

MIKROHYPERBARIE – MOŽNOST STUDIA BUNĚČNÉHO METABOLISMU V ODLIŠNÝCH FYZIKÁLNÍCH PODMÍNKÁCH

J. Dejmek^{1,2}, M. Čedíková^{2,3}, L. Bolek^{1,2}, M. Marková^{2,3},
V. Babuška⁴, J. Kuncová^{2,3}

¹ Ústav biofyziky, ² Biomedicínské centrum, ³ Ústav fyziologie, ⁴ Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

První dokumentované použití hyperbarické terapie je datováno do r. 1662 a přisuzováno britskému lékaři a duchovnímu Henshawovi. Komora, kterou vyvinul, byla vzduchotěsná místnost, ve které bylo možno měnit klimatické a tlakové podmínky. Tato komora měla napomáhat ke kvalitnímu trávení, odkašlávání či ulehčovat dýchání a působit preventivně proti nejruznějším plicním onemocněním. Bohužel se tato terapie neujala a na další rozvoj musela hyperbarická terapie počkat až do r. 1834, kdy francouzský lékař Junod sestavil hyperbarickou komoru, kde užíval přetlak od 2 do 4 atmosfér k léčbě nejruznějších plicních onemocnění (1). V dnešní době je normobarická i hyperbarická oxygenoterapie běžně používaná podpůrná léčebná metoda a na možnostech jejího dalšího uplatnění probíhá usilovný výzkum. Velké uplatnění našla oxygenoterapie např. při léčbě chronických ran a bércoých vředů, hidradenitis suppurativa a dalších kožních eflorescencí (2–4), při léčbě tinitu (5), otravě oxidem uhelnatým (6), dále také u celé řady neurologických chorob (7), je nedílnou součástí hloubkového potápění a hlavním léčebným prostředkem v případech dekompresní choroby (10), apod. Přestože se jedná o běžně a hojně užívanou léčbu, v odborné literatuře není dostatek podkladů pro plné pochopení biologických dějů, které v buňkách při odlišných fyzikálních podmínkách probíhají. Není tedy jasné, jak buňky a systémy reagují na nefyziologickou úroveň rozpuštěného kyslíku v krvi. Navíc nejsou k dispozici vhodné nástroje k vytvoření podmínek pro studium těchto buněčných dějů *in vitro*. Tento typ experimentů fakticky nelze v klasických hyperbarických komorách provádět. Mají velký objem v jednotkách krychlových metrů, což je při potřebě vytvoření specifické atmosféry jednak nákladné a zároveň zákon neumožňuje tato zařízení plnit koncentrací kyslíku vyšší než 22,5 % objemového množství. Komory jsou navrhovány pro dosahování nízkých pracovních tlaků (běžně max. 3 ATA). Velkým problémem je jejich teplota na teploty vhodné ke kultivaci buněčných linií (37 °C), neboť jsou konstrukčně určeny pro pacienty (23–25 °C). A neméně významným problémem je vytížení takovéhoho zařízení v rámci léčebné terapie. Aby bylo možné se na studium vlivu odlišných fyzikálních podmínek na buněčný metabolismus na buněčné úrovni zaměřit, bylo nutné vyvinout zcela novou a unikátní technologii, která by výzkum umožnila. Spolupráce Ústavu biofyziky Lékařské fakulty v Plzni a Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci vyústila v úspěšné řešení projektu Preseed, v rámci kterého byla vyvinuta nová koncepce experimentálního tlakového zařízení, která dostala

název mikrohyperbarická komůrka. Technologie je v současné době ochráněna národním patentem č. 305989.

Cílem našeho pilotního pokusu bylo vyzkoušet, zdali je možné buněčné kultury v této komůrce kultivovat a jak ovlivňuje zvýšený pO_2 růst buněčné linie plicních fibroblastů HFL1.

