

**MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Vliv hyperbarického kyslíku na hojení rány
experimentální studie**

HABILITAČNÍ PRÁCE

MUDr. Petr Chmátal, Ph.D., MBA

Brno 2020

Abstrakt

Úvod

Podávání kyslíku v přetlakové komoře – hyperbarická oxygenoterapie – a její možný pozitivní účinek na hojení ran a tkáňových defektů se teoreticky, experimentálně i klinicky řeší dlouhou dobu. Stejnou dobu se vrší odborné argumenty pro i proti této léčebné metodě. Prvním důvodem polemik je obtížná orientace ve velmi složitých a komplexních pochodech metabolismu kyslíku a jeho reaktivních substancí na molekulární úrovni, včetně následné projekce těchto pochodů do buněčné biologie. Nelze zde uplatnit jednoduchý postup hodnocení: příčina versus následek. Druhým důvodem je nedostatek prací podle přísných pravidel správného vědeckého výzkumu. Podle desátého evropského konsenzu hyperbarické medicíny (Lille 2016) je tato problematika na úrovni „level of evidence C“. Cílem předkládané práce bylo v experimentu prokázat možný pozitivní efekt přetlakového kyslíku na hojení rány. Využity byly nejnovější poznatky o genové expresi v buněčném metabolismu i standardní imunohistochemická a makroskopická hodnocení.

Metoda

K experimentu byl využit certifikovaný druh králíka *Oryctolagus cuniculus* (n – 36) chovaný za definovaných laboratorních podmínek. Zvířata byla randomizována do tří skupin. Každému zvířeti byly operačně způsobeny definované čtyři kožně podkožní ztrátové rány nad hřbetní svalovinou. Skupina A (n – 12) byla exponována hyperbarickým kyslíkem (HBOT) 2x denně 90 minut při tlaku 2,5 bar od druhého do osmého dne po traumatu. Skupina B (n – 12) byla exponována HBOT 1x denně 90 minut při tlaku 2,5 bar od druhého do osmého dne po traumatu. Skupina C (n -12) exponována HBOT nebyla. Hojení rány bylo sledováno a porovnáváno makroskopicky. Tři hojící se rány každého zvířete byly postupně excidovány a to 4, 7. a 10. den po způsobeném traumatu. Excidovaná tkáň rány byla podrobena histologickému, imunohistochemickému vyšetření a celogenomové analýze genové exprese. Experiment byl ukončen po úplném zahojení čtvrté neodebírané rány. Byly vyhodnoceny výsledky získané analýzou odebraných vzorků a pozorováním. Bylo provedeno statistické porovnání mezi jednotlivými skupinami.

Výsledky

Výsledky histologického a imunohistochemického hodnocení hojících se ran neprokázaly, že by hyperbarická oxygenoterapie aplikovaná po osm pooperačních dní v režimu jednou a

dvakrát denně při tlaku 2,5 bar po 90 minut ovlivnila rychlost hojení ran na hřbetě zdravých králíků při porovnání s kontrolní skupinou. Mezi časovými intervaly v rámci skupin bylo možné zaznamenat pouze změny dané postupným hojením ran. Celogenomová analýza expresí mRNA v hojících se ranách neprokázala, že by hyperbaroxická oxygenoterapie aplikovaná po osm pooperačních dní v režimu dvakrát denně při tlaku 2,5 bar po 90 minut ovlivnila hojení ran na hřbetě zdravých králíků v porovnání s kontrolní skupinou. Srovnání rozdílů v expresi genů ukázalo, že poranění zvířete vedlo k zvýšení exprese řádově stovek genů, jak u léčených, tak u kontrolních zvířat. Žádný významně odlišný trend v expresi těchto genů mezi léčenými a neléčenými zvířaty v průběhu hojení však nebyl nalezen.

Závěr

Experiment nepotvrdil předpokládané rozdíly v imunohistochemickém hodnocení hojících se ran mezi skupinami exponovanými HBOT a skupinou neexponovanou. Experiment nepotvrdil předpokládané rozdíly v genomové analýze expresí mRNA v hojících se ranách mezi skupinami exponovanými HBOT a skupinou neexponovanou. Experiment nepotvrdil literární zprávy o významu HBOT v hojení akutní rány.

Klíčová slova

Hyperbarická oxygenoterapie – akutní rána – hojení rány – genové exprese – analýza microarrayí – histopatologie rány

Abstract

Introduction

The application of oxygen in a pressure chamber - hyperbaric oxygen therapy - and its possible positive effect on the healing of wounds and tissue defects have been theoretically, experimentally and clinically researched for a long time. At the same time, scientific arguments for and against this treatment method are submitted. The first reason for the controversy is the difficult orientation in very difficult and complex processes of oxygen metabolism and its reactive substances at the molecular level, including the subsequent projection of these processes into cell biology. A simple evaluation procedure: cause versus consequence; cannot be applied here. The second reason for the controversy is the lack of studies according to the strict rules of scientific research. According to the Tenth European Consensus of Hyperbaric Medicine (Lille 2016), this issue is at the "level of evidence C". The aim of the present work was to verify the discussed positive effect of pressurized oxygen on wound healing in an experiment. The latest knowledge on gene expression in cellular metabolism as well as standard immunohistochemical and macroscopic evaluations were used.

Methods

For the experiment a certified species of rabbit *Oryctolagus cuniculus* (n - 36) bred under defined laboratory conditions was used. The animals were randomized into three groups. Four defined subcutaneous skin subcutaneous wounds above the dorsal muscle were surgically caused to each animal. Group A (n - 12) was exposed to hyperbaric oxygen (HBOT) twice a day for 90 minutes at a pressure of 2.5 bar from the second to the eighth day after the trauma. Group B (n - 12) was exposed to HBOT once a day for 90 minutes at a pressure of 2.5 bar from the second to the eighth day after trauma. Group C (n -12) was not exposed to HBOT. Wound healing was monitored and compared macroscopically. The three healing wounds of each animal were excised on days 4, 7 and 10 after the trauma. The excised wound tissue was subjected to histological, immunohistochemical examination and whole genome analysis of gene expression. The experiment was terminated after complete healing of the fourth wound. The results obtained by analysis of the samples and observation were evaluated. A statistical comparison was made between the groups.

Results

The results of histological and immunohistochemical evaluation of healing wounds did not show that hyperbaric oxygen therapy applied for eight postoperative days once and twice daily at 2.5 bar for 90 minutes affected the rate of wound healing on the backs of healthy rabbits compared to control group. Between the time intervals within the groups, it was possible to record only changes due to the gradual healing of wounds. Whole genome analysis of mRNA expression in healing wounds did not show that hyperbaric oxygen therapy applied for eight postoperative days twice daily at 2.5 bar for 90 minutes affected wound healing in the backs of healthy rabbits compared to control group. Comparison of differences in gene expression showed that animal injury resulted in increased expression of hundreds of genes in all three study groups. However, no significantly different trend in the expression of these genes between treated and untreated animals during healing was found.

Conclusion

The experiment did not confirm the predicted differences in immunohistochemical evaluation of healing wounds between the HBOT-exposed and non-exposed groups. The experiment did not confirm the expected differences in genomic analysis of mRNA expression in healing wounds between HBOT-exposed and non-exposed groups. The experiment did not confirm the literature reports on the importance of HBOT in acute wound healing.

Key words

Hyperbaric oxygen therapy – acute wound – wound healing – gene expression – microarray analysis – wound histopathology

OBSAH

1 Úvod	4
2 Cíl práce	7
3 Role kyslíku v metabolismu a souvislost s hojením	8
3.1 Dýchací řetězec – zdroj energie	8
3.2 Reaktivní formy kyslíku (ROS) a jejich účinky	10
3.3 Hypoxie a procesy na buněčné úrovni	13
4 Léčba hyperbarickým kyslíkem a hojení rány – současný stav výzkumu	15
5 Experimentální práce hodnotící vliv HBOT na hojení ran	19
6 Materiál a metodika	23
6.1 Popis experimentu	23
6.2 Zvířecí model	23
6.3 Modelace poranění	25
6.4 Aplikace hyperbarické oxygenoterapie (HBOT)	27
6.4.1 Technické podmínky expozice	27
6.4.2 Provedení hyperbarické oxygenoterapie (HBOT)	29
6.4.3 Organizace HBOT pro expoziční skupiny	31
6.5 Fyziologie pokusných zvířat při expozici	32
6.6 Odběr materiálu	33
6.7 Euthanasie	34
6.8 Histologické a imunohistochemické hodnocení	34
6.8.1 Materiál k zpracování	34
6.8.2 Barvení a imunochemické zpracování preparátu	34
6.8.3 Hodnocení vzorků	36
6.8.4 Statistické zpracování histologických a imunohistochemických výsledků	39
6.9 Celogenomová analýza genové exprese	39
6.9.1 Izolace RNA	40
6.9.2 Syntéza aRNA, hybridizace aRNA na cDNA mikročipy	40
6.9.3 Zpracování dat	41
6.9.3.1 Srovnání rozdílů v expresi mezi skupinami	41

6.9.3.2 Analýza genových ontologií (GO)	41
7 Výsledky	42
7.1 Histologické a imunohistochemické vyšetření	42
7.1.1 Histopatologického skóre hojení povrchového epitelu	42
7.1.2 Délka a plocha epidermálních listů	43
7.1.3 Vzdálenost epidermálních listů	43
7.1.4 Mitotická aktivita na vrcholu epidermálních listů	44
7.1.5 Histopatologické skóre hojení vaziva	44
7.1.6 Histopatologické skóre zánětu	45
7.1.7 Počet mikroabscesů v ráně	46
7.1.8 Celkové histopatologické skóre hojení ran	46
7.1.9 Detekce CD34 pozitivních buněk	47
7.2 Celogenomová analýza	47
7.2.1 Celkové srovnání vzorků mezi sebou – PCA, hierarchické klastrování	47
7.2.2 Procesy zvýšené v ranách oproti kůži (analýza genových ontologií)	49
7.2.3 Porovnání vzorků exponované a kontrolní skupiny v odběrových dnech	55
7.2.4 Průběh exprese v ranách vybraných genů	66
7.2.4.1 Zánět	66
7.2.4.2. Produkce mezibuněčné hmoty	67
7.2.4.3 Angiogeneze	68
7.2.4.4 Oxidační stres	69
7.2.4.5 Proliferace a diferenciacce	70
7.2.5 Závěr celogenomové analýzy	70
8 Vyhodnocení	71
8.1 Výsledky histologického a imunohistochemického hodnocení	71
8.2 Celogenomová analýza expresí mRNA	71
8.3 Průběh experimentu	71
9 Diskuze	72
10 Závěr	75
11 Literatura	76
12 Seznam zkratk.....	88

13 Seznam obrázků.....	89
14 Seznam Tabulek.....	90
Příloha č. 1	91
Příloha č. 2	92
Příloha č. 3	95
Příloha č. 4	101

1 ÚVOD

Podávání kyslíku v přetlakové komoře s možným pozitivním účinkem na hojení ran a tkáňových defektů se teoreticky, experimentálně i klinicky řeší dlouhou dobu, stejně tak dlouho se vrší odborné argumenty pro i proti této léčebné metodě.

První léčebné pokusy s hyperbarickým vzduchem se datují do druhé poloviny 19. století. V roce 1879 publikoval své zkušenosti francouzský chirurg Fontaine, který sestrojil a v léčbě využíval mobilní hyperbarickou komoru (1). Tuto komoru využíval ke svým operacím i známý francouzský chirurg Péan, na základě získaných zkušeností plánoval vybudování velkého chirurgického amfiteátru pro 300 osob. Vývoj přerušila dekompresní nehoda se smrtí doktora Fontaina. Ve stejném období byly postulovány (Bert, Lavoisier, Haldan) přístupy k léčbě kyslíkem i rizika jeho toxicity při podávání ve vyšších než atmosférických koncentracích, tzv. Bertův efekt (2).

Moderní éru hyperbarické oxygenoterapie zahájili chirurgové v šedesátých letech dvacátého století. Mezi průkopníky patřil kardiochirurg Boerema a chirurg Ledingham. Profesor Boerema shrnul své zkušenosti v publikaci s názvem „Life without blood“ (3) vydané v roce 1960 a vyvolal tím široký mezinárodní zájem. Následně byla vybudována řada hyperbarických zařízení po celém světě, včetně našeho území (Ostrava 1965, Praha 1966). Došlo k vývoji a výzkumu této metody ve všech oblastech medicíny, definovala se indikační kritéria, ověřovala se účinnost u více než šedesáti onemocnění.

Chirurgické využití léčby hyperbarickým kyslíkem po úvodním optimizmu provází kontroverze. Proto není, i přes obecně kladný názor na její použití v léčbě ran a tkáňových defektů, metoda v praxi běžně využívána. Podle desátého evropského konsenzu (konference v Lille 2016) je tato problematika zatím na úrovni „level of evidence C“ (4).

Jednou z příčin polemik je obtížnost orientace ve velmi složitých a komplexních pochodech metabolismu kyslíku a jeho reaktivních substancí na molekulární úrovni, včetně následné projekce těchto pochodů do buněčné biologie. Nelze zde uplatnit jednoduchý postup hodnocení: příčina versus výsledek.

Druhou příčinou polemik je nedostatek prací podle přísných pravidel správného vědeckého výzkumu.

Dosavadní publikované práce konstatují, že hyperbarický kyslík pravděpodobně zlepšuje podmínky buněčné fyziologie a tkáňové regenerace. Vede tím ke zrychlenému a méně

komplikovanému hojení rozsáhlých ran, včetně chirurgických rekonstrukcí, a to především u zdravých jedinců s nepoškozeným mikro a makro cévním zásobením. Přehledové analýzy publikovaných prací i konsenzus na indikaci hyperbaroxické léčby (4,5,6) se ale jednoznačně shodují na potřebě dalších a přesně postavených studií ke zvýšení „level of evidence“. Limitací tohoto požadavku je omezený počet pracovišť, která jsou schopna poskytnout adekvátní expozici, a jak již bylo uvedeno nedostatek přesných informací o vlivu zvýšeného parciálního tlaku kyslíku v tkáni.

Neuzavřenost problému a potřeba dalšího výzkumu je dokumentována i poslední přehlednou analýzou publikovaných prací, kterou vydal tým vědců z rotterdamské univerzity a holandských výzkumných ústavů v průběhu našeho experimentu (7).

Z hlediska hodnocení účinku hyperbarického kyslíku na živé tkáně je možné problém uchopit ze dvou stran. Lze mapovat biochemické změny známých mediátorů buněčných pochodů. Ty vytváří celé kaskády dosud ne plně vysvětlených a vzájemně se ovlivňujících procesů. Jsou týmy, které se pokusily jít touto cestou. V biochemii hojení ran nicméně zbývá tolik nejasností, že výsledky není možno jednoznačně interpretovat. Druhou možností je zaměřit se na hodnocení výsledku po stránce morfologické s využitím nových poznatků z oblasti patologie, histopatologie a případně s využitím současných poznatků z oblasti genové morfologie a genové aktivace nebo potlačení (suprese). Vize předložené práce byla dojít k závěru touto cestou.

Hyperbarickou léčbou se dlouhodobě zabývá Ústav leteckého zdravotnictví v Praze, který využívá vlastní přetlakovou komoru. V projektu se spojil potenciál Ústavu leteckého zdravotnictví a Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové, jež je nositelem znalostí v oblasti traumatologie a válečné medicíny. Výzkum prvotně směřoval k možnostem využití kyslíkového přetlaku v léčbě devastujících válečných poranění. Soudobé prostředky používané k likvidaci protivníka (nástražné systémy, výbuchy atentátníků) způsobují rozsáhlá ztrátová a devastující poranění trupu a končetin. První fáze ošetření je spojena s urgentní chirurgií a postupy intenzivní resuscitace. V druhé fázi je třeba zhojit utrpené tkáňové devastace. Tato fáze může být velmi dlouhá. Limituje tak resocializaci rekonvalescenta a znamená mimo jiné též vysoké náklady spojené s léčbou.

Odhlédneme-li od akutní traumatologie, rány a jejich hojení znamenají velký problém i v oblasti všeobecné medicíny. Náklady na jejich hojení představují až 4% všech výdajů ve

zdravotnictví (8,9,10). Toto procento může dále narůstat díky nárůstu diabetických, venžních a ischemických defektů.

Metody a postupy urychlující proces hojení jsou pro výše uvedené důvody dlouhodobě hledáčku všech týmů zabývajících se válečnou traumatologií a traumatologií obecně, tak i středem zájmu managementu zdravotnictví z pohledu ekonomizace léčebných nákladů.

2 CÍL PRÁCE

Cíl práce: prokázat pozitivní vliv přetlakového podávání kyslíku (hyperbaric oxygen therapy – HBOT) na hojení rány.

Praktické využití: zavedení metody do klinické praxe ve válečné i civilní traumatologii.

Metoda: experiment na zvířeti s použitím vyšetření genových expresí a imunohistochemických metod hodnocení materiálu.

3 ROLE KYSLÍKU V METABOLIZMU BUNĚK A SOUVISLOST S HOJENÍM

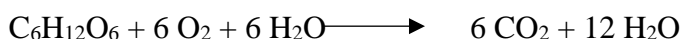
Kyslík je k buňkám organismu dopravován dvěma způsoby. Transportním mechanismem zprostředkovaným hemoglobinem a rozpuštěný v tekutině podle tlakových gradientů. Jedinou možností, jak navýšit přítomnost kyslíku ve tkáních po nasycení transportní kapacity hemoglobinu je zvýšení jeho parciálního tlaku v zevním prostředí.

Ve tkáních je kyslík užít v buněčném dýchání, jehož konečným výsledkem je energetický zisk realizovaný v Krebsově cyklu finální oxidační fosforylací adenosindifosfátu (ADP) na adenosintrifosfát (ATP). Zvýšení energetického potenciálu ve tkáních postižených patologickým procesem bylo dlouho považováno za dominující faktor podporující regeneraci.

V současnosti se v patofyziologii hojení rány za stejně významný moment, jako je buněčné dýchání, považuje oxidační stres a metabolismus reaktivních sloučenin kyslíku – „reactive oxygen species“ (ROS). Tyto sloučeniny vznikají přirozeně ve tkáních, zvýšeně pak v podmínkách stoupajícího parciálního tlaku kyslíku. ROS se řadí mezi volné radikály, látky s nepárovým elektronem v elektronovém obalu, které jsou krátkodobě schopné samostatné existence. Potřeba doplnění párového elektronu způsobuje jejich vysokou reaktivitu. Dlouhodobý oxidační stres a působení volných radikálů se považuje za příčinu řady degenerativních či nádorových nemocí. V krátkodobé expozici spouští složité a v souvislostech velmi komplikované kaskády oxidačních a antioxidačních reakcí, které se z molekulární úrovně přenášejí na buněčnou a orgánovou úroveň. ROS pak slouží jako signální molekuly indukující cytokiny, růstové faktory a hormony (11,12,13,14).

3.1.1 Dýchací řetězec – zdroj energie

Energetický metabolismus buňky je složitý proces, v němž dochází s postupnému rozkladu živin na jednoduché anorganické látky. Zjednodušeně probíhá ve třech fázích. Nejprve je v cytoplasmě buněk rozštěpen energetický zdroj. Následně v jsou citrátovém (Krebsově) cyklu postupnou oxidací a dekarboxylací ze šesti uhlíkové kyseliny citronové uvolněny vodíkové ionty a elektrony, které jsou přeneseny koenzymy NAD^+ a NADH do dýchacího řetězce a využity k oxidační fosforylací adenosindifosfátu na adenosintrifosfát (ATP). Zjednodušeně lze chemický proces vyjádřit rovnicí:

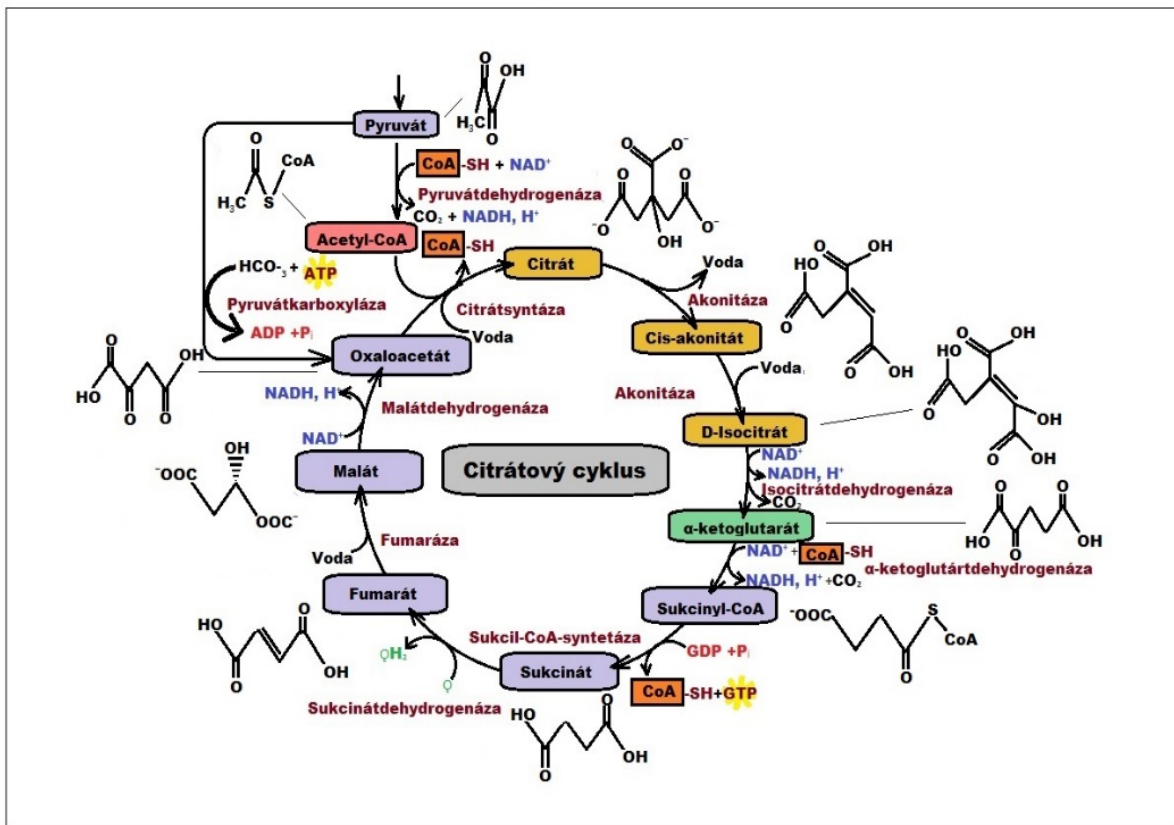


Citrátový (Krebsův) cyklus probíhá v mitochondriální matrix, dýchací řetězec i oxidativní forforylace jsou zakotvené v povrchu mitochondriální membrány. Do mitochondrií vstupuje kyslík, organické látky a adenosindifosfát. Z mitochondrie vystupuje CO_2 , H_2O a ATP.

Účinnost respirace uložením energie do ATP je přibližně 68 %. Zbytek energie je uvolněn jako teplo.

ATP následně volně difunduje v buňce a defosforilytuje se zpět na ADP. Uvolněná energie je použita na syntézu bílkovin, membránový transport, pohyb, přenos podráždění a opět na teplo.

Obr. 1: Schématické znázornění citrátového (Krebsova) cyklu.



3.1.2 Reaktivní formy kyslíku a jejich účinky

Reaktivní formy kyslíku vznikají jako přirozený produkt metabolismu buněk. Molekula kyslíku (O_2) v přirozeném stavu obsahuje dva nepárové elektrony a při její redukci na vodu (H_2O) postupně přijímá čtyři elektrony. V tomto procesu přirozeně vznikají mezistupně, vedlejší produkty (15) s vysokou reaktivitou obsahující nepárový elektron a další reagující látky. Mezi ROS se zahrnují: peroxid vodíku (H_2O_2), který hraje podstatnou roli v řadě reakcí, dále superoxid O_2^- , volná hydroxylová skupina OH^- , superperoxy OOH , peroxidový aniont O^{2-}_2 , kyselinu chlorná $HClO$, singletový kyslík 1O_2 a některé další sloučeniny, včetně sloučenin s dusíkem jako je peroxyinitrát $ONOO^-$.

