203–228 [vid. 2018-10-12]. ISBN 9781416034063. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4160-3406-3.50016-0
- HÜTTER, E., H. UNTERLUGGAUER, A. GAREDEW, P. JANSEN-DÜRR a E. GNAIGER, 2006. High-resolution respirometry-a modern tool in aging research. *Experimental Gerontology* [online]. **41**(1), 103–109 [vid. 2018-10-22]. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/j.exger.2005.09.011
- JAIN, Kewal K., 2017. *Textbook of Hyperbaric Medicine* [online]. B.m.: Springer. ISBN 978-3-319-47138-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-47140-2
- JANG, David H., Utsha G. KHATRI, Brenna P. SHORTAL, Matthew KELLY, Kevin HARDY, David S. LAMBERT a David M. ECKMANN, 2018. Alterations in mitochondrial respiration and reactive oxygen species in patients poisoned with carbon monoxide treated with hyperbaric oxygen. *Intensive Care Medicine Experimental* [online]. **6**(1), 4 [vid. 2018-07-21]. ISSN 2197-425X. Dostupné z: doi:10.1186/s40635-018-0169-2
- JANÍČEK, P., 2004. *Mechanika těles: Pružnost a pevnost I*. 1. vyd. ISBN 80-214-2592-X.
- JASTROCH, Martin, Ajit S. DIVAKARUNI, Shona MOOKERJEE, Jason R. TREBERG a Martin D. BRAND, 2010. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays In Biochemistry* [online]. B.m.: NIH Public Access, **47**, 53–67 [vid. 2018-05-06]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/bse0470053
- JODEIRI FARSHBAF, Mohammad a Abbas KIANI-ESFAHANI, 2017. Succinate dehydrogenase: Prospect for neurodegenerative diseases. *Mitochondrion* [online]. [vid. 2018-05-06]. ISSN 18728278. Dostupné z: doi:10.1016/j.mito.2017.12.002
- KANG, Thomas S., Goutham K. GORTI, Susan Y. QUAN, Michael HO a R. James KOCH, 2004. Effect of hyperbaric oxygen on the growth factor profile of fibroblasts. *Archives of Facial Plastic Surgery* [online]. **6**(1), 31–35 [vid. 2018-07-21]. ISSN 15383660. Dostupné z: doi:10.1001/archfaci.6.1.31
- KELLEY, David E, Marian MOKAN, Jean Aime SIMONEAU a Lawrence J MANDARINO, 1993. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation* [online]. B.m.: American Society for Clinical Investigation, **92**(1), 91–98 [vid. 2018-05-06]. ISSN 00219738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI116603
- KNIGHT, John, 1999. OXYGEN TOXICITY A BRIEF HISTORY OF OXYGEN IN DIVING [online]. B.m.: South Pacific Underwater Medicine Society, 1–6 [vid. 2018-09-19]. Dostupné z: <http://archive.rubicon-foundation.org/xmlui/handle/123456789/6014>
- KOPPENOL, W. H. a J. BUTLER, 1985. *Energetics of interconversion reactions of oxyradicals* [online]. 1. leden 1985. B.m.: Pergamon. [vid. 2018-10-03]. ISSN 87559668. Dostupné z: doi:10.1016/8755-