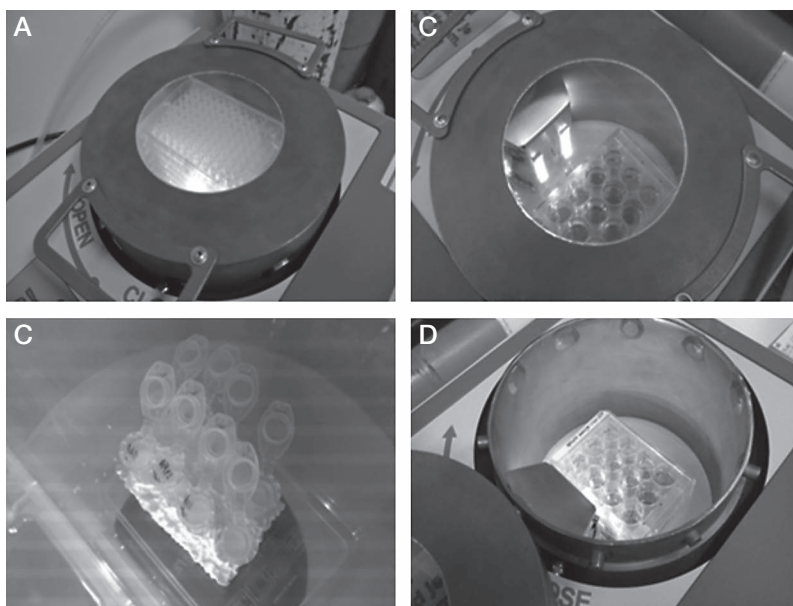
MATERIÁL A METODIKY

Hyperbarická komůrka

Mikrohyperbarická komůrka s označením uHBK2 je malých rozměrů (obr. 1). Má válcový vnitřní profil s užitečným průměrem 22 cm, výškou 20 cm a objemem 6,5 l. Maximální pracovní přetlak je 1,5 MPa. Plnění probíhá dvěma nezávisle regulovatelnými vstupy plynů a jedním regulovaným výstupem. Má regulovanou teplotu vnitřních prostor s rozsahem -5 až $+70$ °C (při použití nemrznoucí kapaliny) a rychlost teplotní změny vnitřního prostředí je až $0,5$ °C/s (v závislosti na výkonu temperačního zařízení). Konstrukční řešení umožňuje přímé pozorování vnitřního prostoru díky průzoru ve víku (obr. 2). Mezi další užitečné vlastnosti lze zahrnout možnost bezkontaktního magnetického míchání ve vnitřních prostorách komůrky s plynulou regulací otáček, datové propojení s vnitřním prostorem zajištěné až 8 datovými linkami, možnost napájení spotřebičů 12/24VDC. Barevný dotykový ovládací panel umožňuje měření vnitřního tlaku a aktuální změny tlaku (kPa/s), umožňuje nezávislé měření tří teplot (PT100), lze jím přímo regulovat osvětlení vnitřních prostor a výkon vnitřní ventilace. Dále je umožněn záznam minimálních a maximálních hodnot, zvuková signalizace při překročení limitních hodnot, kalibrační korekce zobrazovaných měřených hodnot. Záznam vybraných měřených parametrů je možné uložit na SD kartu.



Obr. 1 Mikrohyperbarická komůrka uHBK2



Obr. 2 A, B, C, D – Pohledy do vnitřních prostor hyperbarické mikrokomůrky

Složení atmosféry pro kultivaci

Buňky byly kultivovány za normobarických podmínek v prostředí se zvýšenou koncentrací kyslíku (hyperoxie) – směs CARBOGEN 5% (95 kPa pO₂ a 5 kPa pCO₂), teplota byla stabilně regulována na hodnotu 37 °C a vnitřní tlak byl 1 ATA.

Kultivace buněk a jejich expozice normobarické hyperoxii

Pro pilotní studii byla vybrána buněčná linie fibroblastů HFL1 (ATCC® CCL153™). Buňky byly kultivovány v médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) doplněném o L-Glutamin, 10% FBS (fetální bovinní sérum) a 1% antibiotika (streptomycin a penicilin).

Buňky byly rozděleny do dvou skupin, kdy první byla exponována v mikrohyperbarické komůrce normobarické hyperoxii (37 °C; 95 kPa pO₂ a 5 kPa pCO₂) vždy 2 h po dobu 5 dní. Po expozici byly buňky přesunuty zpět do inkubátoru do další expozice. Kontrolní skupina byla kultivována ve stabilních podmínkách inkubátoru (37 °C a 5 kPa pCO₂).