ROS mohou reagovat s jakoukoliv molekulou organismu a způsobit její oxidační poškození. Převaha volných radikálů ROS se označuje termínem oxidační stres. Poškozením fosfolipidů buněčných membrán vedou ROS k poruše membránového transportu, poškozením nukleových kyselin k mutacím, poškozením bílkovin k enzymovým poruchám. ROS jsou svojí reaktivitou považovány za molekulární příčinu celé řady degenerativních onemocnění, jako jsou ateroskleróza, Alzheimerova choroba, Parkinsonův syndrom, katarakta nebo zhoubné novotvary (16).

Ve fyziologickém stavu je reaktivita ROS eliminována působením antioxidantů, lze mluvit o celém systému antioxidační ochrany. Jde různorodou skupinu látek metabolického i umělého původu, s obtížně definovatelným tříděním. V přirozeném stavu existuje rovnováha mezi produkcí ROS a antioxidanty. Tuto rovnováhu mohou narušit patologické stavy: ROS jsou zvýšeně přítomny v poraněných tkáních, přítomnost ROS se též významně zvyšuje při vzestupu parciálního tlaku kyslíku.

Považuje se též za prokázané, že ROS jsou příčinou O_2 toxicity – Bertův efekt (7), která se může manifestovat plicním poraněním, změnami centrálního nervového systému vedoucími k záchvatu typu grand mal nebo reverzibilní myopii (17). Zároveň a pro účinek hyperbarické oxygenoterapie významně, ROS slouží jako signální molekuly spouštějící regenerační a reparační pochody.

Regulační role ROS se uplatňují ve všech fázích procesu hojení rány. Aktivují povrchový faktor, agregaci destiček a destičkami aktivovaný růstový faktor, ovlivňují kontraktilitu a ovlivňují bariérové funkce endoteliálních buněk (18). Svoji přítomností vyvolávají a potencují zánětlivou reakci (19).

ROS indukují mRNA expresi zánětlivých proteinů 1 α , protein-2 a chemokinu protein-1, které působí chemotakticky a přitahují fagocyty (20,21,22). Do rány pak migrují neutrofilové a makrofágy, které zprostředkovávají časnou imunitní ochranu. Fagocytózou zbavují ránu bakteriální kontaminace a ničí mikroby pomocí proteáz a elastáz v cytoplazmatických granulech. ROS způsobují přestup draslíkových iontů K⁺ do fagocytovaných vakuol se zvýšením jejich pH na optimální úroveň pro účinek proteáz (23,24,25).

Peroxid vodíku generuje molekuly s vysokým oxidačním potenciálem a vysokou baktericidní účinností (26). H₂O₂ za přítomnosti myeloperoxidázy reaguje s chlórem za vzniku kyseliny chlorné, která je silně cytotoxická (27). Myeloperoxidázová reakce je též zdroj reaktivního singletového kyslíku (28). Podobně cytotoxické, díky oxidování buněčných makromolekul (17,29) jsou hydroxylové radikály OH[•] a hydroxylové anionty OH⁻. Ty vznikají při tzv. Fentonově reakci peroxidu a dvojmocného železa: $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH$ (30). Další složka ROS – superoxid je produkována NADPH oxidázou. Ta transportuje elektrony do molekuly kyslíku a produkuje superoxidový radikál.

Vzestup koncentrací ROS je přechodný a snižuje se s migrací fagocytů a aktivací antioxidantních mechanismů (31). Nicméně úloha ROS přetrvává i v proliferační a remodelační fázi hojení rány.

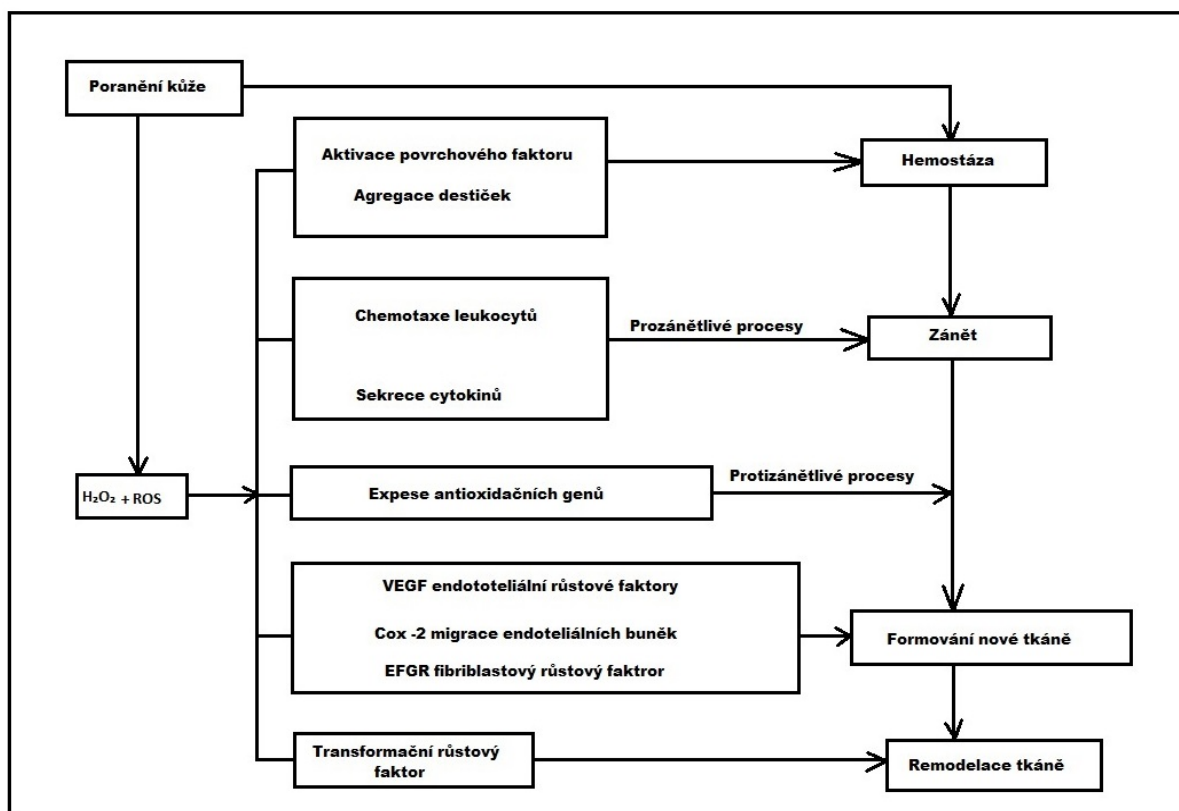
Pro proliferační fázi hojení je klíčová angiogeneze. Peroxid vodíku zvyšuje syntézu cyklooxygenázy v lidských endoteliálních buňkách cells (32). Od Cyklooxygenázy odvozené látky, zejména prostaglandin E2 pak zastávají důležitou roli v migraci endoteliálních buněk do tkání. (33,34). Při pokusech *in vitro*, peroxid vodíku stimuluje makrofágy (35), keratinocyty (36) a hladké svalové buňky cévní stěny (37) k produkci endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který podporuje angiogenezi. Podobně H₂O₂ v nízké koncentraci zlepšuje uvolňování šokových proteinů (HSP70, HSP 90) a fibroblastového růstového faktoru z kultur pěstovaných astrocytů. Výsledkem je zlepšení jejich přežívání, růst a též angiogeneze (13). Proto mají ROS pravděpodobně příznivý účinek nejen na strukturální ale i na funkční stránku hojení.

Pro reepitelizaci rány je důležitá schopnost keratinocytů migrovat z okolí do rány a poté proliferovat. V modelu tržné rány, představované kulturou keratinocytů, nízké koncentrace H₂O₂ (500 μ M) podporují mobilitu buněk bez ztráty jejich životaschopnosti (38). Zlepšují aktivaci růstového faktoru a fosforylaci, která vysvětluje migrační potenciál (38, 39).

V remodelační fázi reaktivní kyslíkové substance narušují rovnováhu mezi metaloproteinázou a tkáňovými inhibitory (40) a vedou tím ke zvýšené produkci transformačního růstového

faktoru (TGF-1) a také k rozšířené proliferaci fibroblastů (41). ROS produkované xantinem a xantinoxidázovým systémem snižují kolagenní a zvyšují glykosaminoglykanovou syntézu v kulturách lidských dermálních fibroblastů (42). H_2O_2 má roli v aktivaci kolagenázy neutrofilů, která může degradovat kolagen v ráně (43).

Obr. 2: schématické znázornění vlivu reaktivních forem kyslíku na hojení rány; upraveno podle Zhu a kol. (14).



3.1.3 Hypoxie a procesy na buněčné úrovni

Hypoxii a její vliv na buněčné pochody shrnul v přehledové práci Choudhury (44).

Ve svém souhrnu ukázal jiný možný pohled na účinek ROS a přeneseně pak i na účinek zvýšeného tlaku kyslíku. Kyslík v buňkách je z 80 % spotřebováván v mitochondriích. Je zde použit jako konečný akceptor elektronu v elektronovém transportním řetězci. Pozorování ukázala, že k funkci mitochondrií stačí velmi malý parciální tlak kyslíku a jeho koncentrace závisí především na velikosti jeho spotřeby (45). Teoretické modely ukazují, že mitochondriální elektronový řetězec v odpovědi na hypoxii snižuje svoji transportní kapacitu a umožňuje mitochondriím udržet homeostázu v širokém rozpětí dodávky kyslíku (46). Tato schopnost není nekonečná. Méně elektronů v cytochromoxidáze znamená méně energie pro tvorbu ATP a energetický deficit pro buňku. Další studie ukazují, že hypoxie ústí v generování volných kyslíkových a dusíkatých radikálů, které v dalších reakcích vedou k buněčné smrti (apoptóze). Mechanismus vzestupu volných radikálů není plně znám, ale je experimentálně potvrzen (47,48). Hypoxii v buňce signalizují proteiny na bázi prolylhydroxylázy, které pak dále hydrolyzují na tzv. „hypoxia – inducible factor“ (HIF). Tento faktor aktivovaný nízkým parciálním tlakem kyslíku vstupuje do buněčného jádra a zde ovlivňuje transkripci řady genů (49,50,51,52). Zvýšení transkripce vede v buňce k přechodu na anaerobní glukózový metabolismus, inhibici lipidového metabolismu a zvýšení lipidových zásob. Zároveň dochází k transkripčnímu navýšení některých proteinů, které inhibují jiné transkripce. Tímto mechanismem dochází ke stimulaci například glykolýzy, ale též produkce erytropetinu, endoteliálního růstového faktoru, destičkového a fibroblastického růstového faktoru (53,54,55). Obdobným způsobem regulace transkripce dochází ke zvýšení produkce buněčných cytokinů. Ty hrají zásadní roli v zahájení lokální zánětlivé reakce i ve startu humorální a buněčné imunitní odpovědi organismu. HIF byl detekován ve všech jaderných buňkách, včetně lidských. Jako vše ve fyziologii buňky, i HIF je regulován kyslík dependentními mechanizmy PHD, které degradují HIF při dostatečné oxygenaci tkáně.

Podle Choudhuryho (44) by pozitivní vliv kyslíku v přetlaku mohl být pochopen následovně. Primární efekt podle něj zahrnuje korekci hypoxie v poškozené tkáni, tím vede k potlačení aktivity HIF a zastavení transkripčních genových změn v buňkách. Sekundární efekt zahrnuje nepřímé souvislosti. Na prvním místě zmiňuje snížení produkce ROS. Dále dochází k vasokonstrikci a angiogenezi, k utlumení zánětlivých procesů a zvýšené schopnosti hojit. To ne zcela koresponduje s prokázaným faktem, že hyperbaroxie zvyšuje koncentraci volných

radikálů ve tkáních. Na druhou stranu je pravděpodobné, že zvýšená koncentrace ROS je přechodná a kyvadlový efekt přináší jejich další redukci.

4 LÉČBA HYPERBARICKÝM KYSLÍKEM A HOJENÍ RÁNY – SOUČASNÝ STAV VÝZKUMU

Od roku 2000 byly publikovány dva systematické přehledy, které se zabývaly výzkumem a zveřejněnými výsledky využití léčby hyperbarickým kyslíkem (HBOT) ke zlepšení hojení rány.

V roce 2003 byl publikován přehled Wanga a kolektivu (56) shromažďující výsledky léčby ran s využitím HBOT, a to pouze u lidí. Přehled shrnoval práce provedené do roku 2001. K vyhledání prací byla užita databáze Medline, akceptovány byly randomizované kontrolované studie, skupinové a případové studie, které zahrnovaly nejméně 5 pacientů a hodnotily užití HBOT a reportovaly klinické výsledky. Do přehledu bylo zařazeno 57 prací, z toho 7 randomizovaných, 16 ne randomizovaných a 34 případových studií. Závěr Wangova přehledu byl, že HBOT může být pomocnou léčbou ran různých příčin a typů (akutní traumatická ischemie, crush, ohrožené skin grafty, osteoradionekrózy, nekrotizující a anaerobní infekce, diabetické defekty). V závěru je ale konstatováno, že obecná metodologická kvalita prací zahrnutých v tomto systematickém přehledu je velmi nízká.

V roce 2017 byl publikován systematický přehled zpracovaný kolektivou chirurgických oddělení univerzit z Rotterdamu a Groningenu pod vedením Gijs de Smeta. Přehled shromažďoval publikovaná data od roku 2001, včetně prací experimentálních (7). Jako zdroje byly využity databáze Embase, Medline, Web of science, Cochrane, PubMed Publisher a Google Scholar libraries. Klinické a experimentální práce byly tříděny a kategorizovány podle druhu léčby, charakteru studie a podle typu rány. Výběr prací splňujících kritéria hodnotitelnosti byl prováděn dvěma nezávislými odborníky, kteří prošli celkem 3 060 publikací, v případě jejich neshody ve výběru bylo o zařazení nebo vyřazení práce diskutováno. Zpracovány byly pouze práce publikované v anglickém jazyce. Při výběru prací autoři přihlíželi na „level of evidence“, popis a metodologickou kvalitu každé studie. Hodnocení kvality, včetně uvedené „level of evidence“, bylo postaveno v souladu s Oxford Center for Evidence Based medicine levels of evidence. Po exaktním výběru bylo do hodnocení zařazeno celkem 66 prací. Tyto práce studovaly působení kyslíku ve třech různých způsobech podání: lokální působení, HBOT a suplementární dýchání kyslíku. Oblast léčby HBOT zahrnovala 29 prací: 12 studií na téma hojení akutní rány, 14 výzkumů hojení chronické rány, 1 studie hodnotící hojení akutní i chronické rány, 2 studie využívající experimentální model.

18 (62%) z výše uvedeného celkového počtu 29 hodnocených výzkumů vykazovalo nejméně jeden pozitivní účinek HBOT. Podle jednotlivých sledovaných parametrů měla HBOT pozitivní

vliv na povrch rány, rychlost uzávěru rány, perfuzi a angiogenezi. „Level of evidence“ hodnocených prací byla ovšem neuspokojující. Dále autoři konstatují, že u chronických ran se pozitivní účinky vytrácely v delším sledování, nebo nebylo delší sledování prováděno. Potvrzena byla zvýšená angiogeneze (7). Doporučení, které vyplynulo z uvedeného systematického přehledu holandských autorů (7) je pokračovat ve výzkumu s cílem získání dalších solidních a konzistentních dat. Závěr obsahuje též konstatování, že nové studie musí použít standardizovaných metod i standardizovaných objektů výzkumu.

V letech 2008 až 2018 bylo publikováno pět randomizovaných kontrolovaných studií, které hodnotily výsledky HBOT u chronických ran (57,58,59,60,61). Nebyla publikována práce o hojení rány akutní. V práci Kaura a kolektivu (57) byl studován vliv HBOT na nehojící se rány. Skupina léčená hyperbarickým kyslíkem vykázala v 56 % případů zmenšení rozsahu rány. Kontrolní skupina vykázala naopak zvětšení rozsahu rány ve 26 %. Po 30 denní léčbě se zcela zhojili 3 z 15 pacientů v HBOT skupině, v kontrolní skupině se nezhojil žádný. Následné kontroly nebyly prováděny. Ostatní práce se orientovaly na hojení chronických diabetických defektů. Löngdahl (58) v práci s 1 rok trvajícím sledováním pacientů došel k výsledku, že skupina léčená HBOT má statisticky významně vyšší počet úplného zhojení rány. K obdobným závěrům došel ve své práci Ma (59), podle kterého redukce rozsahu rány u skupiny pacientů léčené HBOT byla významně vyšší než u skupiny kontrolní. Také podle Duzguna (60) se skupina pacientů s HBOT hojila lépe a případné amputace byly prováděny distálněji, než u skupiny pacientů bez léčby. Též Fedorko (61) ve dvojité slepé, randomizované a kontrolované práci konstatoval benefit HBOT u chronických diabetických defektů, který spočíval ve snížení potřeby velkých amputací. Celkový počet amputací (tj. i periferních) ve sledovaném souboru ale statisticky nevykázal pokles. Sledování bylo prováděno 1 rok.

Starší randomizovanou kontrolovanou prací je studie Abidia a kol. (62). 6 týdenní sledování diabetických pacientů s nehojícími se vředy při léčbě HBOT vykázalo dobré výsledky. Došlo k signifikantnímu zmenšení defektů v léčené skupině oproti skupině neléčené. Dobré výsledky jsou konstatovány i po ročním sledování.

Prospektivní studie, které byly publikovány v posledních dvou dekáдах, se většinou zabývaly chronickými diabetickými defekty. Kalani a kol. (63) se zabýval dlouhodobým účinkem na diabetické trofické vředy. Ve tříletém sledování bylo zhojeno 76 % pacientů ve skupině HBOT oproti 48 % v kontrolní skupině. Nižší byl i počet amputací ve skupině HBOT. Skupina HBOT pacientů však byla signifikantně mladší. Opasanon a kol. (64) pozoroval účinek HBOT na

nehojící se komplex ran u 40 pacientů. Po deseti aplikacích došlo k signifikantnímu zmenšení ran u 16,9 % pacientů. Podle Smeta (7) ale skupina pacientů nebyla homogenní a nebyla zde kontrolní skupina. Obdobně dobré výsledky pozoroval Kessler (65) v prospektivní randomizované studii. 28 pacientů s neischemickými defekty bylo léčeno HBOT. Již po dvou týdnech bylo zmenšení plochy vředu signifikantní oproti kontrolní skupině. Ovšem po 4 týdnech byl výsledek mezi skupinami srovnatelný.

Jedinou prospektivní kontrolovanou prací, studující jiné než chronické rány, byla práce, kterou publikoval Vishwanath (66). Práce zkoumala efekt HBOT na hojení přenesených volných laloků. Sledováno bylo přihojení laloku, otok laloku, venostáza a pooperační rehabilitace. Žádný ze sledovaných parametrů neukázal signifikantní rozdíl mezi skupinou využívající hyperbaroxii a skupinou kontrolní.

Retrospektivní studie z let 2008 až 2018 jsou zaměřením obdobné a též se zabývají především trofickými ischemickými nebo diabetickými defekty (67,68,69,70,71). Závěry jsou s převažujícími pozitivními výsledky při léčbě HBOT.

Z retrospektivních studií publikovaných v uvedeném období je velmi zajímavá práce chorvatských autorů vedených prof. Rojem (72). Studován byl účinek HBOT na hojení a množství bezprostředních komplikací u komplexních válečných poranění horních a dolních končetin. Použita byla data z balkánské války z území Chorvatska a Bosny. Z celkového počtu 1220 pacientů s válečným zraněním, kteří byli léčeni v univerzitním centru ve Splitu, byla podle kritérií charakterizujících trauma identifikována kohorta 388 poraněných. Jednalo se o pacienty s končetinovým poraněním (autor použil klasifikaci Gustillo III A,B,C). Kohorta byla dále stratifikována do čtyř skupin podle závažnosti a konkrétní charakteristiky rány (hodnocena byla ischemie, kompartment syndrom, otevřená zlomenina, poranění cévy, poranění nervu, crush, amputace, počínající infekce). V každé skupině byl porovnáván průběh hojení mezi pacienty při využití nebo nevyužití HBOT. Skupina HBOT obsahovala 99 pacientů, skupina bez HBOT 289 pacientů. Všichni pacienti byli muži, věkový medián 29 let (19 – 59). Hluboká infekce měkkých tkání se rozvinula u 68 % pacientů bez HBOT oproti 35 % pacientů léčených HBOT. Osteomyelitida se rozvinula u 74 % pacientů bez HBOT oproti 63 % léčených HBOT. Odloučení skin graftu se objevilo u 52 % pacientů bez HBOT oproti 23 % pacientů léčených HBOT. Nekróza laloků se objevila u 51 % pacientů bez HBOT oproti 15 % pacientů léčených HBOT. Medián nástupu granulací byl 12 dní u pacientů bez HBOT oproti 9 dnům u pacientů léčených HBOT. Všechny rozdíly byly statisticky významné. Závěr práce konstatoval, že léčení

komplexních válečných poranění v kombinaci chirurgické a adjuvantní HBOT léčby snižuje výskyt hlubokých infekcí měkkých tkání, osteomyelitidy, odloučení skin graftů a nekrózu lalokových přenosů. HBOT dále nezávisle na použité chirurgické strategii významně zkracuje čas stabilizace rány a urychluje čerstvou granulační produkci. Nedostatkem práce bylo, že u aplikací nebyl použit jednotný HBOT režim, jednotný nebyl ani počet HBOT sezení.

5 EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE HODNOTÍCÍ VLIV HBOT NA HOJENÍ RÁNY

Klinické hodnocení hojení rány v humánní medicíně, stejně jako sestavení porovnatelných kohort pacientů, je velmi obtížné. Proto jsou v hodnocení vlivu HBOT významné experimentální studie.

V roce 2000 Sheikh a kol. (73) potvrdil vzestup hladiny endoteliálního růstového faktoru (VEGF) při aplikaci HBOT u krys. Krysy byly randomizovány na HBOT a kontrolní skupinu. Úroveň HBOT odpovídala standardní léčbě: aplikace 90 minut na úrovni 2,1 bar, aplikace probíhala 2x denně s požitím 100% kyslíku po 7 dní. Odběr VEGF probíhal 2., 5. a 10. den po poranění. Hladina VEGF stoupla signifikantně u HBOT (o 40 %) oproti kontrolní skupině 5. den po poranění. Obě skupiny měly stejnou hladinu VEGF 3. den po ukončení HBOT expozice. Autoři uzavřeli práci závěrem, že vzestup VEGF částečně vysvětluje pozitivní účinek HBOT na hojení ran. Druhý závěr práce konstatoval, že hypoxie není nezbytným požadavkem na zahájení produkce VEGF.

Studium aktivace produkce VEGF v různých hladinách kyslíku rozšířila v roce 2005 Hopfová a kol. (74). Experiment proběhl na myších, kterým byla subkutánně aplikována proteinová matrix. Myši byly rozděleny do šesti skupin: hypoxie, normoxie a dále do 4 režimů HBOT s aplikací 90 minut 2x denně (21% kyslíku/1 bar; 100% kyslíku/2 bar; 100% kyslíku/2,5 bar; 100% kyslíku/3 bar). Matrix byla vyjmuta 7. den po implantaci a mikroskopicky byla sledována úroveň neovaskularizace. Angiogeneze byla signifikantně vyšší u všech HBOT skupin.

Třetí práci týmu Harvardské univerzity publikoval Sheikh (75) v roce 2005. Studie prováděná na myších zkoumala, zda opakovaná hyperbaroxická expozice může zvýšit perfuzi ve spodině rány a zda laserové Doppler zobrazení je schopno detekovat a kvantifikovat angiogenezi v ráně, která se objeví při HBOT léčbě. HBOT (n 14) byla aplikována 2x denně s tlakem 2,1 bar po sedm dní. Kontrolní skupina (n 15) exponována HBOT nebyla. Perfuze spodiny rány byla hodnocena 0., 7., a 10. den po poranění. Zranění bylo způsobeno excisí kůže na zádech myší. Krevní průtok v ráně byl signifikantně vyšší 7. a 10. den po poranění ve skupině HBOT, a 10. den ve skupině kontrolní. Porovnání mezi skupinami 10. den po poranění ukázalo statisticky signifikantní rozdíl ve vzestupu perfuze mezi HBOT a kontrolní skupinou (o 20 %).