9668(85)90005-5

- KORKMAZ, Ahmet, Sükrü ÖTER, Serdar SADIR, Turgut TOPAL, Bülent UYSAL, Mehmet ÖZLER, Hakan AY a Ahmet AKIN, 2008. Exposure time related oxidative action of hyperbaric oxygen in rat brain. *Neurochemical Research* [online]. **33**(1), 160–166 [vid. 2018-07-21]. ISSN 03643190. Dostupné z: doi:10.1007/s11064-007-9428-4
- KUZNETSOV, Andrey V., Daniela STROBL, Elfriede RUTTMANN, Alfred KÖNIGSRÄINER, Raimund MARGREITER a Erich GNAIGER, 2002. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Analytical Biochemistry* [online]. **305**(2), 186–194 [vid. 2018-07-21]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.2002.5658
- LARKIN, EC, JD ADAMS, WT WILLIAMS a DM DUNCAN, 1972. Hematologic responses to hypobaric hyperoxia. *American Journal of Physiology* [online]. B.m.: American Physiological Society, **223**(2), 431–7 [vid. 2018-11-17]. ISSN 0002-9513 (Print). Dostupné z: doi:10.1152/ajplegacy.1972.223.2.431
- LEACH, R M, P J REES a P WILMSHURST, 1998. Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ (Clinical research ed.)* [online]. B.m.: BMJ Publishing Group, **317**(7166), 1140–3 [vid. 2018-12-06]. ISSN 0959-8138. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784458>
- LENERT, Jan, 1998. *Pružnost a pevnost I*. B.m.: VŠB-TU Ostrava. ISBN 80-7078-392-3.
- LEWINSKA, Anna, Maciej WNUK, Ewa SLOTA a Grzegorz BARTOSZ, 2007. TOTAL ANTI-OXIDANT CAPACITY OF CELL CULTURE MEDIA. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [online]. B.m.: Wiley/Blackwell (10.1111), **34**(8), 781–786 [vid. 2018-09-05]. ISSN 0305-1870. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04637.x
- LIN, Hen I., Shi Jye CHU, Wann Cherng PERNG, Chin Pyng WU, Zuei Yin LIN a Kun Lun HUANG, 2008. Hyperbaric oxygen attenuates cell growth in skin fibroblasts cultured in a high-glucose medium. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **16**(4), 513–519 [vid. 2018-09-19]. ISSN 10671927. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00398.x
- LIU, W, J ZHANG, C MA, Y LIU, R LI, X SUN a W G XU, 2009. Dual effects of hyperbaric oxygen on proliferation and cytotoxic T lymphocyte activity of rat splenic lymphocytes. *Undersea Hyperb Med* [online]. **36**(3), 155–160 [vid. 2018-10-12]. ISSN 1066-2936. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860137>
- LODISH, Harvey F., Arnold. BERK, Chris. KAISER, Monty. KRIEGER, Matthew P. SCOTT, Anthony. BRETSCHER, Hidde L. PLOEGH a Paul T. MATSUDAIRA, 2008. *Molecular cell biology* [online]. 6th ed. New York: W.H. Freeman [vid. 2018-08-15]. ISBN 9780716743668. Dostupné z: <https://www.worldcat.org/title/molecular-cell-biology/oclc/83758878>
- MAIER, A, U ANEGG, F TOMASELLI, P REHAK, O SANKIN, B FELL, H RENNER, H PINTER, F M SMOLLE-JÜTTNER a G B FRIEHS, 2000a. Does hyperbaric oxygen enhance the effect of photodynamic therapy in patients with advanced esophageal carcinoma? A clinical pilot study. *Endoscopy* [online]. **32**(1), 42–48 [vid. 2018-10-12]. ISSN 0013726X. Dostupné z: doi:10.1055/s-2000-132
- MAIER, A, F TOMASELLI, U ANEGG, P REHAK, B FELL, S LUZNIK, H PINTER, F M SMOLLE-JÜTTNER, Hugh BARR a Keyvan MOGHISSI, 2000b. Combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in carcinoma of the esophagus and the esophago-gastric junction. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* [online]. **18**(6), 649–655 [vid. 2018-10-12]. ISSN 10107940. Dostupné z: doi:10.1016/S1010-7940(00)00592-3
- MAKRECKA-KUKA, Marina, Gerhard KRUMSCHNABEL a Erich GNAIGER, 2015. High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. *Biomolecules* [online]. **5**(3), 1319–1338 [vid. 2018-10-22]. ISSN 2218273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom5031319
- MATHIEU, Daniel, Raphael FAVORY, François COLLET, Jean Christophe LINKE a Francis WATTEL, 2006. Physiologic effects of hyperbaric oxygen on hemodynamics and microcirculation. In: *Handbook on Hyperbaric Medicine* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, s. 75–101 [vid. 2018-11-26]. ISBN 9781402044489. Dostupné z: doi:10.1007/1-4020-4448-8-6

- MATHIEU, Daniel, Alessandro MARRONI a Jacek KOT, 2017. Tenth european consensus conference on hyperbaric medicine: Recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment. *Diving and Hyperbaric Medicine* [online]. **47**(1), 24–31 [vid. 2018-07-21]. ISSN 18333516. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28357821>
- MELCHER, Carolin, Birte SIEVERS, Nadine HÖCHSMANN, Frank DÜREN, Volkmar JANSSON a Peter E. MÜLLER, 2018. Effect of Hyperbaric Oxygen on Proliferation and Gene Expression of Human Chondrocytes: An In Vitro Study. *CARTILAGE* [online]. B.m.: SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 194760351876428 [vid. 2018-10-20]. ISSN 1947-6035. Dostupné z: [doi:10.1177/1947603518764281](https://doi.org/10.1177/1947603518764281)
- MILLER, N J, C RICE-EVANS, M J DAVIES, V GOPINATHAN a A MILNER, 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England : 1979)* [online]. **84**(4), 407–12 [vid. 2018-09-02]. ISSN 0143-5221. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8482045>
- MILOVANOVA, Tatyana N., Veena M. BHOPALE, Elena M. SOROKINA, Jonni S. MOORE, Thomas K. HUNT, Martin HAUER-JENSEN, Omaid C. VELAZQUEZ a Stephen R. THOM, 2009. Hyperbaric oxygen stimulates vasculogenic stem cell growth and differentiation in vivo. *Journal of Applied Physiology* [online]. **106**(2), 711–728 [vid. 2018-10-12]. ISSN 8750-7587. Dostupné z: [doi:10.1152/jappphysiol.91054.2008](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91054.2008)
- MOGENSEN, M, M BAGGER, P K PEDERSEN, M FERNSTRÖM a K SAHLIN, 2006. Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibres but not to mitochondrial efficiency. *The Journal of physiology* [online]. **571**(Pt 3), 669–81 [vid. 2018-09-08]. ISSN 0022-3751. Dostupné z: [doi:10.1113/jphysiol.2005.101691](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.101691)
- NULTON-PERSSON, Amy C. a Luke I. SZWEDA, 2001. Modulation of Mitochondrial Function by Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(26), 23357–23361 [vid. 2018-05-06]. ISSN 00219258. Dostupné z: [doi:10.1074/jbc.M100320200](https://doi.org/10.1074/jbc.M100320200)
- NYLANDER, G., H. NORDSTRÖM a E. ERIKSSON, 1984. Effects of hyperbaric oxygen on oedema formation after a scald burn. *Burns* [online]. **10**(3), 193–196 [vid. 2018-10-12]. ISSN 03054179. Dostupné z: [doi:10.1016/0305-4179\(84\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0305-4179(84)90026-3)
- PAGANO, Alessandra a Constance BARAZZONE-ARGIROFFO, 2003. Alveolar Cell Death in Hyperoxia-Induced Lung Injury. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. B.m.: Wiley/Blackwell (10.1111), s. 405–416 [vid. 2018-09-12]. ISBN 0077-8923 (Print)r0077-8923 (Linking). Dostupné z: [doi:10.1196/annals.1299.074](https://doi.org/10.1196/annals.1299.074)
- PESTA, Dominik a Erich GNAIGER, 2012. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. **810**, 25–58 [vid. 2018-05-06]. ISSN 1940-6029. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-61779-382-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_3)
- PFLEGER, J, M HE a M ABDELLATIF, 2015. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death and Disease* [online]. **6**(7), e1835–e1835 [vid. 2018-05-06]. ISSN 20414889. Dostupné z: [doi:10.1038/cddis.2015.202](https://doi.org/10.1038/cddis.2015.202)
- PLACE, Trenton L., Frederick E. DOMANN a Adam J. CASE, 2017. *Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research* [online]. prosinec 2017. [vid. 2018-09-19]. ISSN 18734596. Dostupné z: [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003)
- POFF, Angela M., Dawn KERNAGIS a Dominic P. D'AGOSTINO, 2017. Hyperbaric environment: Oxygen and cellular damage versus protection. *Comprehensive Physiology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., **7**(1), 213–234 [vid. 2018-05-06]. ISSN 20404603. Dostupné z: [doi:10.1002/cphy.c150032](https://doi.org/10.1002/cphy.c150032)
- POYRAZOGLU, Yavuz, Turgut TOPAL, Ramazan YUKSEL, Filiz Sezen BIRCAN, Kemal SIMSEK, Ercan GOCGELDI, Nail ERSOZ a Ahmet KORKMAZ, 2015. Effects of Hyperbaric Oxygen and