Proliferace buněk

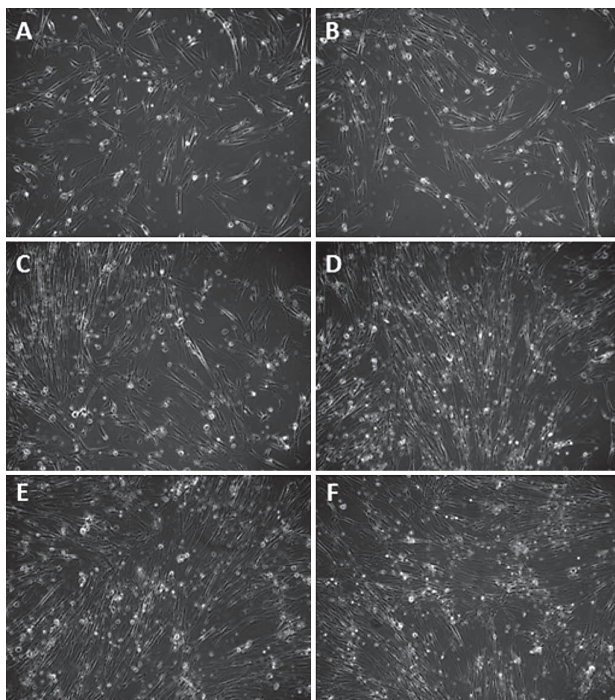
Exponované i kontrolní buňky byly sklizeny každých 24 h (vždy před další expozicí normobarické hyperoxie) a jejich počet spočítán v Bürkerově komůrce. Tyto hodnoty indikovaly trend jejich růstu za předešlých 24 hodin kultivace. Počty buněk byly statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu ($p < 0,05$ bylo považováno za statisticky signifikantní). Po samotné dvouhodinové expozici bylo provedeno další sklizení buněk (opět u obou skupin).

Cílem bylo zjistit, zda nedochází k významnému umírání buněk následkem expozice. Průměrné počty buněk byly vyneseny do grafu. Synchronně byly buňky dokumentovány i fotograficky a to z důvodu porovnání morfologie jejich růstu, tedy, zda či jak se charakter růstu ovlivněných buněk odlišuje od kontrol.

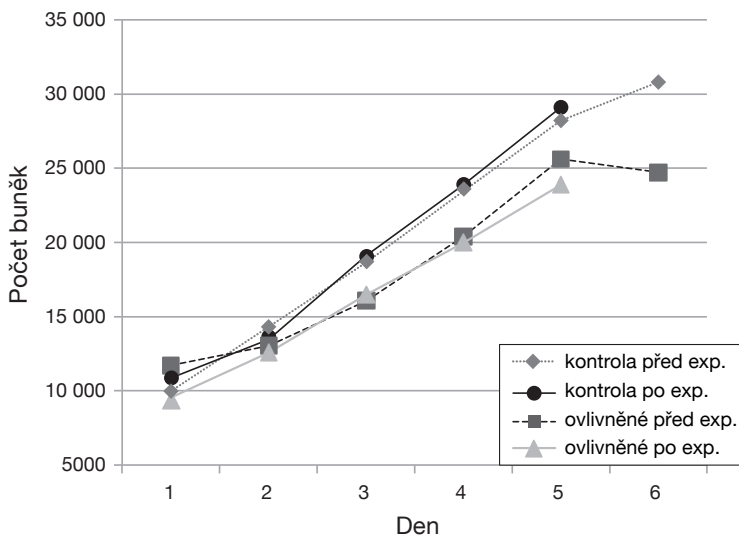
VÝSLEDKY

Buňky v mikrohyperbarické komůrce je možné bez problémů kultivovat. Komůrka je tedy využitelná pro *in vitro* experimenty s nejrůznějším složením atmosféry za normálních i hyperbarických podmínek (normoxie, hypoxie, hyperoxie, normokapie, hypokapie, hyperkapnie).

V našem pilotním experimentu s vystavením buněčné linie fibroblastů normobarické hyperoxii (2 hodiny po dobu 5 dní) nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v počtu buněk oproti kontrolní skupině buněk. Obě skupiny buněk vykazovaly shodný růstový trend v počátku experimentu, ke konci se však od sebe mírně odkláněly (po 5. expozici). Charaktery jednotlivých růstových křivek jsou patrné z grafu 1. Z grafu je dále patrné, že



Obr. 3 Porovnání charakteru růstu buněčné linie HFL1. A, C, E – buňky exponované normobarické hyperoxii ve dnech 0 (A), 3 (C) a 5 (E); B, D, F – buňky kontrolní – neexponované normobarické hyperoxii ve dnech 0 (B), 3 (D) a 5 (F)



Graf 1 Růstová křivka kontrolních a ovlivněných HFL1 normobarickou hyperoxií

nedocházelo ani k významnému umírání buněk následkem jejich expozice normobarické hyperoxií (porovnání křivky před a po ovlivnění). Morfologický vzhled kultivovaných buněk je ukázán na obrázku 3, ani zde jsme nezaregistrovali žádnou vzájemnou rozdílnost charakteru buněk.