Ve stejném období publikovali experimenty kolektivy tureckých a chorvatských autorů (73,77). Bilic a kolektiv zkoumali hojení popáleniny krys (n 70) randomizovaných do dvou skupin s

aplikací a bez aplikace HBOT. Lokálně byl k léčení popáleniny užít sulfasalazin, sledován byl popáleninový otok, neoangiogeneze, počet regeneračních folikulů, migrace leukocytů a čas epitelizace. Skupina HBOT vykazala signifikantní snížení popáleninového otoku, zvýšenou angiogenezi, vyšší počet regeneračních folikulů a rychlejší epitelizaci. Nebyl rozdíl v migraci leukocytů. Závěr studie byl, že HBOT může podpořit hojení popáleny.

Dánští autoři (78) zkoumali hojení incizní rány a kožního stěpu u kryš (n 60) randomizovaných dvou skupin. Ke krytí rány byl použit hydrokoloidní obvaz. Aplikován byl 100% kyslík/2,4 bar, 90 minut po 3 pooperační dny. Závěr práce nepotvrdil zlepšené hojení rány při využití HBOT.

Selcuk a kol. (79,80) publikoval dvě práce v letech 2012 a 2013. V první zkoumal hojení kožních laloků na kryšách. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin (každá n 8): kontrolní, HBOT, s aplikací nikotinu, s aplikací nikotinu a HBOT. Histopatologické vyšetření signifikantně prokázalo zvýšenou neovaskularizaci a granulaci u obou skupin HBOT. Druhá práce zkoumala obdobným způsobem hojení popáleninových ran a došla k podobným závěrům.

Zhang (81) testoval změny a přežití kožního laloku u diabetických myš (n 38). Práce takto testovala možnosti využití HBOT ke zlepšení životnosti laloků u humánních diabetických amputací. Operačně byl vytvořen dorzální kožní lalok v celé šíři kůže, podkoží a superficiální fascie. Mezi lalok a dorzální fascii byla vložena nepermeabilní plastická membrána. Myš byly randomizovány do dvou skupin. Jedna skupina byla sledována při normálním pokojovém tlaku, druhé skupině byla aplikována HBOT 90 minut, 2,5 bar po 7 dní. Sledovány byly nekrózy, granulace a neovaskularizace laloku. Autoři konstatovali statisticky nižší výskyt nekroz a vyšší vaskularizaci laloku ve skupině HBOT. V práci je poprvé zmiňována metoda vyšetření exprese mRNA pro VEGF a další angiogenetické faktory, jako potenciální možnost průkazu účinků HBOT.

Kolektiv tureckých autorů vedených Yildirimem (82) zkoumal biochemickou odpověď a histologické nálezy u poraněných myš (n 63) bez léčby, při léčbě HBOT a při aplikaci ozónu. Poranění bylo způsobeno volným pádem 0,5 kg vážící plastické trubky ze 45 cm na označné místo zadní končetiny v úhlu 90 stupňů. Biochemicky byla vyšetřována lipidová peroxidace, superoxid dismutáza, glutathionperoxidáza a hemoxygenáza. Tkáň traumatu byla následně histologicky vyšetřena. Sledován byl otok, zánět a nekróza. HBOT byla aplikována 0., 3. a 7. den, 90 minut, 2,5 ATA. Autoři pozorovali snížení lipidové peroxidace, zmenšení otoku i známek zánětu ve skupinách s aplikací ozónu a HBOT.

Kolektiv univerzitního centra plastické chirurgie z Rotterdamu (83) publikoval experiment s hojením rány u diabetických myší v roce 2014. Jejich experiment, první od dánského pokusu Quriniové a Viidikové (78) z roku 1998 nepotvrdil přínos HBOT. Poranění bylo myším způsobeno ischemií magnetického disku 1,5 cm průměru přiloženého na 16 hodin. Byly vytvořeny dvě skupiny se sledováním 7 dní (n 6) a 29 dní (n 16). V obou skupinách byly myši randomizovány do dvou skupin: s aplikací HBOT a bez aplikace. HBOT byla aplikována 1x denně, 90 minut, 2,5 ATA. Kontrolní skupina byla léčena při normálním tlaku úrovně moře. Zvířata obou skupin byla umísťována do aplikačního boxu. Bylo prováděno makroskopické, histochemické a perfuzní hodnocení. Obě časově rozdílná pozorování (7 a 29 dnů) nevykázala rozdíl ani v jedné z hodnocených modalit. Makroskopicky byl rozdíl v rozsahu zhojení a síle epitelizace, statisticky ale nebyl významný. Stejně nebyl rozdíl v histopatologickém hodnocení a v perfuzi rány mezi HBOT a kontrolními skupinami.

Další práce kolektivu z Rotterdamu (84) byla publikována roce 2016. Sledovány byly tři skupiny diabetických myší (n 18, n 18, n 19) v dobu 7, 14 a 42 dní. Rána byla opět způsobena ischemií magnetického disku průměru 1,5 cm přiloženého po dobu 16 hodin. Skupiny myší byly randomizovány na HBOT a kontrolní. HBOT byla aplikována 1x denně, 90 minut, 2,5 ATA. Kontrolní skupina byla léčena při normálním tlaku úrovně moře za zcela stejných podmínek. Hodnoceno bylo makroskopické hojení za použití metody automatického hodnocení ImageJ (NIH Bethesda USA), k vyšetření byla rána excidována s 2 mm širokým okrajem, polovina rány byla fixována 10 % formolem k histologickému a imunohistochemickému vyšetření, druhá polovina excise byla zmrazena a homogenizována. Průtok ránou a oxygenace rány byly měřeny laserovým Doppler průtokoměrem a tkáňovým spektrometrem. Ani jeden ze sledovaných parametrů: makroskopické hojení, granulace histologicky, inflamace a neovaskularizace imunohistochemicky, saturace tkání kyslíkem, množství hemoglobinu v mikrocirkulaci a průtok spodinou ran neukázal rozdíl mezi skupinou léčenou HBOT a skupinou vedenou ve stejném režimu bez léčby. Tento závěr byl společný pro všechny hodnocené skupiny, tj. po 7, 14 a 42 dnech.

Poslední literárně dostupný experiment provedli veterinární lékaři v Tennessee, práce byla publikována v roce 2018 (85). Jako experimentální zvíře byl použit pes (n 10). Zvířata byla randomizována na skupinu s expozicí HBOT a skupinu kontrolní. Na hřbetní straně nad lopatkou byly vytvořeny dvě ztrátové rány rozsahu 2x2 cm k fascii a zároveň byly provedeny dvě 3 cm dlouhé rány, které byly ošetřeny primární suturou. HBOT byla aplikována 1. až 7. den po výkonu, 1x denně, 40 minut, 2,0 ATA. Hojení ran bylo sledováno 24 dní podle

protokolu, biopsie byla odebírána (bioptic punch) 4., 7. a 14. den. Hodnocení probíhalo podle skóre zánětu (HAIS): infiltrace neutrofilů, stupeň edému, hemorrhagie a nekróza (86) v kombinaci histologickými známkami reparační: proliferace fibroblastů, rozsah postižení, hloubka a intenzita ukládání kolagenu a stupeň neovaskularizace (86). Podle makroskopického hodnocení i porovnání histopatologického vyšetření nebyl v hojení rány mezi HBOT a kontrolní skupinou signifikantní rozdíl.

6 MATERIÁL A METODIKA

Záměrem experimentu bylo vytvořit modelové trauma na pokusném zvířeti. Randomizovat zvířata na skupiny vystavené standardní HBOT, intenzivní HBOT a nevystavené HBOT. Porovnat hojení rány makroskopicky, histologicky, imunohistochemicky a vyšetřením genových expresí mezi jednotlivými skupinami.

6.1 Popis experimentu

Pokusná zvířata – králíci (n 36) byla náhodným výběrem rozdělena do tří skupin, každá skupina po 12 zvířatech (skupina A, skupina B, skupina C).

Každému zvířeti byly operačně způsobeny 4 kožně podkožní ztrátové rány nad hřbetní svalovinou o velikosti 2x2 cm.

Hojení rány bylo sledováno a porovnáváno makroskopicky. Tři hojící se rány každého zvířete byly postupně excidovány a to 4, 7. a 10. den po způsobeném traumatu. Excidovaná tkáň rány byla podrobena histologickému, imunohistochemickému vyšetření a celogenomové analýze genové exprese.

Skupina A (n 12) byla podrobena HBOT 2x denně 90 minut při tlaku 2,5 bar, celkově po 8 dní se zahájením 2. pooperační den. excisi.

Skupina B (n 12) byla podrobena HBOT 1x denně 90 minut při tlaku 2,5 bar, celkově po 8 dní se zahájením 2. pooperační den.

Skupina C (n 12) nebyla podrobena HBOT.

Experiment byl ukončen po úplném zahojení čtvrté (neodebírané) rány.

Výsledky získané analýzou odebraných vzorků a pozorováním byly statisticky vyhodnoceny, bylo porovnáno hojení mezi jednotlivými skupinami.

6.2 Zvířecí model

K experimentu byl vybrán novozélandský králík (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*). Zvířata byla dodána firmou Velaz s.r.o., Ratibořice, certifikovanou k produkci laboratorních zvířat. Rozhodování o vhodném druhu experimentálního zvířete bylo podmíněno potřebou

dostatečných ploch k vytvoření modelového poranění s nutností opakovaných odběrů tkáně k vyšetření.

Jedinci byly samice, stáří 3 měsíce, hmotnost zvířat byla \pm 3 kg (rozmezí 2,5 – 4,5 kg). Králíci byli ustájeni za standardních parametrů ve viváriu akreditovaném Ministerstvem zemědělství České republiky pro tyto účely. Všichni jedinci byli chováni v identických podmínkách stanovených protokolem experimentu, o chovu byl veden záznam. Sledována a zaznamenávána byla teplota, vzdušná vlhkost, pití, strava a osvětlení.

Zvířata byla rozdělena ustájena v samostatných boxech při udržování konstantní teploty prostředí. Průměrná hodnota teploty chovné místnosti byla 21.6 C°, maximální teplota 24.4 C°, minimální teplota 18.8 C°. Průměrná vlhkost vzduchu chovné místnosti byla 35,4 %, minimální vlhkost vzduchu 22 %, maximální vlhkost vzduchu 49 %. Automatický světelný režim byl nastaven ve schématu 12 hodin světlo a 12 hodin tma pro zachování biorytmů.

Zvířata byla krmena směsí MOK pro králíky s neomezeným přístupem k vodě. Večer před vlastním operačním výkonem a ráno v den operačního výkonu jim byla strava odebrána. Experiment proběhl v prostorách vivária Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové a Ústavu leteckého zdravotnictví v Praze při splnění podmínek vyhlášky MZE č. 311/98 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat.

Při HBO expozici byla zvířata kontinuálně monitorována kamerovým systémem. Průměrná teplota v komoře za stálého proudění kyslíku a odvodu oxidu uhličitého byla 21.9 C° a průměrná vlhkost z důvodu umístění zvířete v semi hermetickém boxu byla 71,2 %.

Všichni pracovníci, kteří manipulovali se zvířaty, byli držitelé osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

Aklimatizační pobyt zvířat na pracovišti před zahájením experimentu trval týden.

6.3 Modelace poranění

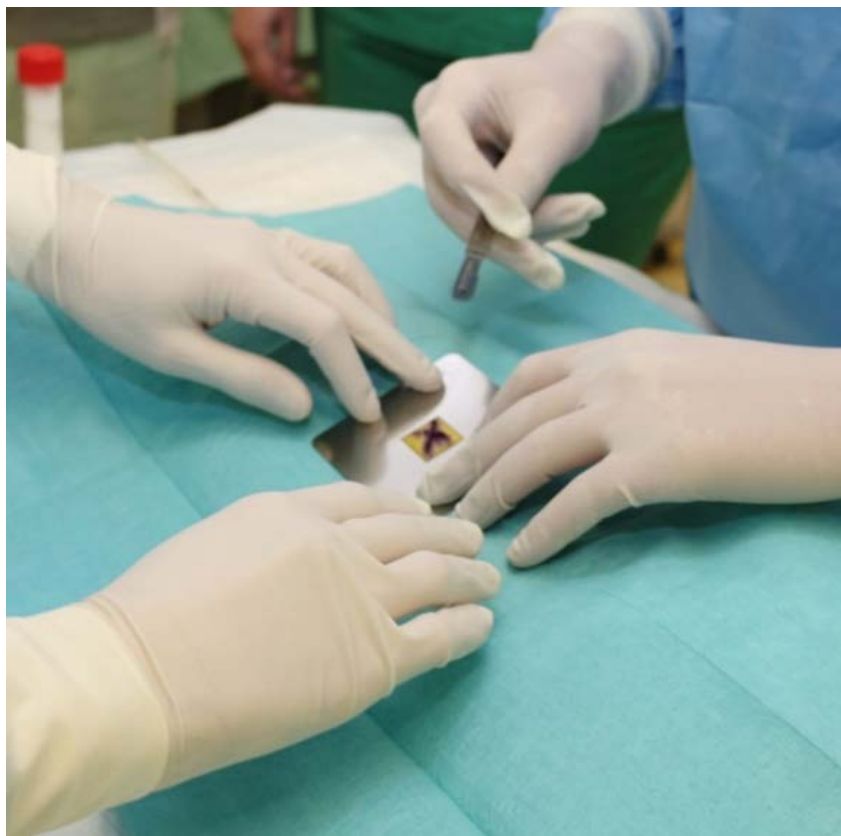
Vytvoření poranění, které odpovídalo potřebám pozorování a studia hojících se ran, bylo vyzkoušeno v předběžné fázi experimentu. Podle získaných zkušeností byl stanoven následující postup.

V oblasti hřbetní svaloviny králičí samice byla oholena srst a kůže byla následně omyta mýdlovou vodou.

Zvíře bylo uvedeno do celkové anestezie intramuskulární aplikací kombinace ketaminu (50 mg/kg) a xylazinu (3 mg/kg) podpořenou celkovým inhalačním anestetikem isofluranem. Záložním postupem bylo intravenózní podávání 1% propofolu (5 – 10 mg/kg), kanyla pro podávání anestetika by byla zavedena do žíly v ušním boltci.

Po dezinfekci operačního pole 10% roztokem jodpolyvidonu a zarouškování byly vytvořeny 4 defekty o velikosti 2x2 cm v oblasti hřbetní svaloviny pronikajících na úroveň svalové fascie. Pro zachování maximální unifikace ran, byly excize vytvořeny podle šablony s vnitřním rozměrem 2x2 cm. Šablona byla ze sterilizovatelného materiálu (Obr. 3).

Obr. 3 : postup vytvoření unifikované rány



(foto Tlapák, Oniščenko)

Pozice proximálních ran byly 6 cm od lopatky po obou stranách hřbetu 1,5 cm od střední čáry hřbetu, pozice distálních ran byly umístěny 11 cm distálně od lopatky po obou stranách hřbetu ve stejné vzdálenosti od střední čáry jako proximální rány (obr. 4).

Obr. 4: vytvořené rány na pokusném zvířeti.



(foto Tlapák, Oniščenko)

Krvácení během výkonu bylo zastaveno kompresivně. Krevní ztráta při tomto postupu nepřesahovala 10 ml. Rány byly následně sterilně překryty.

O vytvoření ran byl veden operační protokol (příloha č. 1).

Převazování, fotodokumentace, hodnocení defektů a kontrola hmotnosti zvířete probíhala v den odběru vzorků a pak vždy každý druhý den.

Značení jedinců bylo provedeno na pravý ušní boltec, na klec, na jednotlivé protokoly a odběrové zkumavky dle metodiky.

6.4 Aplikace hyperbarické oxygenoterapie (HBOT)

6.4.1 Technické podmínky expozice

K bezpečnému provedení HBOT byly navrženy a vyrobeny expoziční boxy, jeden box pro jedno zvíře. K výrobě byla použita nerezová ocel, pro zajištění osvětlení byla horní stěna boxu vyrobena z bezpečnostního kaleného skla přitlačeného zavíracím mechanismem přes speciální těsnění z kompatibilního materiálu VITON. Při konstrukci boxu byla zohledněna bezpečnost (přítomnost čisté kyslíkové atmosféry), při posuzování použitých materiálů byla respektována pravidla ASTM International a WHA International (ASTM G128 – 02 Standard Guide for Control of Hazards and Risks in Oxygen Enriched Systems Designation 2008 a ASTM G63-15 Standard Guide for Evaluating Nonmetallic Materials for Oxygen Service).

Rozměry boxu byly 400 x 300 x 400 mm (d x š x v) a plně odpovídaly vyhlášce č. 419/2012 o ochraně pokusných zvířat.

Boxy byly testovány pro ověření funkčnosti a bezpečnosti celé sestavy před zahájením experimentu. Kompletní box byl uzavřen a připojen ke speciálnímu rozvodu kyslíku v humánní léčebné barokomoře (Tab. 1).

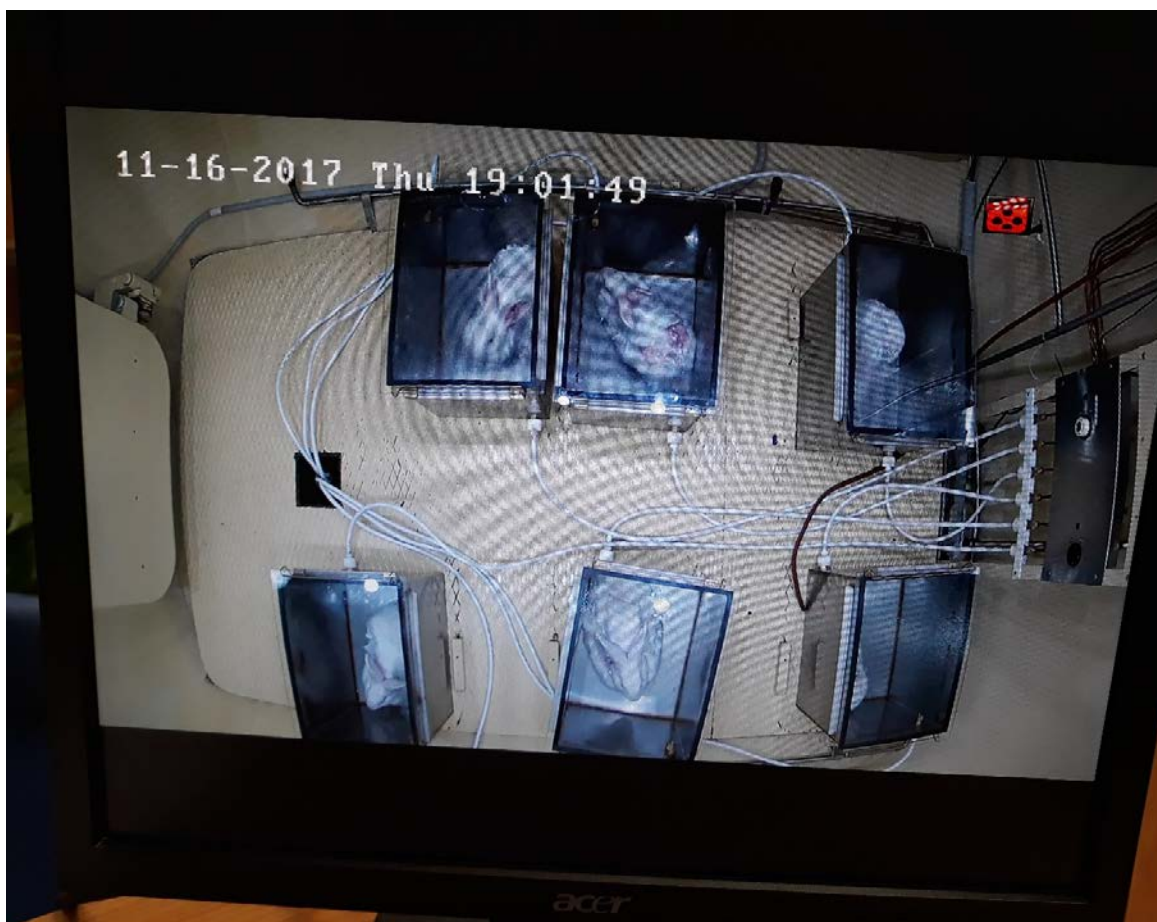
Tab. 1: Testování boxů pro experimentální zvířata v humánní barokomoře.

Typ zkoušky	Technické podmínky	Výsledek
Zkouška rozvodu kyslíku včetně připojeného prototypu boxu.	Atmosférický tlak, otevřená barokomora.	Průtok kyslíku plynule regulovatelný v plném rozsahu průtokoměru 0-5 l/min.
Vyrovnávání tlaku v boxu vzhledem k tlaku uvnitř barokomory.	Technický sestup v barokomoře rychlostí 1m/min do hloubky 15m.	Box nejeví viditelné známky deformace, nezaznamenány žádné doprovodné zvukové efekty provázející vyrovnávání tlaku.
	Technický výstup v barokomoře rychlostí 1m/min z hloubky 15m.	
	Technický sestup v barokomoře rychlostí 2m/min do hloubky 15m.	
	Technický výstup v barokomoře rychlostí 2m/min z hloubky 15m.	
Kapacitní zkouška rozvodu kyslíku do přetlaku včetně připojeného prototypu boxu.	Technický sestup v barokomoře rychlostí 1m/min do hloubky 15m.	Průtok kyslíku plynule regulovatelný v plném rozsahu průtokoměru 0-5 l/min do maximálního plánovaného protitlaku 2,5 ATA.
Kapacita odvětrávání barokomory vzhledem ke koncentraci O ₂ .	Technický sestup v barokomoře rychlostí 1m/min do hloubky 15m, po dosažení hladiny 15m standardní provětrávání.	Nebyl zaznamenán měřitelný nárůst koncentrace O ₂ .

(zpracoval ing. Petříček)

Do barokomory bylo možno na jednu expozici umístit 6 boxů s experimentálními zvířaty, každý box byl k rozvodu kyslíku připojen individuálně (obr. 5).

Obr. 5: Boxy s králíky v tlakové komoře při expozici.



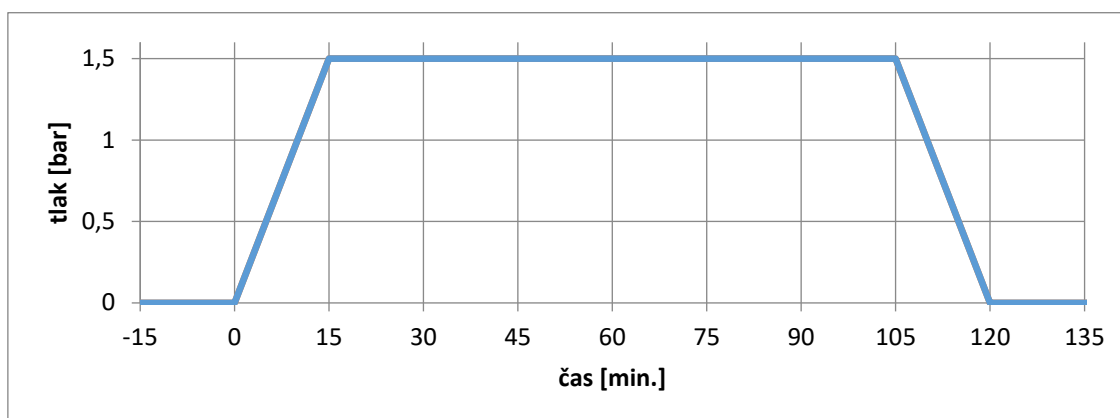
(foto Oniščenko, Tlapák)

6.4.2 Provedení hyperbarické oxygenoterapie (HBOT)

Parametry hyperbaroxické expozice byly zvoleny tak, aby odpovídaly doporučenému profilu humánní léčebné hyperbarické oxygenoterapie.

Rychlost komprese odpovídala 0,1 bar/min. Cílového tlaku bylo dosaženo po 15 minutách, cílový tlak odpovídal 15 m vodního sloupce. Na této hladině byl tlak v komoře udržován po dobu 90 minut. Po 90 minutách byla zahájena dekomprese stejnou rychlostí a tlak v komoře byl vyrovnán s atmosférickým tlakem po 15 minutách (Graf 1).

Graf 1: Průběh relativního tlaku při expozici HBOT.



(zpracoval dr. Tlapák)

Kyslík byl pokusným zvířatům podáván do uzavřeného prostoru hermetických boxů. Boxy byly kyslíkem naplněny během kompresní fáze, kdy byl udržován průtok na hodnotě 5l/min. Do boxu o vnitřním objemu 48 l za tuto dobu přiteklo 75 l kyslíku a kyslík tak zvýšil svůj parciální tlak na 100 %.