- Preconditioning on Wound Healing in Colonic Anastomoses. *Journal of Investigative Surgery* [online]. **28**(4), 188–195 [vid. 2018-09-12]. ISSN 15210553. Dostupné z: doi:10.3109/08941939.2014.999961
- RABØL, Rasmus, Patricia M.V. HØJBERG, Thomas ALMDAL, Robert BOUSHEL, Steen B. HAUGAARD, Sten MADSBAD a Flemming DELA, 2009. Effect of hyperglycemia on mitochondrial respiration in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **94**(4), 1372–1378 [vid. 2018-09-08]. ISSN 0021972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2008-1475
- ROBERTS, G. P. a K. G. HARDING, 1994. Stimulation of glycosaminoglycan synthesis in cultured fibroblasts by hyperbaric oxygen. *British Journal of Dermatology* [online]. **131**(5), 630–633 [vid. 2018-09-12]. ISSN 13652133. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2133.1994.tb04973.x
- ROSE, Jason J., Ling WANG, Qinzi XU, Charles F. MCTIERNAN, Sruti SHIVA, Jesus TEJERO a Mark T. GLADWIN, 2017. Carbon Monoxide Poisoning: Pathogenesis, Management, and Future Directions of Therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. **195**(5), 596–606 [vid. 2018-08-07]. ISSN 1073-449X. Dostupné z: doi:10.1164/rccm.201606-1275CI
- RUBIN, H, 1997. Cell aging in vivo and in vitro. *Mechanisms of ageing and development* [online]. **98**(1), 1–35 [vid. 2018-09-05]. ISSN 0047-6374. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9255755
- RUMBLE, John, 2018. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 99. vyd. B.m.: CRC Press. ISBN 9781138561632.
- RUSKO, Heikki K, Heikki O TIKKANEN a Juha E PELTONEN, 2003. Oxygen manipulation as an ergogenic aid. *Current sports medicine reports* [online]. **2**(4), 233–8 [vid. 2018-10-08]. ISSN 1537-890X. Dostupné z: doi:10.1249/00149619-200308000-00011
- SANDER, R., 2015. Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmospheric Chemistry and Physics* [online]. **15**(8), 4399–4981 [vid. 2018-12-06]. ISSN 16807324. Dostupné z: doi:10.5194/acp-15-4399-2015
- SCHOLZ, Roland, Merle S OLSON, Andreas J SCHWAB, Ursula SCHWABE, Christiane NOELL a Wolfgang BRAUN, 1978. The effect of fatty acids on the regulation of pyruvate dehydrogenase in perfused rat liver. *Eur J Biochem* [online]. **86**(2), 519–530 [vid. 2018-05-06]. ISSN 0014-2956. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12335.x
- SCHREML, S., R.M. M. SZEIMIES, L. PRANTL, S. KARRER, M. LANDTHALER a P. BABILAS, 2010. *Oxygen in acute and chronic wound healing* [online]. 15. duben 2010. [vid. 2018-05-06]. ISBN 0007-0963. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09804.x
- SIM, M. A. B., P. DEAN, J. KINSELLA, R. BLACK, R. CARTER a M. HUGHES, 2008. Performance of oxygen delivery devices when the breathing pattern of respiratory failure is simulated\*. *Anaesthesia* [online]. B.m.: Wiley/Blackwell (10.1111), **63**(9), 938–940 [vid. 2018-10-08]. ISSN 00032409. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2044.2008.05536.x
- SIMSEK, Kemal, Hakan AY, Turgut TOPAL, Mehmet OZLER, Bulent UYSAL, Ergun UCAR, Cengiz H. ACIKEL, Ozgur YESILYURT, Ahmet KORKMAZ, Sukru OTER a Senol YILDIZ, 2011. Long-term exposure to repetitive hyperbaric oxygen results in cumulative oxidative stress in rat lung tissue. *Inhalation Toxicology* [online]. B.m.: Taylor & Francis, **23**(3), 166–172 [vid. 2018-05-06]. ISSN 08958378. Dostupné z: doi:10.3109/08958378.2011.558528
- SINAN, Mukaddes, Nesrin Zeynep ERTAN, Bengusu MIRASOGLU, Ozlem YALCIN, Nazlı ATAC, Akin Savas TOKLU, Canan BASARAN-KUCUKGERGIN a Oguz Kerim BASKURT, 2016. Acute and long-term effects of hyperbaric oxygen therapy on hemorheological parameters in patients with various disorders. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* [online]. **62**(1), 79–88 [vid. 2018-09-12]. ISSN 1875-8622. Dostupné z: doi:10.3233/CH-151952
- SMOLLE-JÜTTNER, F M, 1999. Technology of hyperbaric chambers. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* [online]. **151**(5–6), 131–3 [vid. 2018-10-12]. ISSN 0043-5341. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11315411
- STEPHENSON, R N, I MACKENZIE, S J WATT a J A ROSS, 1996. Measurement of oxygen concentration