DISKUZE A ZÁVĚR

Účinky hyperoxie na buněčné úrovni jsou stále velkou neznámou. Nedostatek publikací a známých informací nás vede k závěru, že je tato oblast základního výzkumu vědecky zajímavá a má smysl v ní pokračovat. Naše pilotní výsledky naznačují, že by mohlo docházet k ovlivnění buněčné proliferace, nevíme však zatím, jaký mechanismus se za touto skutečností skrývá. Může například docházet k ovlivnění mitochondrií uvnitř buněk a tedy ke změnám v buněčném metabolismu (8, 9).

SOUHRN

Hyperbarická a normobarická oxygenoterapie je v současné době běžně používanou podpůrnou metodou, která našla velké uplatnění při léčbě mnoha onemocnění. I přes značné využití této metody v léčebné praxi, postrádáme dostatek podkladů v odborné literatuře, který by umožnil plné pochopení biologických dějů probíhajících v buňkách při odlišných fyzikálních podmínkách. Cílem naší studie bylo primárně zjistit, zda je možné

kultivovat buňky ve speciálně sestrojené mikrohyperbarické komůrce a následně studovat vliv zvýšeného pO₂ na růst buněčné linie plicních fibroblastů HFL1.

Microhyperbaria – the possibility of cell metabolism research in different physical conditions

SUMMARY

Hyperbaric and normobaric oxygen therapy is currently routinely used supporting method which founded widely use in treating of many diseases. Despite of the considerable use of this method in medical practice, we are lacking sufficient background material in the literature which allows us full understanding of biological processes taking place in cells under different physical conditions. The aim of our study was primarily to find out whether it is possible to cultivate cells in a specially constructed microhyperbaric chamber and then study the effect of increased pO₂ on the growth of the HFL1 pulmonary fibroblast cell line.

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno z Národního program udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy, programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39) a „CZ.1.05/3.1.00/14.0307 – Nové technologie UP v biomedicíně“.

LITERATURA

1. Jain K. K.: Textbook of Hyperbaric Medicine. Springer; 2016: 660. – 2. Yildiz H., Senol L., Ercan E. et al.: A prospective randomized controlled trial assessing the efficacy of adjunctive hyperbaric oxygen therapy in the treatment of hidradenitis suppurativa. *Int. J. Dermatol.* 55 (2), 2016: 232–7. – 3. Han G., Ceilley R.: Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv. Ther.* 34 (3), 2017: 599–610. – 4. Borab Z., Mirmanesh M. D., Gantz M. et al.: Systematic review of hyperbaric oxygen therapy for the treatment of radiation-induced skin necrosis. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic. Surg. JPRAS.* 70 (4), 2017: 529–38. – 5. Holy R., Prazenica P., Stolarikova E. et al.: Hyperbaric oxygen therapy in tinnitus with normal hearing in association with combined treatment. *Undersea Hyperb. Med. J. Undersea Hyperb. Med. Soc. Inc.* 43 (3), 2016: 201–5. – 6. Rose J. J., Wang L., Xu Q. et al.: Carbon Monoxide Poisoning: Pathogenesis, Management, and Future Directions of Therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195 (5), 2017: 596–606. – 7. Al-Waili N. S., Butler G. J., Beale J. et al.: Hyperbaric oxygen in the treatment of patients with cerebral stroke, brain trauma, and neurologic disease. *Adv. Ther.* 22 (6), 2005: 659–78. – 8. Resseguie E. A., Staversky R. J., Brookes P. S. et al.: Hyperoxia activates ATM independent from mitochondrial ROS and dysfunction. *Redox Biol.* 2015: 176–85. – 9. Lichardusova L., Tatarkova Z., Calkovska A. et al.: Proteomic analysis of mitochondrial proteins in the guinea pig heart following long-term normobaric hyperoxia. *Mol. Cell Biochem.* 2017 Apr 21; 10. Moon R. E.: Hyperbaric oxygen treatment for decompression sickness. *Undersea Hyperb. Med.* 41 (2), 2014: 151–7.

Adresa autora: J. D., alej Svobody 76, 323 60 Plzeň