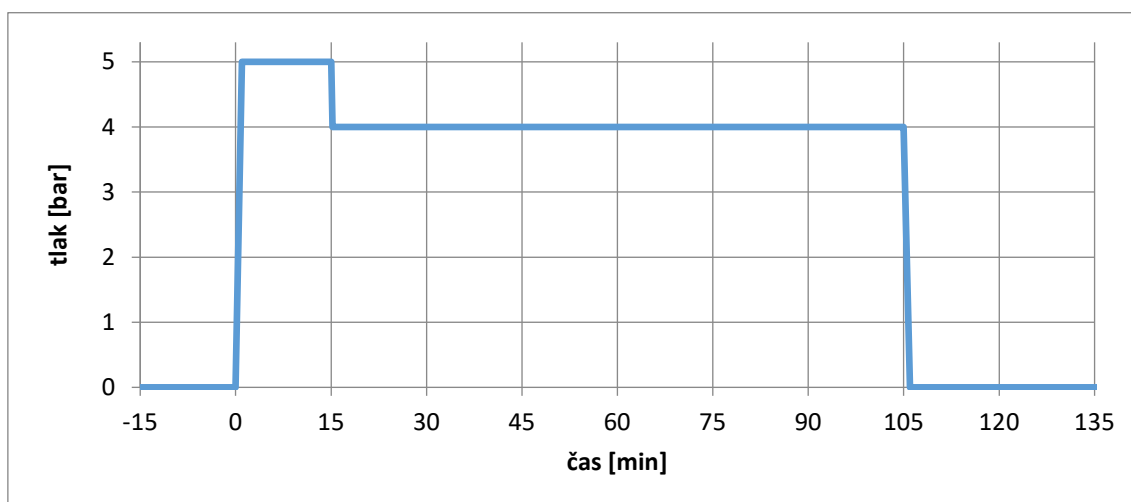
Přebytečný kyslík odtékal odpadním vedením k ústí atmosférického ventilu. Zde byl strháván proudem vzduchu, jímž byla promývána atmosféra v komoře a jímž byl též udržován parciální parciální tlak kyslíku v komoře do 22,5%.

Po dosažení cílového tlaku byl průtok kyslíku v boxu snížen na hodnotu 4l/min., na tomto průtoku byl kyslík udržován po celou dobu expozice (následujících 90 minut). To spolehlivě kompenzovalo vydechovaný CO₂ a vodní páru, stejně tak tím byl dostatečně dobře ventilován vnitřek boxu.

Poté byl přívod kyslíku uzavřen a box komunikoval s okolím pouze prostřednictvím odpadní hadice. Tlak v boxu klesal v těsné závislosti na tlaku v komoře.

Charakteristika průtoku kyslíku boxem je znázorněna – Graf 2.

Graf 2: Průtok kyslíku expozičním boxem.



(zpracoval dr. Tlapák)

6.4.3 Organizace HBOT pro expoziční skupiny

Bylo provedeno celkem 48 hyperbaroxických expozicí podle níže uvedeného časového harmonogramu. Subjekty výzkumu byly rozděleny do 4 skupin po 6 zvířatech označených jako:

A1, A2 skupina absolvující dvě hyperbaroxie za den,

B1, B2 skupina absolvující jednu hyperbaroxii za den.

Denní harmonogram expozicí HBOT ukazuje Graf 4.

Graf 3: Znázornění denního harmonogramu expozičních HBOT.

	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den	8. den
7:00	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1
9:00								
9:30	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2
11:30								
12:00	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1
14:00								
14:30	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2
16:30								
17:00	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1
19:00								
19:30	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2	A2
21:30								

(zpracoval dr. Tlapák)

6.5 Fyziologie pokusných zvířat při expoziční

Z hlediska fyziologie je expoziční v přetlaku spojena s řadou pochodů a změn. Přestože největší změny probíhají v kardiovaskulární oblasti, obavy z problémů při expoziční králíku směřovaly do dvou jiných oblastí.

Králík má odlišnou anatomii zevního zvukovodu. Informace o možných komplikacích středouší při změnách atmosférického tlaku u králíka nejsou dostupné a ani veterinární lékaři nebyli schopni poskytnout jasné stanovisko. K ověření stavu středouší byl každý králík tympanoskopicky vyšetřován. Toto vyšetření bylo možné provádět pouze v celkové anestezii, protože králíčí zvukovod je dlouhý a lomený a zvíře se vyšetřování brání. Vyšetření bylo proto v prováděno v operační dny vždy před excísi.

Jako prevence středoušních problémů byla volena pozvolná komprese. Zároveň byly pečlivě sledovány možné změny chování (iritace, zvukové projevy) při kompresi, které by mohly signalizovat barotrauma. Králíci fyziologicky neustále pohybují čelistí, i to mohlo pomáhat k vyrovnávání středoušního tlaku. Tympanoskopicky nebyly pozorovány změny. Po proběhlých pokusech můžeme konstatovat, že ušní fyziologie nenarušila experiment.

Druhá obava vedla směrem k chování králíka v uzavřeném prostoru. Box byl navržen rozměrově obdobně jako běžně používané boxy transportní, stěny ale nebyly otevřené. Byly připraveny způsoby, jak v případě neklidu zvířete situaci řešit. Přidání přírodního materiálu (tráva), přirozené zabarvení stěn nebo v hraniční potřebě sedace. Ani v tomto ohledu k problémům nedošlo. Králíci se hýbali minimálně a po dobu expozice zůstávali v klidu.

Celkově lze shrnout, že expozice HBOT u králíků probíhala zcela bez problémů. Nebyla zaznamenána žádná zjevná stresová reakce ani podezření na diskomfort testovaných zvířat.

Během experimentu došlo úhynu 2 ks zvířat, a to v čase mimo expozici HBOT. Veterinář jako příčinu úhynutí stanovil: neadekvátní stresovou reakci organismu a nadměrnou krevní ztrátu po operačním výkonu (odběru histologie).

6.6 Odběr materiálu

Odběr materiálu byl proveden 4., 7. a 10. den po excizi. Odběr byl prováděn v celkové anestezii. Po chirurgické stránce proběhl znovu unifikovaným způsobem za použití šablony 3,5x3,5 cm. Hojící se rána byla excidována se svojí spodinou.

O odběru materiálu byl veden protokol (Příloha č. 2).

Bylo odebráno 72 vzorků ze všech časových bodů pro histologickou a histochemickou analýzu. Vzorky byly uloženy do plastové nádoby 125 ml a fixovány stabilizovaným formalínem (Bamed, Litvínovice, Česká republika). Vzorky byly ještě v den odběru transportovány do histologické laboratoře.

Bylo odebráno 26 vzorků pro hodnocení mRNA u skupiny s intenzivní HBOT a 12 referenčních vzorků pro hodnocení mRNA z prvního operačního dne. Vzorky byly bezprostředně zmrazeny na -80° Celsia, použit byl tekutý dusík. Do genové laboratoře byly transportovány po ukončení odběrů 10. pooperační den. (30.11.2017).

6.7 Eutanázie

Eutanázie byla provedena u všech přeživších zvířat po zahojení ne excidované a první excidované rány látkou T61. Látka byla aplikována přímo intrakardiálně po předchozí premedikaci intramuskulárně aplikovaného ketaminu a xylazinu.

6.8 Histologické a imunohistochemické hodnocení

Histologické a imunohistochemické hodnocení hojení rány se vymyká běžné klinické patologii. Po konzultaci s odborníky byl ke spolupráci přizván patolog z experimentálního pracoviště Fakulty vojenského zdravotnictví, který se dlouhodobě zabývá výzkumem v oblasti fyzikálních účinků na živé tkáně a který má v této oblasti ojedinělé vědomosti a zkušenosti.

6.8.1 Materiál ke zpracování

Část vzorků tvořily celé resekáty, část tvořily poloviny resekátů ran s kožním okrajem (druhá polovina těchto vzorků byla určena pro zhodnocení genové exprese). Poloviny byly v případě větších nerovností mírně paralelně zakrojeny skalpelem a následně histologicky zpracovány. Celé resekáty byly nejprve rozpuřeny a poloviny dále histologicky zpracovány.

Fixované vzorky byly nejprve odvodněny podle standardních histologických postupů (tkáňový procesor TP1020, Leica, Německo). Biopsie byly dále zality do parafinových bločků (Bamed) a nakrájeny na 5 μm silné řezy (mikrotom SM2000 R, Leica, Heidelberg, Německo), které byly nataženy na histologická sklíčka (Bamed).

6.8.2 Barvení a imunochemické zpracování preparátu

Barvení hematoxylin – eozin

Toto barvení bylo provedeno na odparafinovaných (xylen a sestupná alkoholová řada; obě od Bamed) a rehydratovaných řezech (deionizovaná voda; Aqual 35, Aqual, Brno, Česká republika). Řezy byly nejprve obarveny hematoxylinem (5 min; Merck, Kenilworth, NJ, USA) a diferencovány v 1% kyselém alkoholu (1% HCl [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] v 70% etanolu [Bamed]). Následovalo obarvení eozinem (10 min; Merck), dehydratace ve vzestupné

alkoholové řadě, vyjasnění xylenem a montování do bezvodého montovacího media DPX (Sigma-Aldrich)

Barvení modrý trichrom

Barvení Massonovým modrým trichromem bylo provedeno na odparafinovaných a rehydratovaných řezech. Řezy byly nejprve dobarveny hematoxylinem (5 min; Merck) a diferencovány. Následovalo barvení roztokem Ponceau (1% Ponceau, 1% kyselina fosfowolframová [obě od Bamed] a 1% ledová kyselina octová [Sigma]) s kyselým fuchsinem (1% kyselý fuchsin [Bamed] a 1% ledová kyselina octová) po dobu 5 min. Následoval oplach destilovanou vodou, barvení 1% fosfowolframovou kyselinou po dobu 5 min a bez oplachu ponoření do anilinové modři (2,5% anilinová modř [Bamed], 2,5% kyselina octová). Diferenciace byla provedena 1% kyselinou octovou. Řezy obarvené trichromem byly dehydratovány a montovány do bezvodého montovacího media DPX.

Detekce kolagenních vláken pomocí pikrofuchsinu dle Van Giesona

Detekce kolagenních vláken pomocí pikrofuchsinu dle Van Giesona bylo provedeno na odparafinovaných řezech pomocí kitu (pikrofuchsin – kat. č. C0602, DiaPath, Martinengo, Italy) dle návodu výrobce. Řezy obarvené pikrofuchsinem byly dehydratovány a montovány do bezvodého montovacího media DPX.

Detekce naftol-as-d-chloracetát esteráza pozitivních buněk

Detekce naftol-as-d-chloracetát esteráza pozitivních buněk (aktivních infiltrujících neutrofilních granulocytů) bylo provedeno na odparafinovaných řezech pomocí kitu (naftol-as-d-chloracetát esteráza - kat. č. 91C-1KT, Sigma-Aldrich) dle návodu výrobce. Obarvené řezy byly montovány do vodního montovacího media ImmunoHistoMount (Sigma-Aldrich).

Imunohistochemická detekce CD34⁺ buněk

Imunohistochemická detekce CD34⁺ buněk (endoteliálních buněk) byla provedena standardní peroxidázovou technikou. Ve zkratce; po odparafinování řezů, uvolnění antigenních epitopů pomocí mikrovlnné trouby (750 W, 2 × 5 min; Electrolux, Stockholm, Švédsko) a blokování aktivity endogenních peroxidáz (20 min, 1,8 ml 30% H₂O₂ [Sigma] ve 100 ml metanolu [Bamed]) byly vzorky inkubovány s monoklonální myší anti-CD34 protilátkou (1 hod., 1:50 a 1:400; kat. č. MA1-10202, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) nebo s potkaní anti-CD34 protilátkou (1 hod., 1:50 a 1:400; MEC14.7, kat. č. GTX28158, GeneTex, Irvine, CA, USA) ve fosfátovém pufru (pH 7,2, Sigma-Aldrich) a poté 3x opláchnuty fosfátovým pufrem.

V případě myši primární protilátka následovala inkubace se sekundární oslí biotinylovanou protimýšou protilátkou (20 min., 1:250; kat. č. 715-065-151, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, PA, USA) ve vlhké komůrce. Poté trojitý oplach fosfátovým pufrům, inkubace se streptavidin-peroxidázou (20 min; DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) a trojitý oplach fosfátovým pufrům. V případě potkaní primární protilátka byla použita sekundární kozí protipotkaní protilátka (20 min., ready-to-use; kat. č. ab214882-15ml; Abcam, Cambridge, Anglie) s navázanou polymerizovanou křenovou peroxidázou, u které byl krok inkubace se streptavidin-peroxidázou vynechán. Po oplachu byl přidán 0,05% 3,3'-diaminobenzidintetrahydro-chloridového-chromogen (20 min., Sigma-Aldrich) ve fosfátovém pufru obsahujícím 0,02% H₂O₂ za účelem vizualizace navázané protilátka *in situ*. Odvodněné vzorky byly montovány do bezvodého montovacího media DPX.

6.8.3 Hodnocení vzorků

V obarvených vzorcích byly hodnoceny následující ukazatele pomocí mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan), pokud není uvedeno jinak.

a) Histopatologické skóre hojení epitelu

Ve vzorcích barvených hematoxylinem eozinem byla okem hodnocena přítomnost epitelu. Ukazatel je definován součtem 2 parametrů (Tab. 2).

Tab. 2: Parametry histopatologického skóre hojení epitelu.

parametr	Semikvantitativní skóre
1 – rozsah epitelizace	0 – před hranou řezu, 1 – na hraně řezu, 2 – v ráně < 50% jejího rozsahu, 3 – v ráně > 50% jejího rozsahu, 4 – kompletní pokrytí rány epitelem
2 – diferenciacie	0 – žádná či pouze spinózní, 1 – granulární diferenciacie až keratinizace, 2 – tvorba adnex

Ukazatel může dosahovat hodnot od 0 do 6, přičemž vyšší číslo indikuje vyšší stupeň zhojení rány.

b) Délka (μm) a plocha epidermálního listu (μm^2)

Tyto ukazatele byly měřeny ve vzorcích barvených hematoxylinem-eozinem pomocí počítačové analýzy obrazu ImagePro 5.1. (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Délka epidermálního listu představuje nejkratší vzdálenost mezi vrcholem nově tvořeného epidermálního listu a nejbližší adnexou před hranou řezu.

Plocha epidermálního listu je definována plochou mezi vrcholem nově tvořeného epidermálního listu a nejbližší adnexou před hranou řezu. Do této plochy nebyla zahrnuta keratinizující vrstva nově tvořené pokožky z důvodu jejího splývání s povrchovými nekrotickými hmotami.

c) Vzdálenost epidermálních listů (μm)

Nejkratší přímá vzdálenost mezi oběma vrcholy epidermálních listů. Vzhledem k nízké soudržnosti vzorků dané nízkému obsahu vaziva v 5- a 8denním intervalu bylo měření možné pouze v 11denním intervalu. Tato vzdálenost byla hodnocena pomocí mikroskopu Olympus IX71 vybaveného MMI softwarem (Olympus). Prostřednictvím tohoto systému byly vzorky naskenovány při 40násobném zvětšení v celém rozsahu a následně vyhodnoceny pomocí počítačové analýzy obrazu ImagePro 5.1.

d) Mitotická aktivita na vrcholu epidermálního listu

Daná počtem mitotických figur v epidermálním listu na 100 bazálních buněk nebo jejich ekvivalentu (při nízko diferencovaném stavu) hodnoceném při 400násobném zvětšení.

e) Histopatologické skóre hojení vaziva

Tento ukazatel byl hodnocen vizuálně ve vzorcích barvených hematoxylinem-eozinem, modrým trichromem a pikrofuchsinem dle Van Giesona v celém rozsahu rány. Ukazatel je definován celkem 5 parametry dle Sultana a kol. (2009) s modifikací stupnice (Tab. 3).

Tab. 3: Parametry histopatologického skóre hojení vaziva.

parametr	Semikvantitativní skóre
1 - Množství granulační tkáně	0 – vysoké, 1 – střední, 2 – nízká, 3 – ojediněle, 4 – nepřítomno
2 - Množství časného kolagenu	0 – nepřítomen, 1 – minimální, 2 – nízké, 3 – střední, 4 – vysoké
3 - Množství pozdního kolagenu	0 – nepřítomen, 1 – minimální, 2 – nízké, 3 – střední, 4 – vysoké
4 - Orientace kolagenních vláken	0 – bez orientace, 1 – vertikální a/nebo apozice vláken v hraně řezu, 2 – smíšená, 3 – horizontální
5 - Vzor kolagenních vláken	0 – amorfni rosol, 1 – retikulární, 2 – smíšený, 3 – snopcovitý

1 – bylo hodnoceno ve vzorcích barvených H-E, 2 a 3 – bylo hodnoceno ve vzorcích barvených modrým trichromem, 4 a 5 – bylo hodnoceno ve vzorcích barvených modrým trichromem a pikrofuchsinem dle Van Giesona.

Celkové skóre je definováno součtem všech 5 parametrů a může dosahovat hodnot od 0 do 18, přičemž vyšší číslo indikuje vyšší stupeň zhojení rány.

f) Histopatologické skóre zánětu

Tento ukazatel indikuje množství naftol-as-d-chloracetátsteráza pozitivních buněk na zorné, které bylo definováno jako mikroskopická oblast v těsné blízkosti fibrinové a/nebo epitelové vrstvy (při povrchu). U každého vzorku bylo náhodně skórováno 10 zorných polí při 400násobném zvětšení dle následující semikvantitativní stupnice (Tab. 4).

Tab. 4: Parametry histopatologického skóre zánětu.

parametr	Semikvantitativní skóre
1 – rozsah infiltrace naftol-as-d-chloracetát esteráza pozitivními buňkami	0 – vysoká (> 200), 1 – střední (50 – 200), 2 – nízká (20 – 49), 3 – minimální (10 – 19 buněk), 4 – na úrovni neporaněné pokožky (< 10 naftol-as-d-chloracetát esteráza pozitivních buněk)

Ukazatel může dosahovat hodnot od 0 do 4. Vyšší číslo indikuje vyšší stupeň zhojení rány, respektive nižší úroveň zánětlivé reakce.

g) Počet mikroabscesů v celém rozsahu rány

Tento ukazatel byl hodnocen ve vzorcích určených pro detekci naftol-as-d-chloracetát esteráza pozitivních buněk.

h) Celkové histopatologické skóre hojení ran

Celkové histopatologické skóre hojení epitelu + celkové histopatologické skóre hojení vaziva + histopatologické skóre zánětu.

6.8.4 Statistické zpracování histologických a imunohistochemických výsledků

Výsledky byly prezentovány jako průměry $\pm 2 \times \text{SEM}$.

K určení významnosti rozdílů dat byly získané údaje analyzovány pomocí IBM SPSS Statistics verze 24 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Data byla hodnocena pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu (pro určení signifikantního rozdílu mezi všemi skupinami) s post hoc Mann-Whitheyho testem (pro určení statistické významnosti mezi jednotlivými skupinami). Úroveň statistické významnosti byla stanovena na hladině $p \leq 0,05$.

6.9 Celogenomová analýza genové exprese

Genomová analýza byla, po odborných jednáních za účelem vybrání odpovídajícího špičkového specializovaného pracoviště, svěřena laboratoři Contipro Dolní Dobrouč.

Vlastní analýze vzorků předcházelo mapování prokázaných změn genových transkripcí při hojení rány v již uzavřených a publikovaných experimentech (87 – 112). Mapování potvrdilo hypotézu změn genových expresí při hojení rány i při expozici hyperbarického kyslíku. Významově nejdůležitější se staly skupiny genů kontrolující zánět, produkci extracelulární hmoty (ECM), oxidační stres, proliferaci a regeneraci. Podrobný přehled ovlivňovaných genů shrnuje tabulka v Příloze 4.

6.9.1 Izolace RNA

Vzorky s tkáněmi uchovanými v RNAlater byly rozmrazeny na ledu. Po vynětí z roztoku byla změřena jejich velikost, která se pohybovala v ploše nejčastěji mezi 4x4 – 5x5 mm a v hloubce byla 1 – 2 mm v 1. odběrovém dni, 1 – 3,5 mm v 2. odběrovém dni, 2 – 4 mm ve 3. odběrovém dni.

Vzorky byly předkrájeny skalpelem, vloženy do 2 ml Safe-lock zkumavky (Eppendorf) spolu s ocelovou 5 mm kuličkou (Qiagen), zality 1 ml RNazol (Thermo Fisher) a rozbity v přístroji Tissue Lyser II (Qiagen) po dobu 20 min při 30 Hz. K homogenátu bylo přidáno 0,4 ml RNase – free vody (Qiagen) a po řádném promíchání byl vzorek inkubován 15 min při pokojové teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány 15 min, při 12 000 g a 20°C. Aliquoty 0,6 ml supernatantu byly připraveny do 2 ml Safe-lock zkumavek a spolu s kolonkami byly umístěny do izolátoru RNA QiaCube (Qiagen), který pomocí sady RNeasy Mini Kit izoloval kolonkovou metodou RNA podle instrukcí výrobce kitu.

Izolovaná RNA byla změřena spektrofotometricky a její integrita byla zjištěna z elektroforetogramu (Agilent 2100 Bioanalyzer).

6.9.2 Syntéza aRNA, hybridizace aRNA na cDNA mikročipy

Syntéza aRNA proběhla z celkové templátové RNA (500 ng) kitem Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent) s fluorescenčními nukleotidy Cy3-CTP a Cy5-CTP (GE Healthcare) podle návodu výrobce. Značená aRNA byla přečištěna kitem RNeasy Mini Kit (Qiagen) a změřena spektroskopicky (NanoDrop, ThermoFisher).

Hybridizace byla provedena kitem Gene Expression Hybridization Kit (Agilent) podle návodu výrobce. Na jednu microarray byly hybridizovány dva vzorky, jeden značený Cy3-CTP a druhý Cy5-CTP. Každého vzorku na array bylo 900 ng. Pokud to bylo možné, byly hybridizovány vzorky z odpovídajícího dne z opačných experimentálních skupin (např. den 4, 1. kontrolní zvíře s den 4, 1. léčené zvíře). Byly použity microarraye s updateovaným designem králíčích prób ve formátu 4x44K a vyrobeny na zakázku (Agilent). Hybridizace probíhala 17 hodin při 65 °C v hybridizační peci s rotátorem (Agilent). Odmytí skel následující den bylo provedeno kitem Gene Expression Wash Pack (Agilent) a skla byla následně skenována skenerem GenePix 4000B (Molecular Devices) v rozlišení 5 µm.

6.9.3 Zpracování dat

6.9.3.1 Srovnání rozdílů v expresi mezi skupinami

Analýza získaných dat byla provedena ve statistickém programu R (R Development Core Team, 2008). Soubory .gpr vzniklé analýzou obrazu ze skeneru GenePix 4000B byly načteny pomocí balíčku limma (Ritchie et al., 2015). Signál byl normalizován kvantilovou normalizací mezi vzorky. Vzorky zájmu byly srovnány mezi sebou pomocí funkcí limma balíčku lmFit() a eBayes(). Výsledná úprava p hodnot na vícenásobné testování byla zvolena podle Benjamini-Hochberga.

6.9.3.2 Analýza genových ontologií

Byly uvažovány pouze transkripty signifikantně změněné ($p < 0.05$), u kterých bylo známo jejich jméno genu. Po stovce nejvíce zvýšených, respektive nejvíce snížených genů bylo podrobena analýze genových ontologií zprostředkovaných službou g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/index.cgi>), verze r1741_e90_eg37, GO termíny obnovery 18/10/2017. Organismus byl zvolen *Oryctolagus cuniculus* a kvůli vysoké nadbytečnosti GO termínů byly filtrovány pouze ty nejvýznamnější (Best per parent group (strong)). Výstup byl omezen na signifikantně změněné GO termíny. Mnohonásobné testování bylo zohledněno úpravou p hodnot dle nativního g:Profiler algoritmu g:SCS.

7 VÝSLEDKY

7.1 Histologické a imunohistochemické vyšetření

Kompletní hodnoty histopatologických parametrů jednotlivých individuálních zvířat jsou shrnuty v tabulkách Přílohy č. 5.