- in delivery systems used for hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med* [online]. **23**(3), 185–188 [vid. 2018-10-08]. ISSN 1066-2936. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8931286>
- SUN, Yongming, Dong LIU, Qingpeng WANG, Peng SU a Qifeng TANG, 2017. Hyperbaric oxygen treatment of spinal cord injury in rat model. *BMC neurology* [online]. B.m.: BioMed Central, **17**(1), 128 [vid. 2018-07-21]. ISSN 1471-2377. Dostupné z: doi:10.1186/s12883-017-0909-z
- TANG, Peter S., Marco MURA, Rashmi SETH a Mingyao LIU, 2008. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [online]. B.m.: American Physiological Society, **294**(4), L632–L641 [vid. 2018-09-12]. ISSN 1040-0605. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.00262.2007
- TEPLÁ, Milada, 2017. *Dýchací řetězec* [online]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/dr.html>
- THOM, Stephen R., Veena M. BHOPALE, Omaidia C. VELAZQUEZ, Lee J. GOLDSTEIN, Lynne H. THOM a Donald G. BUERK, 2006. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [online]. B.m.: American Physiological Society, **290**(4), H1378–H1386 [vid. 2018-10-12]. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00888.2005
- THOMSON, Louise a James PATON, 2014. Oxygen Toxicity. *Paediatric Respiratory Reviews* [online]. **15**(2), 120–123 [vid. 2018-10-10]. ISSN 15260542. Dostupné z: doi:10.1016/j.prrv.2014.03.003
- TIBBLES, Patrick M. a John S. EDELSBERG, 1996. Hyperbaric-oxygen therapy. *The New England journal of medicine* [online]. **334**(25), 1642–8 [vid. 2018-10-12]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199606203342506
- TOLENTINO, E. C., O. CASTRO E SILVA, S. ZUCOLOTO, M. E J SOUZA, M. C J GOMES, A. K. SANKARANKUTTY, G. R. OLIVEIRA a O. FERES, 2006. Effect of Hyperbaric Oxygen on Liver Regeneration in a Rat Model. *Transplantation Proceedings* [online]. **38**(6), 1947–1952 [vid. 2018-07-21]. ISSN 00411345. Dostupné z: doi:10.1016/j.transproceed.2006.06.066
- TROJAN, Stanislav, 2003. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-0512-5.
- VOET, Donald a Judith VOET, 2011. *Biochemistry*. 4. vyd. B.m.: John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-57095-1.
- WAGNER, Brett A., Sujatha VENKATARAMAN a Garry R. BUETTNER, 2011. The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. B.m.: Pergamon, **51**(3), 700–712 [vid. 2018-11-26]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.024
- WEBB, J. T., R. M. OLSON, R. W. KRUTZ, G.A. DIXON a P. T. BARNICOTT, 1989. Human tolerance to 100% oxygen at 9.5 psia during five daily simulated 8-hour EVA exposures. *Aviation Space and Environmental Medicine* [online]. **60**(5), 415–421 [vid. 2018-10-08]. ISSN 00956562. Dostupné z: doi:10.4271/881071
- WEBER, Stefan U, Andreas KOCH, Jens KANKELEIT, Jens-Christian SCHEWE, Ullrich SIEKMANN, Frank STÜBER, Andreas HOEFT a Stefan SCHRÖDER, 2009. Hyperbaric oxygen induces apoptosis via a mitochondrial mechanism. *Apoptosis* [online]. **14**(1), 97–107 [vid. 2018-10-13]. ISSN 1360-8185. Dostupné z: doi:10.1007/s10495-008-0280-z
- WENGER, Roland, Vartan KURTCUOGLU, Carsten SCHOLZ, Hugo MARTI a David HOOGEWIJS, 2015. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia* [online]. **3**, 35 [vid. 2018-07-21]. ISSN 2324-1128. Dostupné z: doi:10.2147/HP.S92198
- WIEGAND, G a S J REMINGTON, 1986. Citrate Synthase: Structure, Control, and Mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* [online]. **15**(1), 97–117 [vid. 2018-09-02]. ISSN 0883-9182. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bb.15.060186.000525
- WOJTOVICH, Andrew P a Paul S BROOKES, 2009. The complex II inhibitor atpenin A5 protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via activation of mitochondrial KATP channels. *Basic research in cardiology* [online]. B.m.: NIH Public Access, **104**(2), 121–9 [vid. 2018-05-06]. ISSN 1435-1803. Dostupné z: doi:10.1007/s00395-009-0001-y
- WU, Dong, Jian-Shan WU, Fu-Hua YAN a Jiang CHEN, 2008. Effect of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro. *Progress in Biochemistry and Biophysics*