7.1.1 Histopatologické skóre hojení povrchového epitelu

Porovnání vzorků skupin A, B, C (HBOT 2xdenně, HBOT 1xdenně, bez HBOT) neukázalo signifikantní rozdíl v rozsahu epitelizace, diferenciaci a celkového skóre hojení povrchového epitelu 4, 7 a 10 dní po indukci ran (Tab. 5).

Signifikantní rozdíly bylo možné pozorovat pouze mezi jednotlivými časovými intervaly v rámci skupin (s výjimkou epitelizace mezi 4. a 7. dnem u skupiny A a diferenciaci mezi 7. a 10. dnem u skupiny C a skupiny A).

Tab. 5: Histopatologické parametry hojení povrchového epitelu.

Skupina	4. den	7. den	10. den
	Rozsah epitelizace		
Skupina C	0,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2 *	2,2 ± 0,3 *
Skupina B	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3 *	2,2 ± 0,2 *
Skupina A	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,3	2,3 ± 0,3 *
	diferenciaci		
Skupina C	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0 *	1,4 ± 0,3
Skupina B	0,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2 *	1,5 ± 0,3 *
Skupina A	0,1 ± 0,2	1,0 ± 0,0 *	1,4 ± 0,3
	celkové skóre		
Skupina C	0,6 ± 0,3	2,2 ± 0,2 *	3,6 ± 0,5 *
Skupina B	1,0 ± 0,3	2,5 ± 0,4 *	3,6 ± 0,3 *
Skupina A	1,0 ± 0,2	2,3 ± 0,3 *	3,7 ± 0,4 *

Signifikantní rozdíl proti předchozímu časovému bodu: $p \leq 0,05$ *. (zpracoval dr. Pejchal)

7.1.2 Délka a plocha epidermálních listů

Ve 4, 7 a 10 denním intervalu po indukci ran nebyly nalezeny mezi jednotlivými skupinami signifikantní rozdíly v délce a ploše epidermálních listů (Tab. 6).

Signifikantní změny bylo možné pozorovat pouze mezi jednotlivými časovými intervaly v rámci skupin (s výjimkou s výjimkou skupiny A případě obou parametrů).

Tab. 6: Délka a plocha epidermálních listů.

Skupina	4. den	7. den	10. den
	Délka epidermálních listů (μm)		
Skupina C	500 \pm 100	1800 \pm 300 *	3300 \pm 1000 *
Skupina B	500 \pm 100	1600 \pm 500 *	2400 \pm 600 *
Skupina A	500 \pm 200	1900 \pm 500 *	2900 \pm 900
	plocha epidermálních listů (μm^2) \times 1000		
Skupina C	20 \pm 5	163 \pm 31 *	281 \pm 97 *
Skupina B	23 \pm 6	134 \pm 45 *	220 \pm 51 *
Skupina A	33 \pm 14	184 \pm 45 *	276 \pm 97

Signifikantní rozdíl proti předchozímu časovému bodu: $p \leq 0,05$ – *. (zpracoval dr. Pejchal)

7.1.3 Vzdálenost epidermálních listů

Vzdálenost epidermálních listů bylo možné hodnotit pouze v 10denním intervalu. V předchozích intervalech bylo celkové množství vaziva, jež by udržovalo celistvost vzorků, nízké. Vzorky se lámaly a při natahování vzorku na podložní sklíčko se různě deformovaly.

V 10denním intervalu nebyly mezi jednotlivými skupinami nalezeny statisticky významné rozdíly (Tab. 7).

Tab. 7: Vzdálenost epidermálních listů (μm).

skupina	4. den	7. den	10. den
Skupina C	N	N	3200 \pm 1900
Skupina B	N	N	2400 \pm 600
Skupina A	N	N	2300 \pm 900

N – nehodnoceno pro nízkou soudržnost vzorků. (zpracoval dr. Pejchal)

7.1.4 Mitotická aktivita na vrcholu epidermálních listů

Mitotická aktivita nevykazovala signifikantní změny a to, jak mezi jednotlivými skupinami 4, 7 a 10 dní po indukci ran, tak ani mezi jednotlivými časovými intervaly v rámci skupin (Tab. 8).

Tab. 8: Mitotická aktivita.

skupina	4. den	7. den	10. den
Skupina C	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,3
Skupina B	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2
Skupina A	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2

(zpracoval dr. Pejchal)

7.1.5 Histopatologické skóre hojení vaziva

Při porovnání jednotlivých skupin mezi sebou, nebyly 4., 7. a 10. den po indukci ran pozorovány jakékoliv statisticky významné rozdíly (Tab. 9).

Signifikantní rozdíly byly zaznamenány, jen pokud jsme porovnávali parametry mezi časovými intervaly v rámci skupin. V případě množství granulační tkáně byly signifikantní rozdíly nalezeny pouze mezi 7 a 10denním intervalem u kontrolní skupiny a u skupiny A. Množství časného kolagenu vykazovalo signifikantní změny u všech skupin, jak mezi 4 a 7 denním intervalem, tak mezi 7 a 10denním intervalem. Signifikantní nárůst obsahu pozdního kolagenu byl pozorován pouze u kontrolní skupiny mezi 7 a 10denním intervalem po indukci ran. Orientace vláken vykazovala statisticky významný nárůst směrem ke zralejšímu stupni u skupiny C a skupiny B mezi 4 a 7denním intervalem a u všech skupin mezi 7 a 10denním intervalem. K signifikantní změně vzoru kolagenních vláken došlo u všech skupin pouze při porovnání 4 a 7denního intervalu. Signifikantní rozdíly celkového skóre hojení vaziva byly zaznamenány mezi všemi třemi časovými intervaly v rámci všech skupin (Tab. 9).

Tab. 9: Histopatologické skóre hojení vaziva.

skupina	4. den	7. den	10. den
	Množství granulační tkáně		
Skupina C	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,8 *
Skupina B	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,3
Skupina A	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,8 ± 0,4 *

	Množství časného kolagenu		
Skupina C	0,3 ± 0,3	1,5 ± 0,3 *	3,3 ± 0,5 *
Skupina B	0,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3 *	2,9 ± 0,5 *
Skupina A	0,6 ± 0,3	1,8 ± 0,4 *	3,0 ± 0,5 *
	Množství pozdního kolagenu		
Skupina C	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,3 *
Skupina B	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3
Skupina A	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,4
	Orientace kolagenních vláken		
Skupina C	0,3 ± 0,3	1,1 ± 0,2 *	1,9 ± 0,5 *
Skupina B	0,4 ± 0,3	1,1 ± 0,2 *	1,8 ± 0,4 *
Skupina A	0,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,8 ± 0,4 *
	Vzor kolagenních vláken		
Skupina C	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0 *	1,0 ± 0,0
Skupina B	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0 *	1,0 ± 0,0
Skupina A	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0 *	1,0 ± 0,0
	celkové skóre		
Skupina C	0,7 ± 0,6	3,6 ± 0,4 *	8,0 ± 1,8 *
Skupina B	0,7 ± 0,6	3,5 ± 0,4 *	6,5 ± 1,1 *
Skupina A	1,2 ± 0,6	4,1 ± 0,7 *	7,2 ± 1,6 *

Signifikantní rozdíl proti předchozímu časovému bodu: $p \leq 0,05$ *. (zpracoval dr. Pejchal)

7.1.6 Histopatologické skóre zánětu

Při porovnání jednotlivých skupin mezi sebou nebyly 4, 7 a 10 dní po indukci ran pozorovány signifikantní rozdíly (Tab. 10).

Signifikantní změny bylo možné pozorovat pouze mezi 4 a 7denním intervalem v rámci skupin a mezi 4 a 10denním intervalem u skupiny léčené u skupiny A (Tab. 10).

Tab. 10: Histopatologické skóre zánětu).

skupina	4. den	7. den	10. den
Skupina C	1,3 ± 0,4	2,3 ± 0,4 *	2,8 ± 0,5
Skupina B	1,4 ± 0,3	2,5 ± 0,3 *	2,6 ± 0,6
Skupina A	1,4 ± 0,3	2,0 ± 0,3 *	3,0 ± 0,4 *

*Signifikantní rozdíl proti předchozímu časovému bodu: $p \leq 0,05$ *. (zpracoval dr. Pejchal)*

7.1.7 Počet mikroabscesů v ráně

Počet mikroabscesů v celém rozsahu rány nejevil statisticky významné rozdíly jak při porovnání jednotlivých skupin mezi sebou v 4, 7 a 10denním intervalu, tak při srovnání jednotlivých časových intervalů v rámci skupin (Tab. 11).

Tab. 11: Počet mikroabscesů v celém rozsahu rány.

Skupina	4. den	7. den	10. den
Skupina C	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2
Skupina B	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2
Skupina C	0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0

(zpracoval dr. Pejchal)

7.1.8 Celkové histopatologické skóre hojení ran

Ve 4, 7 a 10denním intervalu po indukci ran nebyly nalezeny mezi jednotlivými skupinami signifikantní rozdíly celkového histopatologického skóre hojení ran (Tab. 12).

Signifikantní rozdíly bylo možné pozorovat pouze mezi jednotlivými časovými intervaly v rámci skupin.

Tab. 12. Celkové histopatologické skóre hojení ran.

skupina	4. den	7. den	10. den
Skupina C	2,5 ± 0,5	8,1 ± 0,6 *	14,3 ± 2,4 *
Skupina B	3,1 ± 0,7	8,5 ± 0,7 *	12,8 ± 1,0 *
Skupina A	3,6 ± 0,6	8,3 ± 0,8 *	13,8 ± 1,9 *

*Signifikantní rozdíl proti předchozímu časovému bodu: $p \leq 0,05$ *. (zpracoval dr. Pejchal)*

7.1.9 Detekce CD34 pozitivních buněk

Vzhledem k tomu, že jak myši, tak potkaní protilátka určená k detekci znaku CD34+ vykazovala falešnou negativitu, hodnocení počtu CD34 pozitivní struktur nebylo provedeno.

7.2 Celogenomová analýza

K analýze byly dodány referenční vzorky kůže z operačního odběru a poté vzorky skupiny A a skupiny C odebrané 4., 7. a 10. den.

7.2.1 Celkové srovnání vzorků mezi sebou

Celkové srovnání odebraných vzorků bylo provedeno analýzou principiálních komponent (PCA) a pomocí hierarchického klastrování.

Modelové poranění zvýšilo *in situ* transkripci v rádech stovek genů. A to u obou skupin, jak léčených, tak neléčených (Tab. 13). Zároveň se ukázalo, že ještě vyšší počet transkriptů je snížených. To pravděpodobně odráželo fakt, že v ranách oproti referenčně vyšetřené kůži chyběly keratinocyty a proteiny jimi produkované. V průběhu hojení rány počty zvýšených a snížených genů postupně klesaly. Při posledním odběru 10. den se však zdaleka neblížily expresi v referenční kůži. V léčených ranách tak po celou dobu experimentu bylo celkově více zvýšených i snížených genů.

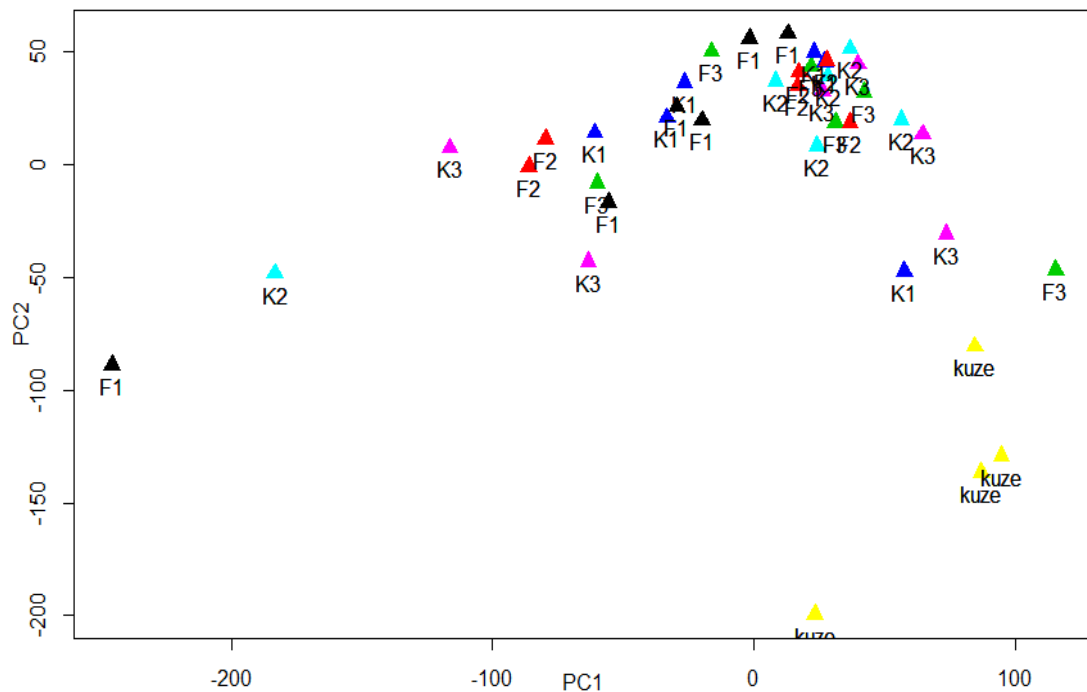
Tab. 13: Počet významně změněných transkriptů v jednotlivých skupinách a časech.

Skupina	Čas odběru	Počet zvýšených transkriptů	Počet snížených transkriptů
Skupina C	1	833	2743
	2	905	2608
	3	681	2244
Skupina A	1	1250	3747
	2	971	2882
	3	830	2512

Významná změna odpovídá více než dvojnásobnému zvýšení nebo snížení oproti kůži a p hodnotě upravené nižší než 0.05.

K celkovému náhledu na genovou expresi napříč vzorky posloužila analýza principiálních komponent, které zachytila zdroje variability mezi jednotlivými vzorky v počtech zvýšených a snížených transkripcí. Při grafickém zobrazení se očekávaně vydělily se vzorky intaktní kůže, které sloužily jako kontrola metodického postupu. Při vyhodnocení nebyly patrné vydělené skupiny vzorků určité doby odběru, určité skupiny nebo obojího zároveň. Nebyly patrné expresně odlišné subpopulace vzorků. Dva vzorky označené F1 a K2 byly odlehlé. PCA je zachycena na Grafu 4.

Graf č. 4: Analýza principiálních komponent.



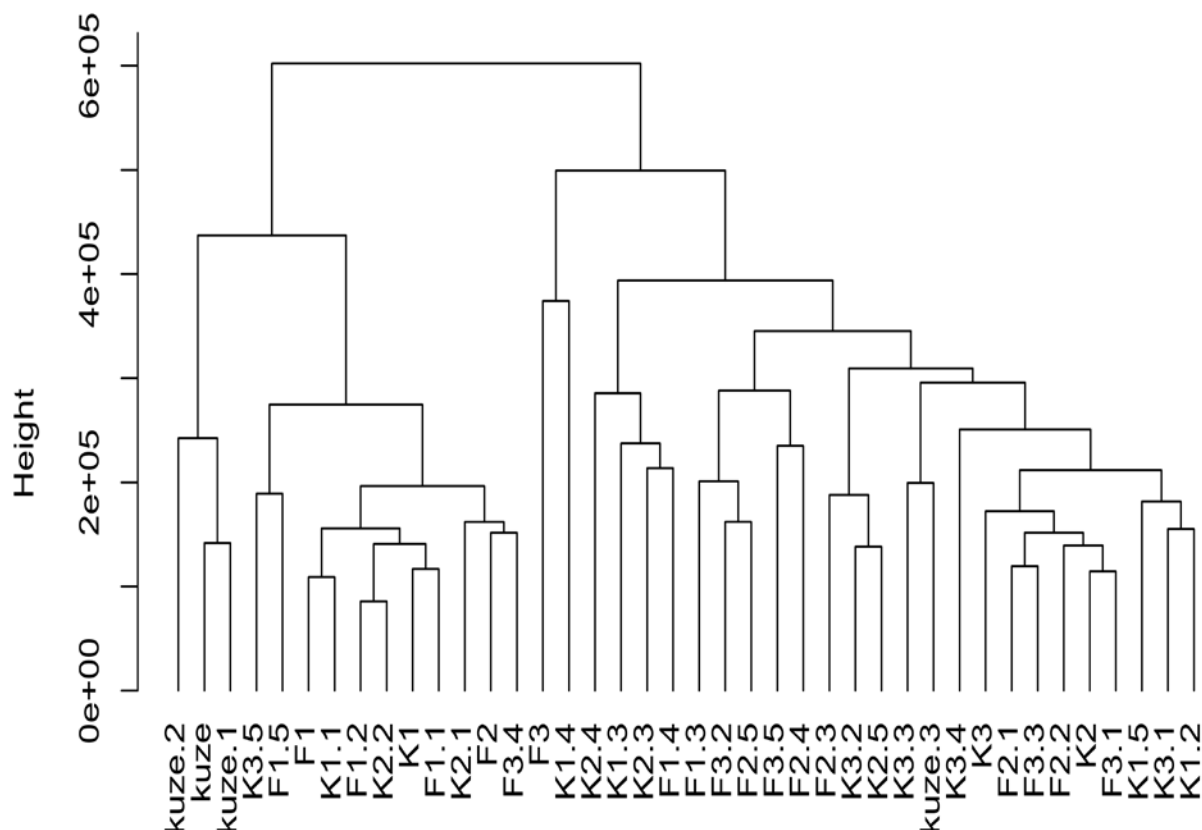
Jednotlivé skupiny (F = léčená skupina A, K = kontrolní skupina C, kuze = intaktní kůže) a časy (odběrové dny) jsou znázorněny různou barvou symbolů (zpracoval Mgr. Pavlík)

Celkový pohled na podobnost jednotlivých vzorků mezi sebou ukázalo hierarchické klastrování (Graf 5).

Tři vzorky intaktní kůže si byly velmi podobné, jeden vzorek kůže byl zbylým vzorkům odlehlý. Dendrogram bylo možné rozdělit na dva klastry ve výšce cca $5 \cdot 10^5$. Levá skupina vzorků měla, kromě retenčních vzorků kůže i více vzorků ze 4. odběrového dne. Druhá skupina vzorků naopak vyšší množství vzorků z pozdějších odběrů. Toto dělení není bez výjimek,

vzorky z pozdějších odběrů jsou v levé skupině, a naopak šest vzorků ze 4. odběrového dne je v pravé skupině. Analýza principiálních komponent ani hierarchické klastrování neodhalilo podskupiny vzorků, kromě uvedených třech referenčních vzorků kůže, které by si byly podobné.

Graf č. 5: Hierarchické klastrování všech exprimovaných genů napříč vzorky.



Jednotlivé skupiny (F = léčená skupina A , K = kontrolní skupina C , $kuze$ = intaktní kůže) a odběr (1. – 3. odběrový dne) jsou odlišeny pořadovým číslem vzorku v dané experimentální skupině (zpracoval Mgr. Pavlík).

7.2.2 Procesy zvýšené v ranách oproti kůži – analýza genových ontologií

Genové ontologie posloužily pro shrnutí vlastností genů, které byly významně zvýšené nebo snižené. Následující tabulky ukazují název a statistickou významnost daného procesu (Tab 14 – 25). Detaily o genech v jednotlivých ontologiích jsou uvedeny v Příloze č. 3.

Jak je zřejmé z Tab. 13, bylo detekováno vysoké množství zvýšených a snížených genů v ráně oproti kůži. Tab. 14 a .

Tab. 15 ukazují statisticky významně zvýšené genové ontologie u skupiny A a skupiny C ve srovnání s intaktní kůží. Je zřetelné, že nejvýznamněji jsou v obou skupinách zvýšeny zánětlivé procesy, které reprezentují termíny *immune system proces*, *defense response a cellular response to interleukin-1*. *Biological adhesion* odráží migraci buněk do rány. V Tab. 17 a Tab. 18 jsou procesy, které jsou sniženy u obou skupin (léčená A a kontrolní C). U obou skupin vzorků oproti kůži chybí epidermis, to je z genových ontologií také zřejmé.

Tab. 14: Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině C 4. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
regulation of gastrulation	1.85E-02
cellular response to interleukin-1	3.96E-03
biological adhesion	6.06E-06
peptide secretion	1.74E-04
chemokine metabolic process	3.04E-02
regulation of T cell proliferation	4.15E-02
immune system proces	5.80E-13
regulation of proteolysis	9.38E-05

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně zvýšených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík).

Tab. 15: Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině A 4. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
modification of morphology or physiology of other organism	4.59E-03
acute-phase response	2.92E-03
regulation of protein phosphorylation	2.39E-03
chemokine metabolic proces	2.94E-02
biological adhesion	3.01E-05
defense response	2.13E-11

cellular response to interleukin-1	3.74E-03
biological regulation	3.87E-02
regulation of ERK1 and ERK2 cascade	4.66E-02

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně zvýšených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík).

Tab. 16: Procesy genových ontologií snižené ve skupině C 4. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
intermediate filament cytoskeleton organization	5.24E-04
molting cycle	3.01E-04
hair follicle development	4.56E-02
cell proliferation involved in mesonephros development	1.04E-03
BMP signaling pathway involved in heart induction	4.89E-02
epidermis development	9.96E-10
negative regulation of mesonephros development	5.14E-03

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snižených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 17: Procesy genových ontologií snižené ve skupině A 4. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
hair follicle development	4.56E-02
intermediate filament cytoskeleton organization	5.24E-04
negative regulation of mesonephros development	5.14E-03
molting cycle	3.01E-04
epidermis development	9.96E-10

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snižených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 18: Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině C 7. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
------------------	---

regulation of proteolysis	3.72E-03
immune system proces	4.27E-16
chemokine metabolic proces	2.94E-02
regulation of protein phosphorylation	2.10E-03
regulation of gastrulation	1.75E-02
leukocyte differentiation	1.97E-03

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snížených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Druhý odběrový termín, tj. 7. pooperační den, byly ještě výrazněji zvýšené procesy imunitní odpovědi (Tab. 19,20, 21). U léčené skupiny A je téměř 40 % z analyzovaných genů spojováno s imunitními procesy. Geny regulující proteinovou fosforylaci, které tvoří 21 % setu genů v analýze u skupiny A jsou různé povahy. Od signálních molekul IL1B, IFNG, přes adhezivní molekuly PECAM1, až po fosfatázy PTPN22 a kinázy PAK2. Ani ve vzorcích 7. poop. den se výrazněji nelišila léčená a kontrolní skupina. Snížené jsou v obou skupinách opět genové ontologie, které odrážejí absenci epidermis u vzorků ran.

Tab. 19: Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině A 7. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	P
regulation of T cell proliferation	3.89E-02
immune system proces	3.84E-13
chemokine metabolic proces	2.94E-02
regulation of gastrulation	1.77E-02
regulation of protein phosphorylation	9.03E-05
modification of morphology or physiology of other organism	4.59E-03

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snížených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 20: Procesy genových ontologií snížené ve skupině C 7. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
intermediate filament cytoskeleton organization	5.24E-04

hair cycle	3.01E-04
skin development	5.37E-09
hair follicle development	4.56E-02

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snížených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 21: Procesy genových ontologií snížené ve skupině A 7. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	P
molting cycle	3.01E-04
epidermis development	9.96E-10
intermediate filament cytoskeleton organization	5.24E-04
negative regulation of mesonephros development	5.14E-03
negative regulation of endopeptidase activity	2.15E-02
hair follicle development	4.56E-02

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snížených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Stejně jako v předchozích odběrových termínech i ve třetím odběrovém termínu tj. 10. poop. den jsou významně zvýšené procesy imunitní odpovědi (Tab. 22. Tab. 23).

Tab. 22. Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině C 10. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	P
chemokine metabolic process	2.94E-02
immune system process	5.80E-15
regulation of protein phosphorylation	2.39E-03
regulation of peptidase activity	1.62E-03
apoptotic signaling pathway	1.41E-02

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snížených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 23: Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině A 10. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
immune system proces	9.11E-15
chemokine metabolic proces	3.04E-02
regulation of protein phosphorylation	1.95E-05
regulation of gastrulation	1.85E-02

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snížených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 24: Procesy genových ontologií snižené ve skupině C 10. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
negative regulation of mesonephros development	4.98E-03
negative regulation of endopeptidase aktivity	1.92E-02
epithelium development	4.26E-02
epidermis development	2.42E-07

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snížených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 25: Procesy genových ontologií snižené ve skupině A 10. poop. den v porovnání s referenční kůží.