[online]. **35**(7), 791–800 [vid. 2018-10-20]. ISSN 10003282. Dostupné z: doi:10.1177/1947603518764281

YILDIZ, Hamza, Levent SENOL, Erdinc ERCAN, Memet Ersan BILGILI a Ozlem KARABUDAK ABUAF, 2016. A prospective randomized controlled trial assessing the efficacy of adjunctive hyperbaric oxygen therapy in the treatment of hidradenitis suppurativa. *International Journal of Dermatology* [online]. **55**(2), 232–237 [vid. 2018-08-07]. ISSN 00119059. Dostupné z: doi:10.1111/ijd.12936

ZALATA, A A, N. LAMMER TIJN, A CHRISTOPHE a F H COMHAIRE, 1998. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *International Journal of Andrology* [online]. **21**(5), 289–294 [vid. 2018-07-21]. ISSN 01056263. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2605.1998.00126.x

## 13.SOUHRN

Hyperbarická oxygenoterapie (HBO) je běžně používaná podpůrná a terapeutická léčebná metoda využívající zvýšenou koncentraci kyslíku. Přestože se jedná o běžně užívanou léčbu, v odborné literatuře není dostatek podkladů pro plné pochopení biologických dějů, které v buňkách při těchto odlišných fyzikálních podmínkách probíhají.

Práce měla vytčené tři cíle. Prvním cílem bylo vhodně shrnout fyzikálně-chemické vlastnosti kyslíku, popsat fyziologický metabolismus kyslíku až na mitochondriální úroveň a shrnout jeho medicínské využití a rizika.

Druhým je vývoj nové a unikátní technologie malé hyperbarické komůrky uHBK, díky které by bylo možné studium vlivu podmínek HBO na buněčný metabolismus provést. Výstupem jsou dva typy komůrek uHBK 1 a 2. V práci je popsán jejich návrh doprovázený strojními výpočty, simulacemi a informacemi o vlastnostech a postupu vývoje. Technologie byla úspěšně patentována národním CZ patentem č. 28967.

Třetím cílem práce je hodnocení účinku opakované expozice HBO na buněčnou linii lidských fetálních plicních fibroblastů (HFL1). Mitochondriální spotřeba kyslíku byla hodnocena metodou high-resolution respirometry (HRR), životaschopnost buněk hodnocena PrestoBlue®, morfologie analyzovaná rutinní fluorescenční mikroskopií a fázovým kontrastem a byla zhodnocena aktivita superoxid dismutázy (SOD) a citrát syntázy (CS). Buňky byly vystaveny HBO (3 ATA) 2 hodiny denně po dobu 5 po sobě jdoucích dní. Den po poslední HBO expozici vykazovaly buňky podstatně menší plochu a obvod, sníženou životaschopnost a zvýšenou aktivitu SOD. Nebyly zjištěny žádné změny v aktivitě CS ani v kvalitě mitochondriální sítě. Respirometrie HRR odhalila sníženou mitochondriální spotřebu kyslíku, která se projevila snížením aktivity komplexu II a sníženou spotřebou kyslíku při oxidaci mastných kyselin. Popsané výsledky dokládají, že v podmínkách napodobujících intermitentní expozici HBO trpí plicní fibroblasty zhoršenou mitochondriální respirací spojenou s komplexem II a poruchou buněčného růstu i při zvýšené antioxidační obraně. Mechanismus této HBO-indukované mitochondriální dysfunkce je nutné hlouběji prozkoumat.

Nová technologie přípravy buněčných linií ovlivňovaných různými odlišnými fyzikálními podmínkami ve spolupráci s hodnocením mitochondriální respirometrie se jeví jako vhodná kombinace pro základní výzkum zaměřený na studium účinků HBO.

## 14. SUMMARY

Hyperbaric oxygen therapy (HBO) is a commonly used supportive and therapeutic treatment method using increased oxygen concentration. Although it is a commonly used treatment, in the literature, there is an insufficient evidence to fully understand the biological processes that take place in the cells under these different physical conditions.

The work is divided into three parts. The first part aims on summarizing the physico-chemical properties of oxygen, describe the physiological metabolism pathways of oxygen up to the mitochondrial level and to summarize its medical uses and risks.

The second goal is the development of a new technology of a small hyperbaric chamber uHBK, which would make it possible to study the effect of HBO conditions on cellular metabolism. The result is two types of microhyperbaric chambers uHBK 1 and 2. The thesis describes their design accompanied by mechanical and structural calculations, simulations and information about their properties and the development process. The technology was successfully patented by national CZ patent no. 28967.

The third aim of the thesis is to study the effect of repeated HBO exposure on the human fetal lung fibroblasts (HFL1). Cell viability was estimated by PrestoBlue® reaction, morphology analyzed by routine phase contrast and fluorescent microscopy, and activities of superoxide dismutase (SOD) and citrate synthase (CS) by reader. Mitochondrial respiration was assessed by the high-resolution respirometry (HRR). The cells were exposed to HBO (3 ATA) for 2 hours per day for 5 consecutive days. One day after the last exposure, HBO cells displayed significantly smaller area and perimeter, compromised viability and elevated SOD activity. No changes were detected in CS activity or quality of mitochondrial network. HRR revealed impaired mitochondrial oxygen consumption manifested by increased leak respiration, decreased activity of complex II and compromised ATP-related oxygen consumption. Our findings document that in conditions mimicking chronic intermittent exposure to HBO, lung fibroblasts suffer from compromised mitochondrial respiration linked to complex II and impaired cellular growth in spite of increased antioxidant defense. Underlying mechanism of this HBO-induced mitochondrial dysfunction should be further explored.

The new technology for the preparation of cell lines influenced by different physical conditions in conjunction with the evaluation of mitochondrial respirometry appears to be a suitable combination for basic research to study the effects of HBO.

## 15. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	Adenosindifosfát
AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
AmA	<i>Antimycine A</i>
ATA	Absolutní atmosférický tlak na hladině moře (101,325 kPa)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CaC	<i>Cytric Acid Cycle</i>
CAD	<i>Computer-aided design</i>
CAM	<i>Computer-aided manufacturing</i>
Cccp	<i>Carbonilcyanide m-cholorophenylhydrazone</i>
CNS	Centrální nervová soustava
CoA	Koenzym A
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
CoQ	Koenzym Q
CS	Citrátsyntáza
cyt a3	Cytochrom a3
cyt b	Cytochrom b
cyt c1	Cytochrom c <sub>1</sub>
ČBÚ	Český báňský úřad
ČSN	Česká státní norma
ČÚBP	Český úřad bezpečnosti práce
Dig	<i>Digitonin</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ETC	<i>Electron transport chain</i>
ETS	<i>Electron Transfer System</i>
F-12K	Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fccp	<i>Carbonilcyanide p-triflouromethoxyphenylhydrazone</i>
FMN	Flavinmononukleotid
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FU	<i>Fluorescent unit</i>
G	<i>Glutamate</i>
HALI	<i>Hyperoxic acute lung injury</i>
HBO	<i>Hyperbaric Oxygenotherapy</i>
HFL1	<i>Human foetal lung fibroblast</i>
HJIP	hyperbarická jednotka intenzivní péče
HMH	Huber - von Mises - Hencky hypotéza
HRR	<i>High Resolution Respirometry</i>
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc
IMM	vnitřní mitochondriální membrána
ISP	Rieskeho Fe-S protein; <i>Iron sulfur protein</i>
LEAK	<i>Respiration leakage</i>
M	<i>Malate</i>
mU	<i>milli-international units</i>
MMP	mitochondriální membránový potenciál

NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NBO	<i>Normobaric Oxygenotherapy</i>
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i>
Omy	<i>Oligomycine</i>
OXPHOS	<i>Oxidative Phosphorylation</i>
P	<i>Pyruvate</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pCO <sub>2</sub>	Parciální tlak oxidu uhličitého
PDH	Pyruvátdehydrogenáza
PDT	Fotodynamická terapie; <i>Photodynamic therapy</i>
PED	<i>Pressure Equipment Directive</i>
PMMA	Polymethylmethakrylát
pO <sub>2</sub>	Parciální tlak kyslíku
PoC	<i>Proof of Concept</i>
RONS	<i>Reactive oxygen and nitrogen species</i>
ROS	Reaktivní kyslíkové formy; <i>Reactive Oxygen Species</i>
Rot	<i>Rotenone</i>
ROUT	<i>Routine respiration</i>
ROX	<i>Residual Oxygen Consumption</i>
RR	<i>Respiration reserve</i>
RT	<i>Room temperature</i>
S	<i>Succinate</i>
σ <sub>D</sub>	Maximální dovolené napětí
SD	<i>Secure Digital card</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SI	<i>International System of Units</i>
SOD	Superoxid dismutáza
TAC	<i>Total Antioxidant Capacity</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TMPD	dihydrochlorid N, N, N', N'-tetramethyl-p-fenylendiamin
TNS	Tlaková nádoba stabilní
TPP®	Techno Plastic Products AG
TZ	Tlakové zařízení
uHBK	Mikrohyperbarická komůrka
URES	<i>Displacement vector</i>
λ <sub>abs</sub>	Fluorescenční absorpční vlnová délka
λ <sub>em</sub>	Fluorescenční emisní vlnová délka
λ <sub>ex</sub>	Fluorescenční excitační vlnová délka

## 16. VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

### Původní vědecké publikace v časopisech s IF

**DEJMEK**, Jiří, Michaela KOHOUTOVÁ, Michaela KRIPNEROVÁ, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Zdeněk TŮMA, Václav BABUŠKA, Lukáš BOLEK a Jitka KUNCOVÁ, 2018. Repeated exposure to hyperbaric hyperoxia affects mitochondrial functions of the lung fibroblasts. *Physiol Res.* 67 (Suppl 4). **IF 1.324** [V tisku]

### Původní vědecké publikace uveřejněné v recenzovaných časopisech

**DEJMEK**, Jiří, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Lukáš BOLEK, Michaela MARKOVÁ, Václav BABUŠKA a Jitka KUNCOVÁ, 2018. Mikrohyperbarie – možnost studia buněčného metabolismu v odlišných fyzikálních podmínkách. *Plzeňský lékařský sborník.* 84, 37-42. Univerzita Karlova v Praze, ISBN 978-80-246-4176-8.