Jméno GO termínu	p
intermediate filament cytoskeleton organization	5.24E-04
hair follicle development	4.56E-02
hair cycle	3.01E-04
epidermis development	1.83E-08

Vypočteno na základě 100 nejvíce významně snížených genů. (zpracoval Mgr. Pavlík)

7.2.3 Porovnání vzorků exponované a kontrolní skupiny v odběrových dnech

Porovnány byly nejvíce zvýšené a nejvíce snižené geny ve vzorcích ve srovnání genové exprese mezi skupinami A a C v jednotlivých odběrových dnech (Tab. 26 – 31).

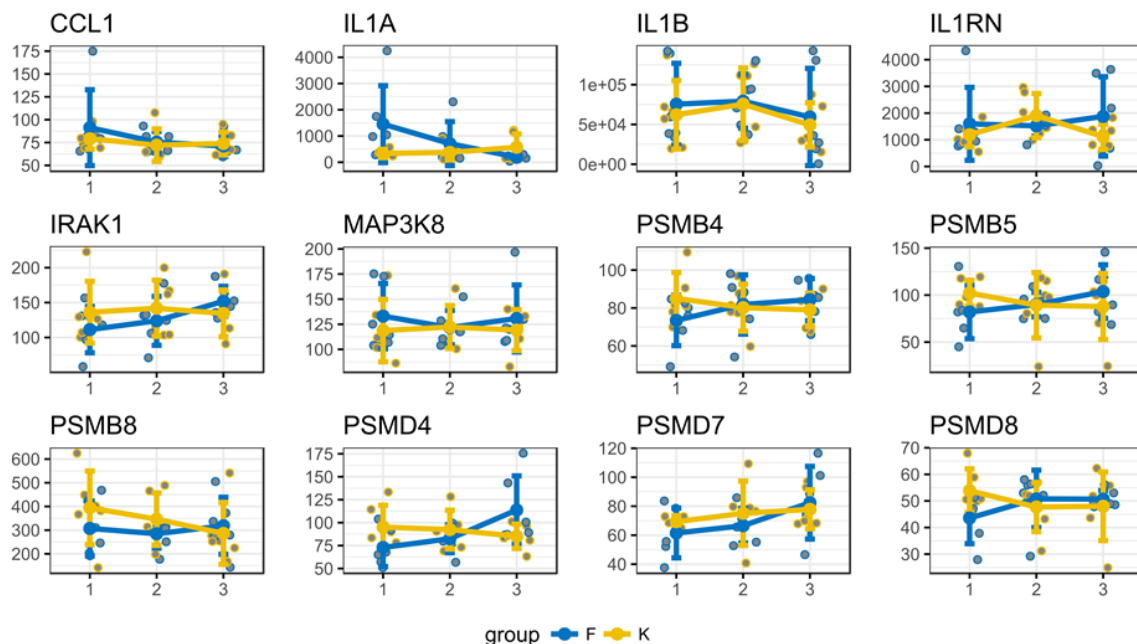
Tab. 26: Nejvíce zvýšené geny ve skupině A v provnání se skupinou C 4. poop. den.

Gen	Popis	A vs C [%]	p
IL1A	interleukin 1 alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5991]	330	0.89
PHKA1	phosphorylase kinase regulatory subunit alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8925]	304	0.89
PNLIPRP2	pancreatic triacylglycerol lipase precursor [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001075786]	296	0.89
ST8SIA2	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10870]	291	0.89
SYT2	synaptotagmin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11510]	285	0.89
AMDHD1	amidohydrolase domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28577]	283	0.89
SLC44A5	solute carrier family 44 member 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28524]	283	0.89
THPO	thrombopoietin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11795]	277	0.89
SAMD3	sterile alpha motif domain containing 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21574]	273	0.89
DERL3	derlin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14236]	267	0.89
AKR1E2	aldo-keto reductase family 1 member E2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23437]	267	0.89
SIX2	SIX homeobox 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10888]	262	0.89
SGCG	sarcoglycan gamma [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10809]	261	0.89
USP22	ubiquitin specific peptidase 22 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12621]	260	0.89

ZNF263	zinc finger protein 263 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13056]	257	0.89
DUXA	double homeobox A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:32179]	256	0.89
EGFL8	EGF like domain multiple 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13944]	256	0.89
NTS	neurotensin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8038]	256	0.89
FGF5	fibroblast growth factor 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3683]	252	0.89
GZMK	granzyme K [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4711]	251	0.89
CCL2	C-C motif chemokine 2 precursor [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001075763]	246	0.89
SFTPB	surfactant protein B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10801]	245	0.89
GRO-A	GRO	243	0.89
UGT2C1	UDP-glucuronosyltransferase	242	0.89

IL1a byl statisticky statisticky nevýznamně zvýšený v léčených ranách 4. pooperační den oproti kontrolní skupině, součástí byly dále i jiné geny, např. uvedený CCL2. Granzym K je serinová proteáza cytotoxických T lymfocytů, to naznačovalo jejich vyšší počet nebo aktivitu v léčených ranách. Interleukin 1 je součástí velké sítě genů, které na něj reagují. Jedněmi z těchto genů jsou součástí proteazomu. Proteazom v buňce štěpí pro-IL1 molekuly a zabraňuje tak nárůstu jejich hladiny a uvolňování. Geny proteazomu byly sniženy zároveň se zvýšením IL1A exprese, to dále podporuje hypotézu, že je IL1A zvýšený v léčených ranách (Obr. 6).

Obr. 6: Snížení proteazomových komponent a současné zvýšení IL1A u skupiny A v průběhu experimentu.



Na ose y je exprese daného vzorku vzhledem ke kůži v %, osa x u grafů reprezentuje pořadí odběru. (zpracoval Mgr.Pavlík)

Tab. 27: Nejvíce snížené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 4. poop. den.

Gen	Popis	A vs C [%]	p
PTP4A3	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9636]	31	0.89
DDIT4L	DNA damage inducible transcript 4 like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30555]	33	0.89
THBS2	thrombospondin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11786]	34	0.89
ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:145]	35	0.89
ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:143]	36	0.89
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:130]	38	0.89
ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:129]	41	0.89

PODXL	podocalyxin like	41	0.89
TPM2	tropomyosin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12011]	43	0.89
TNNI2	Oryctolagus cuniculus troponin I (TNNI2), mRNA [NM_001082783]	45	0.89
MYLPF	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	46	0.91
ACTN2	actinin alpha 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:164]	47	0.89
YBX3	Y-box binding protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2428]	47	0.89
MB	myoglobin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6915]	48	0.89
MN1	MN1 proto-oncogene, transcriptional regulator [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7180]	49	0.89
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	49	0.89
FUS	FUS RNA binding protein	50	0.89
KCNJ2	potassium voltage-gated channel subfamily J member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6263]	50	0.92
COL6A2	collagen type VI alpha 2 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2212]	50	0.89
TPM1	tropomyosin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12010]	50	0.89
USP13	ubiquitin specific peptidase 13 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12611]	50	0.89
BGN	biglycan [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1044]	50	0.89
MMP2	matrix metalloproteinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7166]	51	0.89
CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	51	0.89

Tabulka ukazuje snížení genů pro proteiny svalů. Rozdíl je daný pravděpodobně hloubkou odběru biopsie mezi jednotlivými skupinami, u kontrolních mohla být odebrána část fascie. (zpracoval Mgr. Pavlík)

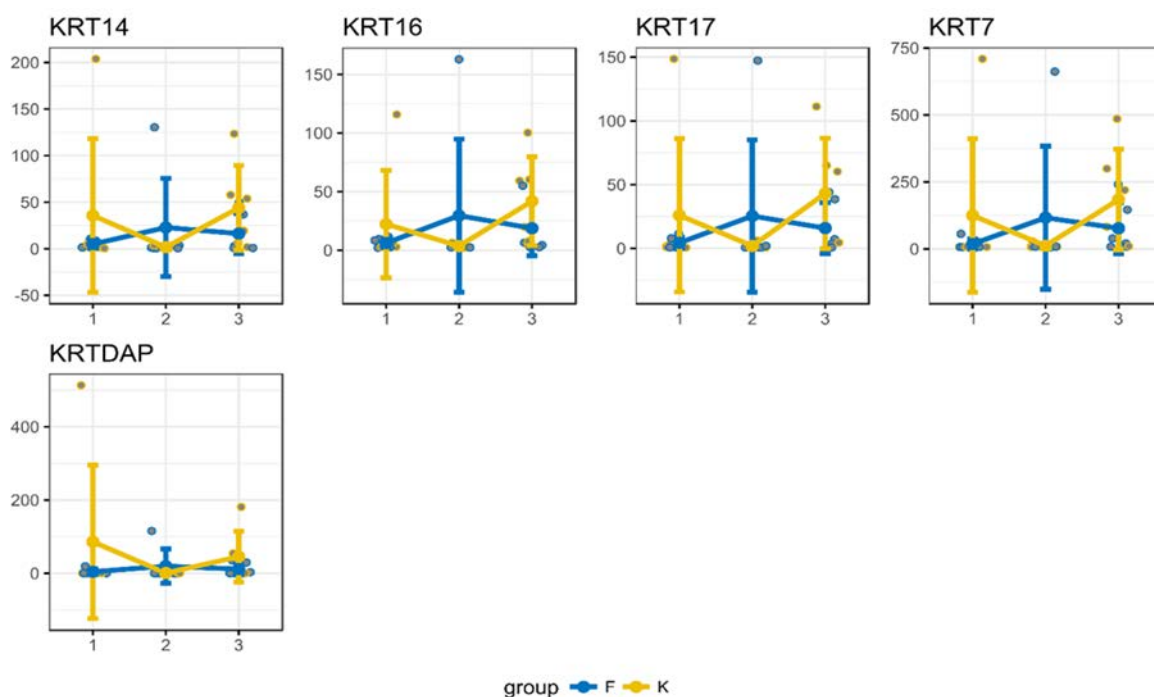
Tab. 28: Nejvíce zvýšené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 7. poop. den.

Gen	Popis	A vs C [%]	p
NTS	neurotensin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8038]	241	1
EFEMP1	EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3218]	210	1
SAA3	Serum amyloid A-3	189	1
SFTPB	surfactant protein B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10801]	188	1
KRTDAP	keratinocyte differentiation associated protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16313]	180	1
S100A8	S100 calcium binding protein A8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10498]	179	1
GRO-A	GRO	179	1
CSTA		178	1
S100A9	S100 calcium binding protein A9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10499]	176	1
CST6	cystatin E/M [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2478]	175	1
SPINK5	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15464]	174	1
CA9	carbonic anhydrase 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1383]	173	1
KRT14	keratin 14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6416]	173	1
VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17032]	171	1
MRP-8	Macrophage migration inhibitory factor-related protein-8	169	1
KRT16	keratin 16 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6423]	166	1
CALML5	calmodulin like 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18180]	165	1
EGLN3	egl-9 family hypoxia inducible factor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14661]	163	1
C1orf68	chromosome 1 open reading frame 68 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29468]	162	1
KRT17	keratin 17 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6427]	162	1

GJB2	gap junction protein beta 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4284]	160	1
KRT7	keratin 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6445]	159	1
CA2	carbonic anhydrase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1373]	158	1
S100A14	S100 calcium binding protein A14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18901]	158	1

Zvýšená exprese S100 vápník vázajících proteinů (S100A8 a S100A9) naznačovala vyšší chemotaxi pro neutrofilů v léčené skupině druhý odběrový termín (7. poop. den). Třetí protein této skupiny, S100A14, reguluje migraci buněk skrze MMP2 modulaci. CA2 a CA9 geny kódují enzymy reverzibilní přeměny CO₂ na hydrogenuhličitanový a vodíkový ion, čímž regulují pH a pomáhají odstranit CO₂. Statisticky nevýznamně se zvýšily v léčené skupině (skupina A) keratiny, při bližším zkoumání je ale zřejmé, že jednalo o hodnoty zvýšené pouze u jednoho jedince (Obr. 7).

Obr. 7. Geny keratinů, které byly v průměru zvýšené u skupiny A v porovnání se skupinou C 7. poop. den.



Na ose y je exprese daného vzorku vzhledem ke kůži v %, osa x u grafů reprezentuje pořadí odběru. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 29: Nejvíce snižené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 7. poop. den.

Gen	Popis	A vs C [%]	p
MYLPF	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	20	1
MYL3	myosin light chain 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7584]	27	1
MYL2	myosin light chain 2	27	1
TNNC2	troponin C type 2 (fast)	28	1
TNNG1F	Tumor necrosis factor Tumor necrosis factor, membrane form Intracellular domain 1 Intracellular domain 2 C-domain 1 C-domain 2 Tumor necrosis factor, soluble form [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P04924]	29	1
HTR1A	5-hydroxytryptamine receptor 1A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5286]	29	1
KCNJ2	potassium voltage-gated channel subfamily J member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6263]	30	1
LOC100009304	perinatal myosin heavy chain	31	1
RYR2	ryanodine receptor 2 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001076226]	33	1
CSRP3	cysteine and glycine rich protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2472]	33	1
CASQ2	calsequestrin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1513]	33	1
ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15819]	33	1
MYL1	myosin light chain 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7582]	34	1
TNNC1	troponin C1, slow skeletal and cardiac type	34	1
TNNI2	Oryctolagus cuniculus troponin I (TNNI2), mRNA [NM_001082783]	35	1
DES	desmin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2770]	35	1
ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:143]	36	1
ACTN2	actinin alpha 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:164]	37	1
SMPX	small muscle protein, X-linked [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11122]	38	1

APOBEC2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:605]	38	1
HSPB3	heat shock protein family B (small) member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5248]	39	1
MB	myoglobin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6915]	39	1
CKMT2	creatine kinase S-type, mitochondrial precursor [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001156542]	40	1
CACNB1	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1401]	40	1

Stejně jako v prvním odběrovém dnu, snížené geny u exponované skupiny A byly pravděpodobně důsledkem nerovnoměrného odběru biopsie, kdy byla nejspíše odebrána i část fascie u kontrolních zvířat. Proto se jevíly tyto geny svalů u skupiny A snížené. (zpracoval Mgr. Pavlík)

Tab. 30. Nejvíce zvýšené geny ve skupině C v porovnání se skupinou C 10. poop. den.

Gen	Popis	A vs C [%]	p
CD163	CD163 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1631]	256	1
LECT1	leukocyte cell-derived chemotaxin 1 [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001075509]	223	1
ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:814]	219	1
SEPP1	Selenoprotein P, plasma, 1	212	1
LOC100342572	Cytochrome P450 2E1-like	205	1
ABCA8	ATP binding cassette subfamily A member 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:38]	198	1
C4BPA	complement component 4 binding protein alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1325]	198	1
CMBL	carboxymethylenebutenolidase homolog [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25090]	195	1
FABP4	fatty acid binding protein 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3559]	195	1
SVEP1	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15985]	191	1

NSUN3	NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26208]	188	1
CLU	clusterin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2095]	188	1
FOLH1	folate hydrolase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3788]	186	1
PENK	proenkephalin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8831]	181	1
C1QC	complement C1q C chain [Source:HGNC 1245]	181	1
INMT	indolethylamine N-methyltransferase	176	1
C1QB	complement C1q B chain [Source:HGNC:1242]	175	1
ALDDH	Oryctolagus cuniculus aldehyde dehydrogenase (ALDDH), mRNA [NM_001082013]	175	1
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	175	1
RAMP2	receptor activity modifying protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9844]	172	1
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16940]	171	1
EFEMP1	EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3218]	171	1
ABCG2	ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:74]	168	1
MGP	matrix Gla protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7060]	167	1
CADM3	cell adhesion molecule 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17601]	167	1

Komponenty komplementu mohly být exprimovány dendritickými buňkami odvozenými z monocyty, to by mohlo naznačovat jejich vyšší množství v ráně ve skupině A. Rovněž CD163, makrofágy exprimovaný protein hraje roli ve fagocytóze hemoglobin/haptoglobinových komplexů. Solubilní forma CD163 může působit protizánětlivě. Dále se zdály být v léčených ranách zvýšené proteiny mezibuněčné hmoty EFEMP1 a MGP, chaperon CLU a CD36, k němuž jsou vázány nejrůznější ligandy proteinové i lipidické povahy. (zpracoval Mgr. Pavlík)

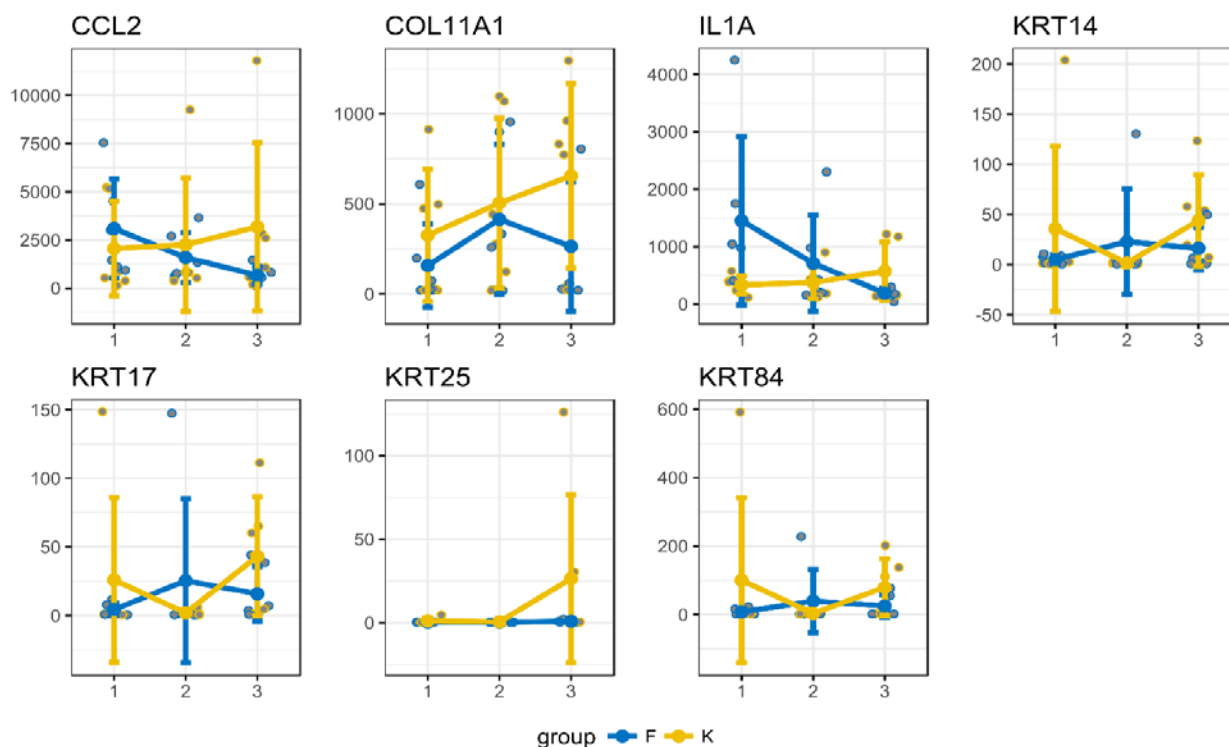
Tab. 31: Nejvíce snižené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 10. poop. den.

Gen	Popis	A vs C [%]	p
KRT14	keratin 14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6416]	25	1
COL11A1	collagen type XI alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2186]	29	1
KRTAP8-1	keratin associated protein 8-1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18935]	29	1
KRTAP11-1	keratin associated protein 11-1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18922]	30	1
KRT25	keratin 25 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30839]	30	1
KRT17	keratin 17 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6427]	30	1
KRTDAP	keratinocyte differentiation associated protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16313]	31	1
KRTAP3-1	keratin associated protein 3-1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16778]	32	1
KRT16	keratin 16 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6423]	36	1
CCL2	C-C motif chemokine 2 precursor [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_001075763]	36	1
FABP9	fatty acid binding protein 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3563]	36	1
KRTAP15-1	keratin associated protein 15-1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18927]	38	1
KRT84	keratin 84 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6461]	38	1
KRT28	keratin 28 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30842]	38	1
MT4	metallothionein 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18705]	39	1
SPINK5	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15464]	39	1
KRTAP7-1	keratin associated protein 7-1 (gene/pseudogene) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18934]	40	1
KRT10	keratin 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6413]	41	1
GRO-A	GRO	42	1
IL1A	interleukin 1 alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5991]	42	1

GJB2	gap junction protein beta 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4284]	43	1
SEC16B	SEC16 homolog B, endoplasmic reticulum export factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30301]	43	1
GJB6	gap junction protein beta 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4288]	44	1
S100A14	S100 calcium binding protein A14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18901]	44	1
DAPL1	death associated protein like 1	44	1

Po 10 dnech léčby byly v exponované skupině A sníženy keratiny a asociované proteiny (tabulka 25). Rozdíl není statisticky významný, několik vzorků kontrolních ran mělo vyšší expresi (pravděpodobně začátek epitelizace). Snížení prozánětlivých CCL2 a IL1A u léčených byl dáno zvýšenou expresí těchto genů u 2-3 jedinců v kontrolní skupině. Nicméně ve 3. odběrovém intervalu byly léčené rány s malým rozptylem, nevyskytly se zde vzorky se zvýšeným zánětem (Obr. 8).

Obr. 8: Geny kreatinů, kolagenu 11 a prozánětlivých CCL2 a IL1A, které byly v průměru sníženy ve skupině A v porovnání se skupinou C 10. poop. den.



(zpracoval Mgr. Pavlík).

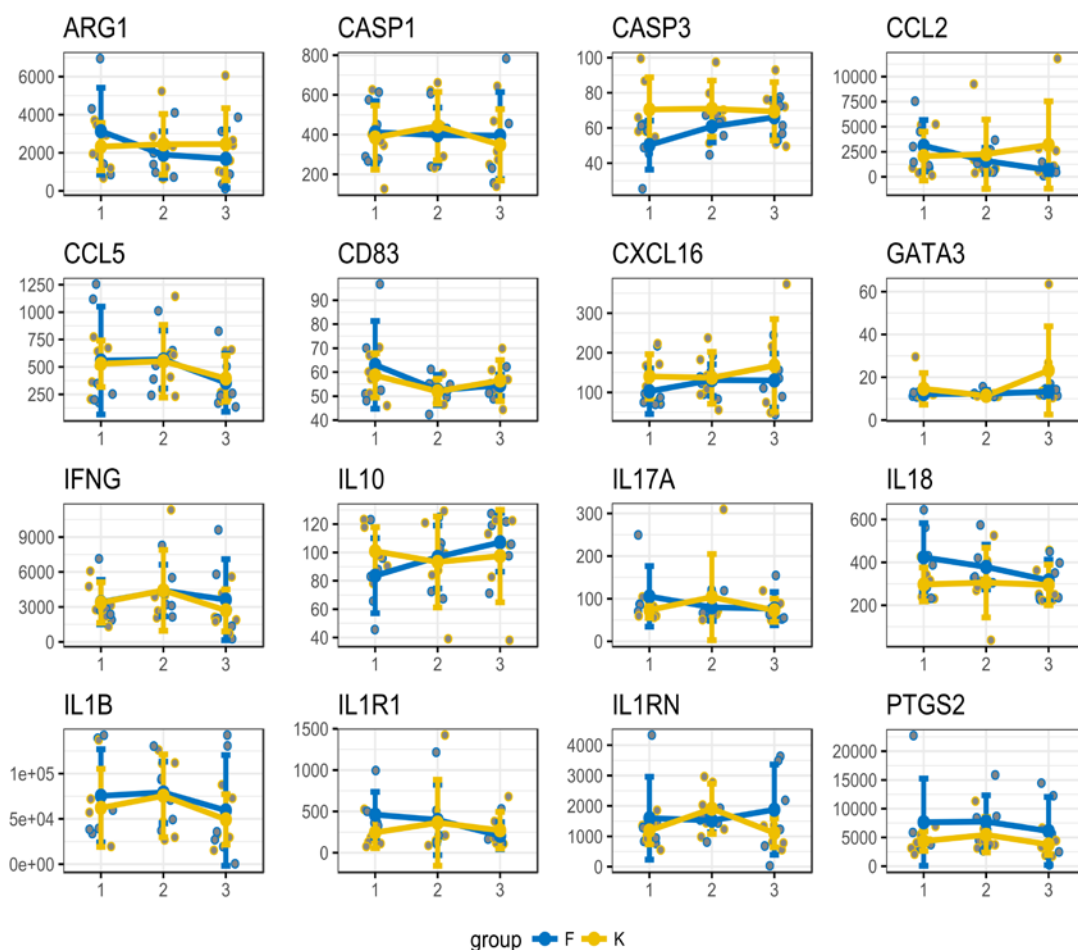
7.2.4 Průběh exprese v ranách vybraných genů

Tato kapitola ukazuje expresi genů, které byly vybrány podle publikovaných zpráv (Příloha č. 3), jako měnící se v průběhu HBOT. Výběr genů je omezen na ty geny, pro které jsou známy sekvence u králíka a tedy na ně mohly být navrženy microarray sondy.