### Přehledné/souborové vědecké publikace v časopisech s IF

KOHOUTOVÁ, Michaela, Jiří **DEJMEK**, Zdeněk TŮMA, Jitka KUNCOVÁ, 2018. Variability of Mitochondrial Respiration in Relation to Sepsis-Induced Multiple Organ Dysfunction. *Physiol Res.* 67 (Suppl 4). **IF 1.324** [V tisku]

### Přehledné/souborové vědecké publikace uveřejněné v recenzovaných časopisech

**DEJMEK**, Jiří, Michaela MARKOVÁ, Michaela KRIPNEROVÁ, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Zdeněk TŮMA, Václav BABUŠKA, Lukáš BOLEK, Jitka KUNCOVÁ, 2018. Změny respirace plicních fibroblastů in vitro po opakované krátkodobé hyperoxické expozici. *Pracovní lékařství.* [V tisku]

### Publikace abstraktů ve sbornících

**DEJMEK**, Jiří, Svatopluk BINDER a Lukáš BOLEK, 2014. Ultrasonografické čidlo pro bezkontaktní měření teploty kapalin v hadičce. *Sborník abstrakt konference 37. dny lékařské biofyziky.* Košice (SK): Equilibria. ISBN 978-80-8152-143-0.

**DEJMEK**, Jiří, Jiří BENEŠ, Jiří RŮŽIČKA, Zdeněk KUBEŠ a Lukáš BOLEK, 2014. Testování účinnosti tepelného výměníku s laminarizérem pro různé kapaliny. *Sborník abstrakt konference 37.dny lékařské biofyziky.* Košice (SK): Equilibria. ISBN 978-80-8152-143-0.

**DEJMEK**, Jiří, Václav BABUŠKA, Zdeněk KUBEŠ a Lukáš BOLEK, 2015. Základní studie využitelnosti mikrohyperbarické komůrky pro buněčné experimenty. *Sborník abstrakt konference 38.dny lékařské biofyziky.* Praha: Profess Cons., ISBN 978-80-7259-068-1

**DEJMEK**, Jiří, Václav BABUŠKA, Michaela MARKOVÁ, Jitka KUNCOVÁ a Lukáš BOLEK, 2016. Vliv zvýšeného parciálního tlaku kyslíku na růst a metabolismus fibroblastů – pilotní studie. *Sborník abstrakt konference 39. dny lékařské biofyziky.* Bratislava (SK): Vydavateľstvo University Komenského. ISBN 978-80-223-4105-9.

**DEJMEK**, Jiří, Michaela MARKOVÁ, Lukáš BOLEK, Václav BABUŠKA a Jitka KUNCOVÁ, 2016. Vliv zvýšeného parciálního tlaku kyslíku na růst a metabolismus fibroblastů – výsledky pilotní studie. *Sborník příspěvků z konference V. Ostravské dny hyperbarické medicíny.* Ostrava: X-media. ISBN 978-80-7464-817-5.

**DEJMEK**, Jiří, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Michaela MARKOVÁ, Jitka KUNCOVÁ a Lukáš BOLEK, 2017. Negativní faktory ovlivňující buněčnou kultivaci v odlišných fyzikálních podmínkách. *Sborník abstrakt konference 40. dny lékařské biofyziky*. Praha: 3. LF UK. ISBN 978-80-87878-26-2.

**DEJMEK**, Jiří, Lukáš BOLEK, Jiří RŮŽIČKA, Zdeněk KUBEŠ, Jiří BENEŠ a Jitka KUNCOVÁ, 2017. Příprava preklinické studie na zvířecích modelech. *Sborník abstrakt konference 40. dny lékařské biofyziky*. Praha: 3. LF UK. ISBN 978-80-87878-26-2.

**DEJMEK**, Jiří, Michaela MARKOVÁ, Michaela KRIPNEROVÁ, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Václav BABUŠKA, Lukáš BOLEK a Jitka KUNCOVÁ, 2018. Opakovaná krátkodobá expozice hyperoxii snižuje respiraci plicních fibroblastů in vitro. *Sborník abstrakt konference 41. dny lékařské biofyziky*. Martin (SK): Vydavatelstvo University Komenskeho. ISBN 978-80-8187-045-3.

**DEJMEK**, Jiří, Lukáš BOLEK, Jiří ŠKORPIL, Martin STASZKO, Václav LIŠKA, Jiří BENEŠ, Jiří RŮŽIČKA, Jiří BENEŠ a Jitka KUNCOVÁ, 2018. Naše zkušenosti s pilotními experimenty na velkých zvířecích modelech. *Sborník abstrakt konference 41. dny lékařské biofyziky*. Martin (SK): Vydavatelstvo University Komenskeho. ISBN 978-80-8187-045-3.