7.2.4.1 Zánět

Podle předpokladu jsou geny zánětu u ran zvýšené oproti kůži, jak ve skupině A, tak ve skupině C. Žádný významně odlišný trend v expresi těchto genů však mezi skupinami není. Skupina A má některé geny (IL18, ARG1; IL1A, viz Obr. 8) 4. poop. den zvýšené, rozdíly ale nejsou významné a léčba neovlivnila expresi těchto tlivých genů (Obr. 9).

Obr. 9: Změny exprese genů zánětu v průběhu HBOT.



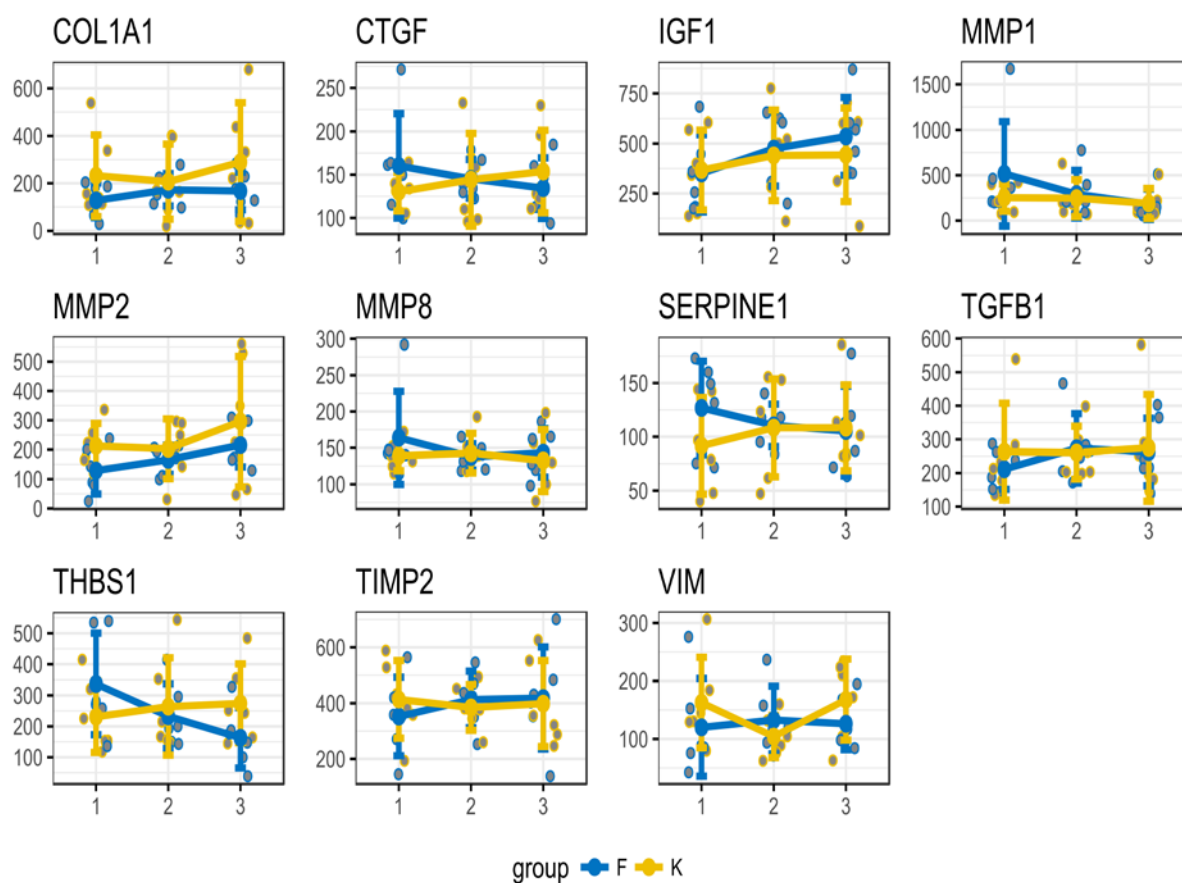
Na ose y je exprese daného vzorku vzhledem ke kůži v %, osa x u grafů reprezentuje pořadí odběru. (zpracoval Mgr. Pavlík)

7.2.4.2 Produkce mezibuněčné hmoty

Rozdíl v expresi genů spojených s produkcí mezibuněčné hmoty (EMC) mezi exponovanou skupinou A a kontrolní skupinou C se neprokázal.

Překvapivě není rozdíl ani v expresi v průběhu hojení, exprese těchto genů významně nekolísá (Obr. 10).

Obr. 10. Geny spojené s tvorbou a degradací ECM v průběhu HBOT.

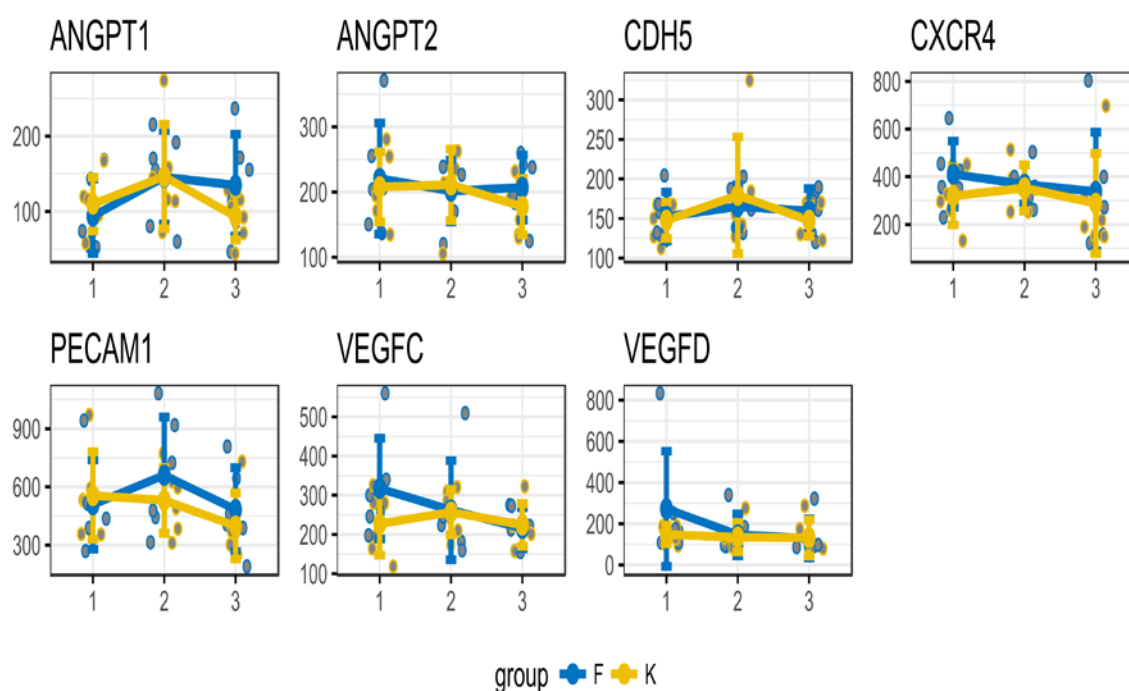


Na ose y je exprese daného vzorku vzhledem ke kůži v %, osa x u grafů reprezentuje pořadí odběru. (zpracoval Mgr. Pavlík)

7.2.4.3. Angiogeneze

Geny spojené s angiogenezí ukázaly na probíhající angiogenezi bez statisticky významného rozdílu mezi exponovanou skupinou A a kontrolní skupinou C. Náznak zvýšené exprese VEGFC a VEGFD v 1. odběrový den byl dán odlehlou hodnotou (Obr. 11).

Obr. 11: Geny spojené s angiogenezí v průběhu HBOT.

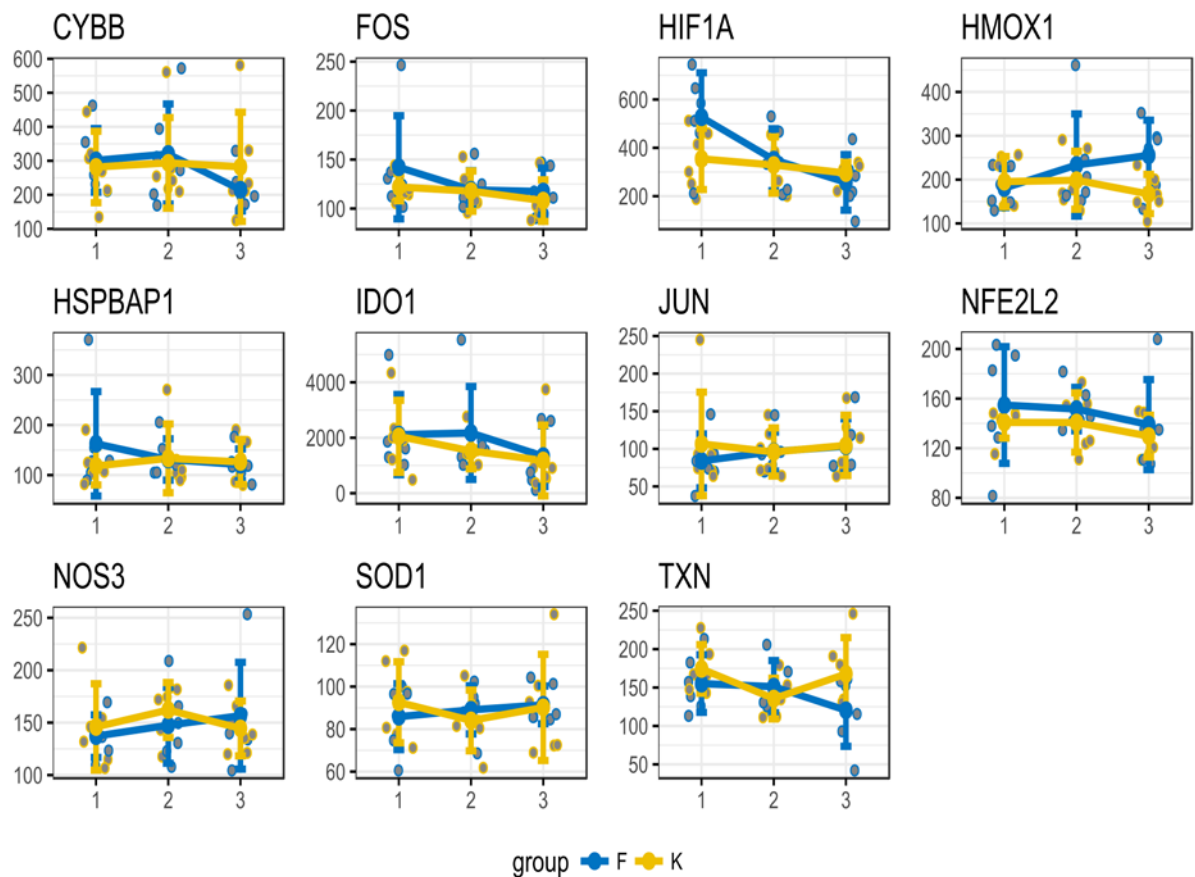


Na ose y je exprese daného vzorku vzhledem ke kůži v %, osa x u grafů reprezentuje pořadí odběru. (zpracoval Mgr. Pavlík)

7.2.4.4 Oxidační stres

V této skupině genů se jevil již v prvním odběrovém dni překvapivě zvýšený HIF1A. Rozdíl vyšetřovaných vzorků mezi exponovanou skupinou A a kontrolní skupinou nebyl významný ani v případě skupiny genů oxidačního stresu (Obr. 12).

Obr. 12: Geny spojené oxidačním stresem v průběhu HBOT.

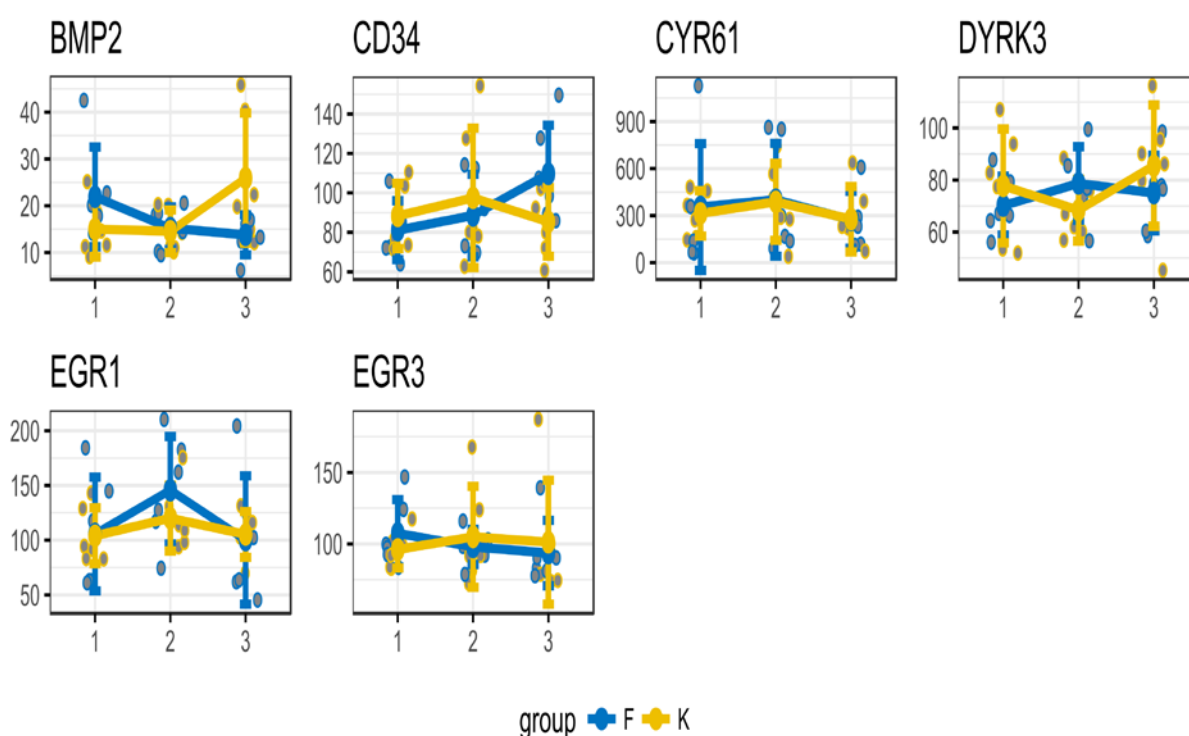


Na ose y je exprese daného vzorku vzhledem ke kůži v %, osa x u grafů reprezentuje pořadí odběru. (zpracoval Mgr. Pavlík)

7.2.4.5 Proliferace a diferenciaci

Stejně jako v předchozích vyšetřeních, ani v trendech exprese genů spojených s proliferací a diferenciací buněk nabyly nalezeny významné rozdíly mezi zvířaty exponované skupiny A a kontrolní skupiny C (Obr. 13). Exprese těchto genů se často pohybovala pod hladinou exprese neporušené kůže (hodnota 100). Výjimkou je CYR61, který hraje roli v proliferaci, chemotaxi a angiogenezi.

Obr. 13. Geny spojené s proliferací a diferenciací v průběhu HBOT.



Na ose y je exprese daného vzorku vzhledem ke kůži v %, osa x u grafů reprezentuje pořadí odběru. (zpracoval Mgr. Pavlík)

7.2.5 Závěr celogenomové analýzy

Shrnutí provedené celogenomové analýzy a porovnání skupin A a C. Řada genů pro zánět byla zvýšená u obou skupin ran oproti referenční expresi v kůži. Efekt HBOT se však na genové expresi neprojevil, nebyly nalezeny statisticky významně změněné geny mezi skupinami.

8 VYHODNOCENÍ

8.1 Výsledky histologického a imunohistochemického hodnocení

Výsledky histologického a imunohistochemického hodnocení hojících se ran neprokázaly, že by hyperbaroxická oxygenoterapie aplikovaná po osm pooperační dní v režimu jednou a dvakrát denně při tlaku 2,5 bar po 90 minut ovlivnila rychlost hojení ran na hřbetě zdravých králíků při porovnání s kontrolní skupinou. Mezi časovými intervaly v rámci skupin bylo možné zaznamenat pouze změny dané postupným hojením ran.

8.2 Celogenomová analýza expresí mRNA

Celogenomová analýza expresí mRNA v hojících se ranách neprokázala, že by hyperbaroxická oxygenoterapie aplikovaná po osm pooperační dní v režimu dvakrát denně při tlaku 2,5 bar po 90 minut ovlivnila hojení ran na hřbetě zdravých králíků v porovnání s kontrolní skupinou. Srovnání rozdílů v expresi genů ukázalo, že poranění zvířete vedlo k zvýšení exprese řádově stovek genů, jak u léčených, tak u kontrolních zvířat. Žádný významně odlišný trend v expresi těchto genů mezi léčenými a neléčenými zvířaty v průběhu hojení však nebyl nalezen.

8.3 Průběh experimentu

Průběh experimentu ověřil dobře zvolený experimentální model a postup, který lze využít v další výzkumné práci.

9 DISKUZE

Účinky HBOT na hojení ran jsou předmětem odborné polemiky a výzkumu po delší období. Analýzy publikovaných svědčily poměrně jednoznačně pro přínos HBOT. Kromě práce dánských autorek Quiriniové a Viidikové (78) publikované v roce 1998 byly provedené výzkumy uzavírány optimistickými a pozitivními závěry. Stejně výzkumy ale byly opakovaně kritizovány pro nedostatky v metodologii a zpracování dat. Problém částečně tkvěl ve složitosti zadání výzkumu, které je velmi složité. Prolínají se zde děje na molekulární úrovni s buněčným metabolismem a fyziologií celého organismu, pouhé klinické hodnocení výsledku léčby nelze dobře objektivizovat. Po zahájení našeho výzkumu v roce 2016 se objevily první práce experimentálního charakteru od holandských a amerických autorů, které optimismus dvou dekad narušily.

K metodice naší práce. Jedním z nových a perspektivních přístupů k výzkumu biologických dějů je sledování hladin mRNA, které odráží genovou expresi. Na otázku, zda a jak by mohla metoda sledování genové exprese objektivizovat vliv hyperbarického kyslíku na hojení rány, již odpověděly biologické a biochemické studie, které dílčím způsobem shrnul v obecném přehledu Choudhury (44). Vzhledem ke zmíněné komplexnosti procesů probíhajících v průběhu hojení rány, bylo vhodné zvolit pro výzkum genové exprese microarray technologii. Touto metodou je u jednoho vzorku zkoumána exprese několika tisíc genů najednou. Vliv HBOT na změnu exprese genů už zkoumán byl a práce v jiných klinických směrech, než je hojení rány, měly podporovat naši hypotézu. Hojením kožních ran se zabývala studie sledující kožní štěp, který byl ovlivněn HBO a poté transplantován (94), závěr studie podporoval pozitivní účinek HBOT. Ve studii Kima (95) byla indukována na myších uších dermatitida a sledován efekt HBOT na imunitní odpověď a oxidační stres. HBO pomohla hojení potkaních ischemických a hyperglykemických kožních ran (99). Na potkaních ischemických ranách byly popsány mechanismy, včetně snížení exprese matrixových metaloproteináz, kterými HBOT působí na hojení (101). HBOT neměnila expresi HIF-1a a VEGF jak v hojení kůže tak slizničního epitelu (103). U diabetických vředů (107) byla po HBOT pozorována zvýšená mobilizace vaskulogenních kmenových buněk v krvi pacientů. Dosud provedené studie popisující působení HBOT na expresi zánětlivých genů se vesměs shodují a uvádí, že po aplikaci HBO klesají prozánětlivé markery (typicky IL1 beta) a naopak stoupá hladina protizánětlivých cytokinů (IL-10 a IL-4). Také je downregulován takzvaný „inflammasome“, to je proteinový komplex tvořící se v myeloidních buňkách, který je součástí vrozené imunity a je schopen zvýšit prozánětlivou odpověď. Tyto informace ale pochází ze studií centrálního

nervového systému, v ranách takové působení publikováno nebylo. HBOT u modelu ischemických ran zvyšovala tvorbu kolagenu, v jiných pozorováních ale buď bránila tvorbě matrixových metalopeptidáz (ischemické potkaní rány), nebo bránila nadměrné fibróze, která je problémem při radioaktivním ozáření slinných žláz (92). Při hodnocení u potkaních kožních štěpů byla angiogeneze po HBOT stimulována, u prasečích kožních štěpů však byla angiogeneze snížena. Expresce cévního a endoteliálního růstového faktoru se napříč experimenty po HBOT snižovala nebo se neměnila. Expresce antioxidantních genů se po ovlivnění HBOT zvyšovala (např. TXN, SOD1, NFE2L2, HMOX1), případně stoupala v jedné a klesala v jiné studii (SOD2). Naopak prooxidační gen NOS2 vykazoval napříč studiemi sníženou expresi. Hypoxií indukovaný faktor alfa (HIF1A) měl různé tendence, v diabetických ranách se jeho exprese po HBO zvyšovala, u kontaktní dermatitidy a nádoru se snižovala. Proliferační a diferenciací geny kostních buněk se v zubních lůžcích po extrakci potkaních zubů snižovaly. Naopak u ozářených slinných žláz myši se zvyšovala skupina růstových faktorů (EGF), které jsou zodpovědné za ranou odpověď na buněčný stres, včetně ischemie. Zdá se, že v ohledu proliferace a diferenciací záleží na kontextu tkáně.

Mezi studiemi využívající analýzu genové exprese chyběly takové, které by hlouběji popisovaly mechanismus hojení u reálných akutních traumatických ran. Jak vyplývá z výše uvedeného, bylo možno vyjít z již zmapovaného genového uspořádání a vyřešeného vztahu mezi popsány geny a biologickými pochody hojení: zánět, produkce mezibuněčné hmoty, angiogeneze, oxidační stres, proliferace a diferenciací.

Zkoumání buněčných pochodů v „ve změnách“ pomocí genomové detekce jsme doplnili anatomickým korelátem – histologickým a imunohistochemickým vyšetřením. Domníváme se, že sdružením těchto vyšetření, fyziologického (dynamického) a morfologického (statického) je možné v případě shodného výsledku problém účinnosti HBOT u hojení rány s vysokou jistotou uzavřít.

K histopatologickému vyšetřování. Když porovnáme rychlost hojení v našem experimentu podle morfologického hodnocení s publikovanými modely, jeví se pomalejší, než tomu bylo u punch biopsií na hřbetu králíků v rozsahu 6 × 10 mm (114). Na druhé straně odpovídá rychlosti hojení větších ran (115) u králíka. Toto srovnání je pouze přibližné, pro přesné zhodnocení by bylo nutné porovnávat literárními modely se stejným rozsahem poranění.

V rámci vyšetřovaných skupin bylo možné pozorovat poměrně vysoký rozptyl hodnot celkového histopatologického skóre hojení. Ukazují to tabulky hodnoty histopatologických

parametrů individuálních zvířat uvedené v příloze. Ačkoliv není možné z výsledku histopatologické analýzy vyvodit závěry, jednotlivé případy poukazují na faktory, které rychlost hojení ran mohly ovlivňovat. Prvním faktorem je kvalita zakrojení hrany řezu nebo přesah svalového laloku směrem do rány. Rovněž rozptýl dat histopatologického skóre zánětu (zejména v 10denním intervalu) mohl na jedné straně odrážet pouze pomalejší hojení rány, na druhou stranu mohl naznačovat i přítomnost infekce v rán, byť nebyla pozorována.