**DEJMEK**, Jiří, Michaela MARKOVÁ, Michaela KRIPNEROVÁ, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Zdeněk TŮMA, Václav BABUŠKA, Lukáš BOLEK a Jitka KUNCOVÁ, 2018. Změny respirace plicních fibroblastů in vitro po opakované krátkodobé hyperoxické expozici. *Sborník příspěvků z konference VI. ostravských dnů hyperbarické medicíny*. Ostrava: Ostravská univerzita, 2018. s. 9-16. ISBN 978-80-7464-994-3.

**DEJMEK**, Jiri, Michaela KRIPNEROVA, Michaela MARKOVA, Miroslava CEDIKOVA, Vaclav BABUSKA, Lukas BOLEK a Jitka KUNCOVA, 2018. Repeated exposure to hyperbaric hyperoxia affects mitochondrial functions of the lung fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. B.m.: Elsevier, 1859, e86–e87 [vid. 2018-11-29]. ISSN 0005-2728. Dostupné z: doi:10.1016/J.BBABIO.2018.09.258

## Patenty

EAPO patent číslo: 027362 B1 „Teploobmenník s laminarizátorem“ publikovaný dne 31. 7. 2017. Přihlášeno: 20. 7. 2012. Původci: Bolek, **Dejmek**, Růžička, Beneš, Petránková.

Národní (CZ) patent ÚPV číslo: 306496 B6 „Termoelektrický tepelný výměník s integrovaným rezervoárem“ publikovaný dne 15. 2. 2017. Přihlášeno: 20. 7. 2012. Původci: Bolek, **Dejmek**.

EU patent číslo: EP 2 678 628 B1: „Heat exchanger with laminarizer“ publikovaný dne 1. 2. 2017. Přihlášeno: 10. 4. 2014 EP 2 678 628. Validován v Německu, Francii a Británii. Platnost patentu je od 20. 7. 2017. Původci: Bolek, **Dejmek**, Růžička, Beneš, Petránková.

US patent číslo: US 9,500,415 B2: „Heat exchanger with laminarizer“ publikovaný dne 22. 11. 2016. Přihlášeno: 20. 7. 2012 Původci: Bolek, **Dejmek**, Růžička, Beneš, Petránková.

Národní (CZ) patent ÚPV číslo: 305989 B6: „Mobilní hyperbarická minikomora“ publikovaný dne 27. 4. 2016. Původci: Kolářová, Bajgar, Tománková, Bolek L, **Dejmek**, Bolek M, Růžička, Beneš.



Národní (CZ) patent ÚPV číslo: 303190: „Tepelný výměník s laminarizérem“, publikovaný dne 5. 4. 2012. Přihlášeno: 22. 7. 2011. Původci: Bolek, **Dejmek**, Růžička, Beneš, Petránková.

Národní (CZ) patent ÚPV číslo 301580: „Čidlo pro měření teploty kapaliny ultrazvukem“ publikovaný dne 12. 3. 2010. Přihlášeno: 10. 2. 2009. Původci: Bolek, **Dejmek**, Beneš, Růžička, Matějovič, Petránková.

Národní (CZ) přihláška patentu ÚPV č.: PV 2017-756 „Cirkulační chladicí zařízení s termoelektrickým chladicím jádrem se zvýšenou účinností tepelného přenosu“ – zatím nezveřejněná. Původci: **Dejmek**, Bolek.

Národní (CZ) přihláška patentu ÚPV č.: ÚPV č.: 2011-863, „Cirkulační chladicí přístroj na bázi Peltierových článků“, zveřejněná dne 3. 7. 2013. Původci: Bolek, Petránková, **Dejmek**, Beneš, Růžička.

### Užitné vzory

Národní (CZ) užitný vzor ÚPV číslo: 31500 na technické řešení „Cirkulační chladicí zařízení s termoelektrickým chladicím jádrem se zvýšenou účinností tepelného přenosu“ publikovaný dne 20. 2. 2018 (přihlášeno dne 27. 11. 2017). Původci: **Dejmek**, Bolek.

Národní (CZ) užitný vzor ÚPV číslo: 28967 na technické řešení „Termoelektrický tepelný výměník s integrovaným rezervoárem“ publikovaný dne 23. 12. 2015. Původci: Bolek, **Dejmek**.

Národní (CZ) užitný vzor ÚPV číslo: 27799: „Mobilní hyperbarická minikomora“ publikovaný dne 18. 2. 2015. Původci: Kolářová, Bajgar, Tománková, Bolek L, **Dejmek**, Bolek M, Růžička, Beneš.

Národní (CZ) užitný vzor ÚPV číslo: 23844 na technické řešení „Cirkulační chladicí přístroj na bázi Peltierových článků“ publikovaný dne 30. 5. 2012. Původci: Bolek, Petránková, **Dejmek**, Beneš, Růžička.

Národní (CZ) užitný vzor ÚPV číslo: 22661 na technické řešení „Tepelný výměník s laminarizérem“ publikovaný dne 14. 9. 2011. Původci: Bolek, **Dejmek**, Růžička, Beneš, Petránková.

### Funkční vzorek

Přístroj „Device for in – vivo blood cooling of bigger laboratory animals“. Proveden kompletní vývoj a výroba v druhé polovině r. 2009 a první polovině r. 2010. Přístroj prodán za cenu 13.000€ (zisk fakulty cca 5.000€) v r. 2010 na Universitätsklinikum Ulm, Sektion Anasthesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Parkstrasse 11, Ulm 89073, DE. Doložitelné písemnou i fotografickou dokumentací. Původci: Bolek, Petránková, Růžička, Beneš, **Dejmek**.