Hojení rány v našem experimentu bylo sledováno též makroskopicky. Průběh a závěry tohoto hodnocení nejsou součástí této práce. Hodnocení hojení rány bylo na základě literárních zkušeností nastaveno k maximální eliminaci subjektivity. Prováděli ho dva hodnotitelé nezávisle, dané výsledky byly průměrovány a přepočítávány na plochu poranění i s detailním popisem okolí rány. Parametry hodnocení byly zvoleny podle Graye (113). V závěrech našeho experimentu došlo k rozporu mezi makroskopickým a ostatními hodnoceními. Při zhodnocení váhy informací jsme dospěli k názoru, že makroskopické hodnocení, jako zásadně subjektivní v použité metodice experimentu, je třeba odmítnout. Závěr však může být cenný v hodnocení kontextu výzkumu posledních dekad a vysvětlovat optimistické závěry řady publikací před dosažením současných vědomostí o buněčné fyziologii.

Výsledky předloženého experimentu zapadají do aktuálně probíhajícího světového výzkumu a je zřejmé, že pomohou zvýšit „level of evidence“, po které tak volají přehledové analýzy i konsenzus hyperbarické medicíny (4,7).

10 ZÁVĚR

Hyperbarická oxygenoterapie je po dlouhou dobu jednou z možností, jak zlepšit hojení ran. Zavedení do rutinní praxe brání nedostatek vědeckých důkazů. Předložená experimentální studie se pokusila o vyřešení problému s využitím nejnovějších poznatků v imunohistochemii a genomové analýze.

V experimentu na zvířecím modelu byly porovnávány tři skupiny poraněných králíků. Jedna skupina byla léčena intenzivní HBOT s aplikací dvakrát denně, druhá skupina byla léčena aplikací HBOT jednou denně, třetí skupiny byla kontrolní a nebyla léčena HBOT. Aplikace HBOT technicky probíhala podle standardu běžného v humánní medicíně.

Výsledky histologického a imunohistochemického hodnocení neprokázaly, že by hyperbaroxická oxygenoterapie ovlivňovala hojení ran. V rámci skupin bylo možné zaznamenat pouze změny dané postupným hojením, bez souvislosti s aplikací HBOT. Celogenomová analýza expresí mRNA neprokázala, že by hyperbaroxická oxygenoterapie ovlivňovala hojení ran. Srovnání rozdílů v expresi genů ukázalo, že poranění zvířete vedlo k zvýšení exprese řádově stovek genů, jak u léčených, tak u kontrolních zvířat. Žádný významně odlišný trend v expresi těchto genů mezi léčenými a neléčenými zvířaty v průběhu hojení však nebyl nalezen.

Výsledky experimentu nepotvrdily předpoklad pozitivního vlivu HBOT na hojení rány a nepodporují zavedení metody do klinické praxe v traumatologii.

Průběh experimentu ověřil dobře zvolený experimentální model, který lze využít v další výzkumné práci.

11 LITERATURA

1. Fontain JA. Emploi Chirurgical de l'air Comprime. *Union Med.* 1879;28:445.
2. Bert P. *La Pression barométrique recherches de physiologie expérimentale.* Paris, France: Masson; 1878.
3. Boerema I. Life without blood. *J Cardiovasc Surg.* 1960;12:133-146.
4. Mathieu D, Marroni A, Kot J. Tenth European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine: recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment [published correction appears in *Diving Hyperb Med.* 2017 Jun;47(2):131-132]. *Diving Hyperb Med.* 2017;47(1):24-32. doi:10.28920/dhm47.1.24-32.
5. Kimmel HM, Grant A, Ditata J. The Presence of Oxygen in Wound Healing. *Wounds.* 2016;28(8):264-270.
6. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017;34(3):599-610. doi:10.1007/s12325-017-0478-y
7. de Smet GHJ, Kroese LF, Menon AG, et al. Oxygen therapies and their effects on wound healing. *Wound Repair Regen.* 2017;25(4):591-608. doi:10.1111/wrr.12561
8. Drew P, Posnett J, Rusling L. Wound Care Audit Team. The cost of wound care for a local population in England. *Int Wound J.* 2007;4(2):149-155. doi:10.1111/j.1742-481X.2007.00337.x
9. Posnett J, Gottrup F, Lundgren H, Saal G. The resource impact of wounds on health-care providers in Europe. *J Wound Care.* 2009;18(4):154-161. doi:10.12968/jowc.2009.18.4.41607
10. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* 2009;17(6):763-771. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x
11. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem.* 2004;264(1-2):85-97. doi:10.1023/b:mcbi.0000044378.09409.b5

12. Maulik N. Redox signaling of angiogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(5):805-815. doi:10.1089/152308602760598963
13. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*. 2014;2:535-562. doi:10.1016/j.redox.2014.02.006
14. Zhu G, Wang Q, Lu S, Niu Y. Hydrogen Peroxide: A Potential Wound Therapeutic Target? *Med Princ Pract*. 2017;26(4):301-308. doi:10.1159/000475501
15. Gille G, Sigler K. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol (Praha)*. 1995;40(2):131-152. doi:10.1007/BF02815413
16. Hájek M, et al. *Hyperbarická medicína*. Praha, Czechia: Mladá fronta; 2017.
17. Kanta J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2011;54:97-101.
18. Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1348-1361. doi:10.1016/j.bbagen.2008.01.006
19. Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther*. 2006;13(1):211-220. doi:10.1016/j.ymthe.2005.07.684
20. Shi MM, Godleski JJ, Paulauskis JD. Regulation of macrophage inflammatory protein-1 α mRNA by oxidative stress. *J Biol Chem*. 1996;271(10):5878-5883. doi:10.1074/jbc.271.10.5878
21. Jaramillo M, Olivier M. Hydrogen peroxide induces murine macrophage chemokine gene transcription via extracellular signal-regulated kinase- and cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)-dependent pathways: involvement of NF-kappa B, activator protein 1, and cAMP response element binding protein. *J Immunol*. 2002;169(12):7026-7038. doi:10.4049/jimmunol.169.12.7026
22. Fraticelli A, Serrano CV Jr, Bochner BS, Capogrossi MC, Zweier JL. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1310(3):251-259. doi:10.1016/0167-4889(95)00169-7

23. Kim MH, Liu W, Borjesson DL, et al. Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *J Invest Dermatol.* 2008;128(7):1812-1820. doi:10.1038/sj.jid.5701223
24. Segal AW, Geisow M, Garcia R, Harper A, Miller R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature.* 1981;290(5805):406-409. doi:10.1038/290406a0
25. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature.* 2002;416(6878):291-297. doi:10.1038/416291a
26. Wijkstrom-Frei C, El-Chemaly S, Ali-Rachedi R, et al. Lactoperoxidase and human airway host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(2):206-212. doi:10.1165/rcmb.2002-0152OC
27. Schreml S, Landthaler M, Schäferling M, Babilas P. A new star on the H₂O₂ horizon of wound healing?. *Exp Dermatol.* 2011;20(3):229-231. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01195.x
28. Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem.* 1992;267(19):13425-13433.
29. Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):165-171. doi:10.1016/j.phrs.2008.06.004
30. Tovmasyan A, Sheng H, Weitner T, et al. Design, mechanism of action, bioavailability and therapeutic effects of mn porphyrin-based redox modulators. *Med Princ Pract.* 2013;22(2):103-130. doi:10.1159/000341715
31. auf dem Keller U, Kümin A, Braun S, Werner S. Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2006;11(1):106-111. doi:10.1038/sj.jidsymp.5650001
32. Eligini S, Arenaz I, Barbieri SS, et al. Cyclooxygenase-2 mediates hydrogen peroxide-induced wound repair in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(10):1428-1436. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.026

33. Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, et al. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J*. 2004;18(2):300-310. doi:10.1096/fj.03-0473com
34. Rao R, Redha R, Macias-Perez I, et al. Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo. *J Biol Chem*. 2007;282(23):16959-16968. doi:10.1074/jbc.M701214200
35. Cho M, Hunt TK, Hussain MZ. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(5):H2357-H2363. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.5.H2357
36. Brauchle M, Funk JO, Kind P, Werner S. Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem*. 1996;271(36):21793-21797. doi:10.1074/jbc.271.36.21793
37. Ruef J, Hu ZY, Yin LY, et al. Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circ Res*. 1997;81(1):24-33. doi:10.1161/01.res.81.1.24
38. Loo AE, Ho R, Halliwell B. Mechanism of hydrogen peroxide-induced keratinocyte migration in a scratch-wound model. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(4):884-892. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.001
39. Loo AE, Halliwell B. Effects of hydrogen peroxide in a keratinocyte-fibroblast co-culture model of wound healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423(2):253-258. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.100
40. Hemmerlein B, Johanns U, Halbfass J, et al. The balance between MMP-2/-9 and TIMP-1/-2 is shifted towards MMP in renal cell carcinomas and can be further disturbed by hydrogen peroxide. *Int J Oncol*. 2004;24(5):1069-1076.
41. Wilgus TA, Bergdall VK, Dipietro LA, Oberyszyn TM. Hydrogen peroxide disrupts scarless fetal wound repair. *Wound Repair Regen*. 2005;13(5):513-519. doi:10.1111/j.1067-1927.2005.00072.x
42. Tanaka H, Okada T, Konishi H, Tsuji T. The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res*. 1993;285(6):352-355. doi:10.1007/BF00371836

43. Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science*. 1985;227(4688):747-749.
doi:10.1126/science.2982211
44. Choudhury R. Hypoxia and hyperbaric oxygen therapy: a review. *Int J Gen Med*. 2018;11:431-442. doi:10.2147/IJGM.S172460
45. Wittenberg JB, Wittenberg BA. Myoglobin-enhanced oxygen delivery to isolated cardiac mitochondria. *J Exp Biol*. 2007;210(Pt 12):2082-2090. doi:10.1242/jeb.003947
46. Kueh HY, Niethammer P, Mitchison TJ. Maintenance of mitochondrial oxygen homeostasis by cosubstrate compensation. *Biophys J*. 2013;104(6):1338-1348.
doi:10.1016/j.bpj.2013.01.030
47. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(7):332-340. doi:10.1016/j.tem.2009.04.001
48. Hoffman DL, Salter JD, Brookes PS. Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(1):H101-H108. doi:10.1152/ajpheart.00699.2006
49. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease [published correction appears in *N Engl J Med*. 2011 Sep 8;365(10):968]. *N Engl J Med*. 2011;365(6):537-547.
doi:10.1056/NEJMra1011165
50. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*. 2011;364(7):656-665. doi:10.1056/NEJMra0910283
51. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659-669. doi:10.1182/blood-2004-07-2958
52. Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*. 2009;284(25):16767-16775.
doi:10.1074/jbc.M901790200
53. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*. 1995;77(3):638-643. doi:10.1161/01.res.77.3.638

54. Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis*. 2008;11(2):121-140. doi:10.1007/s10456-008-9107-3
55. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep*. 2005;57 Suppl:108-119.
56. Wang C, Schwaitzberg S, Berliner E, Zarin DA, Lau J. Hyperbaric oxygen for treating wounds: a systematic review of the literature. *Arch Surg*. 2003;138(3):272-280. doi:10.1001/archsurg.138.3.272
57. Kaur S, Pawar M, Banerjee N, Garg R. Evaluation of the efficacy of hyperbaric oxygen therapy in the management of chronic nonhealing ulcer and role of periwound transcutaneous oximetry as a predictor of wound healing response: A randomized prospective controlled trial. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2012;28(1):70-75. doi:10.4103/0970-9185.92444
58. Löndahl M, Katzman P, Nilsson A, Hammarlund C. Hyperbaric oxygen therapy facilitates healing of chronic foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2010;33(5):998-1003. doi:10.2337/dc09-1754
59. Ma L, Li P, Shi Z, Hou T, Chen X, Du J. A prospective, randomized, controlled study of hyperbaric oxygen therapy: effects on healing and oxidative stress of ulcer tissue in patients with a diabetic foot ulcer. *Ostomy Wound Manage*. 2013;59(3):18-24.
60. Duzgun AP, Satir HZ, Ozozan O, Saylam B, Kulah B, Coskun F. Effect of hyperbaric oxygen therapy on healing of diabetic foot ulcers. *J Foot Ankle Surg*. 2008;47(6):515-519. doi:10.1053/j.jfas.2008.08.002
61. Fedorko L, Bowen JM, Jones W, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy Does Not Reduce Indications for Amputation in Patients With Diabetes With Nonhealing Ulcers of the Lower Limb: A Prospective, Double-Blind, Randomized Controlled Clinical Trial. *Diabetes Care*. 2016;39(3):392-399. doi:10.2337/dc15-2001
62. Abidia A, Laden G, Kuhan G, et al. The role of hyperbaric oxygen therapy in ischaemic diabetic lower extremity ulcers: a double-blind randomised-controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003;25(6):513-518. doi:10.1053/ejvs.2002.1911

63. Kalani M, Jörneskog G, Naderi N, Lind F, Brismar K. Hyperbaric oxygen (HBO) therapy in treatment of diabetic foot ulcers. Long-term follow-up. *J Diabetes Complications*. 2002;16(2):153-158. doi:10.1016/s1056-8727(01)00182-9
64. Opasanon S, Pongsapich W, Taweepraditpol S, Suktitipat B, Chuangsuwanich A. Clinical Effectiveness of Hyperbaric Oxygen Therapy in Complex Wounds. *J Am Coll Clin Wound Spec*. 2015;6(1-2):9-13. doi:10.1016/j.jccw.2015.03.003
65. Kessler L, Bilbault P, Ortéga F, et al. Hyperbaric oxygenation accelerates the healing rate of nonischemic chronic diabetic foot ulcers: a prospective randomized study. *Diabetes Care*. 2003;26(8):2378-2382. doi:10.2337/diacare.26.8.2378
66. Vishwanath G. Hyperbaric oxygen therapy in free flap surgery: is it meaningful?. *Med J Armed Forces India*. 2011;67(3):253-256. doi:10.1016/S0377-1237(11)60052-X
67. Feldman-Idov Y, Melamed Y, Ore L. Improvement of ischemic non-healing wounds following hyperoxygenation: the experience at Rambam-Elisha Hyperbaric Center in Israel, 1998-2007. *Isr Med Assoc J*. 2011;13(9):524-529.
68. Zgonis T, Garbalosa JC, Burns P, Vidt L, Lowery C. A retrospective study of patients with diabetes mellitus after partial foot amputation and hyperbaric oxygen treatment. *J Foot Ankle Surg*. 2005;44(4):276-280. doi:10.1053/j.jfas.2005.04.007
69. Chen CE, Ko JY, Fong CY, Juhn RJ. Treatment of diabetic foot infection with hyperbaric oxygen therapy. *Foot Ankle Surg*. 2010;16(2):91-95. doi:10.1016/j.fas.2009.06.002
70. Kaya A, Aydin F, Altay T, Karapinar L, Ozturk H, Karakuzu C. Can major amputation rates be decreased in diabetic foot ulcers with hyperbaric oxygen therapy?. *Int Orthop*. 2009;33(2):441-446. doi:10.1007/s00264-008-0623-y
71. Aydın F, Kaya A, Savran A, İncesu M, Karakuzu C, Öztürk AM. Diabetic hand infections and hyperbaric oxygen therapy. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2014;48(6):649-654. doi:10.3944/AOTT.2014.3225
72. Roje Z, Roje Z, Eterović D, et al. Influence of adjuvant hyperbaric oxygen therapy on short-term complications during surgical reconstruction of upper and lower extremity war injuries: retrospective cohort study. *Croat Med J*. 2008;49(2):224-232. doi:10.3325/cmj.2008.2.224

73. Sheikh AY, Gibson JJ, Rollins MD, Hopf HW, Hussain Z, Hunt TK. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg*. 2000;135(11):1293-1297. doi:10.1001/archsurg.135.11.1293
74. Hopf HW, Gibson JJ, Angeles AP, et al. Hyperoxia and angiogenesis. *Wound Repair Regen*. 2005;13(6):558-564. doi:10.1111/j.1524-475X.2005.00078.x
75. Sheikh AY, Rollins MD, Hopf HW, Hunt TK. Hyperoxia improves microvascular perfusion in a murine wound model. *Wound Repair Regen*. 2005;13(3):303-308. doi:10.1111/j.1067-1927.2005.130313.x
76. Bilic I, Petri NM, Bezic J, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on experimental burn wound healing in rats: a randomized controlled study. *Undersea Hyperb Med*. 2005;32(1):1-9.
77. Tumeerdem B, Emekli U, Ozden BC, Aktas S, Demiryont M, et al. The effect of hyperbaric oxygen therapy (HBO) when used postoperatively in skin grafting over radiated tissue in the rat. *Turk J Med Sci* 2004; 34: 29–35.
78. Quirinia A, Viidik A. The influence of occlusive dressing and hyperbaric oxygen on flap survival and the healing of ischaemic wounds. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1998;32(1):1-8. doi:10.1080/02844319850158895
79. Selçuk CT, Kuvat SV, Bozkurt M, et al. The effect of hyperbaric oxygen therapy on the survival of random pattern skin flaps in nicotine-treated rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2012;65(4):489-493. doi:10.1016/j.bjps.2011.11.015
80. Selçuk CT, Ozalp B, Durgun M, et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on the healing of burn wounds in nicotinized and nonnicotinized rats. *J Burn Care Res*. 2013;34(4):e237-e243. doi:10.1097/BCR.0b013e318270092e
81. Zhang T, Gong W, Li Z, et al. Efficacy of hyperbaric oxygen on survival of random pattern skin flap in diabetic rats. *Undersea Hyperb Med*. 2007;34(5):335-339.
82. Yıldırım AO, Eryılmaz M, Kaldırım U, et al. Effectiveness of hyperbaric oxygen and ozone applications in tissue healing in generated soft tissue trauma model in rats: an experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2014;20(3):167-175. doi:10.5505/tjtes.2014.09465

83. Tuk B, Tong M, Fijneman EM, van Neck JW. Hyperbaric oxygen therapy to treat diabetes impaired wound healing in rats. *PLoS One*. 2014;9(10):e108533. doi:10.1371/journal.pone.0108533
84. van Neck JW, Tuk B, Fijneman EM, Redeker JJ, Talahatu EM, Tong M. Hyperbaric oxygen therapy for wound healing in diabetic rats: Varying efficacy after a clinically-based protocol. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177766. doi:10.1371/journal.pone.0177766
85. Latimer CR, Lux CN, Roberts S, Drum MG, Braswell C, Sula MJM. Effects of hyperbaric oxygen therapy on uncomplicated incisional and open wound healing in dogs. *Vet Surg*. 2018;47(6):827-836. doi:10.1111/vsu.12931
86. Demaria M, Stanley BJ, Hauptman JG, et al. Effects of negative pressure wound therapy on healing of open wounds in dogs. *Vet Surg*. 2011;40(6):658-669. doi:10.1111/j.1532-950X.2011.00849.x
87. Geng F, Ma Y, Xing T, Zhuang X, Zhu J, Yao L. Effects of Hyperbaric oxygen therapy on inflammasome signaling after traumatic brain injury. *Neuroimmunomodulation*. 2016;23(2):122-129. doi:10.1159/000445689
88. Shapira R, Solomon B, Efrati S, Frenkel D, Ashery U. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates pathophysiology of 3xTg-AD mouse model by attenuating neuroinflammation. *Neurobiol Aging*. 2018;62:105-119. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.007
89. Liang F, Li C, Gao C, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on NACHT domain-leucine-rich-repeat- and pyrin domain-containing protein 3 inflammasome expression in rats following spinal cord injury. *Mol Med Rep*. 2015;11(6):4650-4656. doi:10.3892/mmr.2015.3314
90. Long Y, Liang F, Gao C, Li Z, Yang J. Hyperbaric oxygen therapy reduces apoptosis after spinal cord injury in rats. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(11):4073-4081.
91. Lavrnja I, Parabucki A, Brkic P, et al. Repetitive hyperbaric oxygenation attenuates reactive astrogliosis and suppresses expression of inflammatory mediators in the rat model of brain injury. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:498405. doi:10.1155/2015/498405
92. Spiegelberg L, Swagemakers SM, Van Ijcken WF, et al. Gene expression analysis reveals inhibition of radiation-induced TGF β -signaling by hyperbaric oxygen therapy in mouse

- salivary glands. *Mol Med*. 2014;20(1):257-269. Published 2014 Jul 10.
doi:10.2119/molmed.2014.00003
93. Lerche CJ, Christophersen LJ, Kolpen M, et al. Hyperbaric oxygen therapy augments tobramycin efficacy in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50(3):406-412. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.04.025
94. Kang N, Hai Y, Liang F, Gao CJ, Liu XH. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects skin flap grafts in rats against ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2014;9(6):2124-2130. doi:10.3892/mmr.2014.2064
95. Kim HR, Kim JH, Choi EJ, et al. Hyperoxygenation attenuated a murine model of atopic dermatitis through raising skin level of ROS. *PLoS One*. 2014;9(10):e109297. Published 2014 Oct 2. doi:10.1371/journal.pone.0109297
96. Oscarsson N, Ny L, Mölne J, et al. Hyperbaric oxygen treatment reverses radiation induced pro-fibrotic and oxidative stress responses in a rat model. *Free Radic Biol Med*. 2017;103:248-255. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.036
97. Lu Z, Ma J, Liu B, et al. Hyperbaric oxygen therapy sensitizes nimustine treatment for glioma in mice. *Cancer Med*. 2016;5(11):3147-3155. doi:10.1002/cam4.851
98. Yttersian Sletta K, Tveitarås MK, Lu N, et al. Oxygen-dependent regulation of tumor growth and metastasis in human breast cancer xenografts. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183254. doi:10.1371/journal.pone.0183254
99. André-Lévigne D, Modarressi A, Pignel R, Bochaton-Piallat ML, Pittet-Cuénod B. Hyperbaric oxygen therapy promotes wound repair in ischemic and hyperglycemic conditions, increasing tissue perfusion and collagen deposition. *Wound Repair Regen*. 2016;24(6):954-965. doi:10.1111/wrr.12480
100. Romero-Valdovinos M, Cárdenas-Mejía A, Gutiérrez-Gómez C, Flisser A, Kawa-Karasik S, Ortiz-Monasterio F. Keloid skin scars: the influence of hyperbaric oxygenation on fibroblast growth and on the expression of messenger RNA for insulin like growth factor and for transforming growth factor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011;47(7):421-424. doi:10.1007/s11626-011-9418-3

101. Zhang Q, Gould LJ. Hyperbaric oxygen reduces matrix metalloproteinases in ischemic wounds through a redox-dependent mechanism. *J Invest Dermatol.* 2014;134(1):237-246. doi:10.1038/jid.2013.301
102. Liu X, Yang J, Li Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning promotes neovascularization of transplanted skin flaps in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(8):4734-4744. Published 2014 Jul 15.
103. Chen L, Gajendrareddy PK, DiPietro LA. Differential expression of HIF-1 α in skin and mucosal wounds. *J Dent Res.* 2012;91(9):871-876. doi:10.1177/0022034512454435
104. Kalns JE, Dick EJ Jr, Scruggs JP, Kieswetter K, Wright JK. Hyperbaric oxygen treatment prevents up-regulation of angiogenesis following partial-thickness skin grafts in the pig. *Wound Repair Regen.* 2003;11(2):139-144. doi:10.1046/j.1524-475x.2003.11210.x
105. Wang CJ, Ko JY, Kuo YR, Yang YJ. Molecular changes in diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94(1):105-110. doi:10.1016/j.diabres.2011.06.016
106. Godman CA, Chheda KP, Hightower LE, Perdrizet G, Shin DG, Giardina C. Hyperbaric oxygen induces a cytoprotective and angiogenic response in human microvascular endothelial cells. *Cell Stress Chaperones.* 2010;15(4):431-442. doi:10.1007/s12192-009-0159-0
107. Thom SR, Milovanova TN, Yang M, et al. Vasculogenic stem cell mobilization and wound recruitment in diabetic patients: increased cell number and intracellular regulatory protein content associated with hyperbaric oxygen therapy. *Wound Repair Regen.* 2011;19(2):149-161.
108. Cebi G, Yildiz Ş, Uzun G, et al. The effect of hyperbaric oxygen therapy on rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure in rats. *Ren Fail.* 2016;38(9):1554-1559. doi:10.1080/0886022X.2016.1227925
109. Gajendrareddy PK, Sen CK, Horan MP, Marucha PT. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates stress-impaired dermal wound healing. *Brain Behav Immun.* 2005;19(3):217-222. doi:10.1016/j.bbi.2004.09.003
110. Huang H, Xue L, Zhang X, et al. Hyperbaric oxygen therapy provides neuroprotection following spinal cord injury in a rat model. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(7):1337-1342.

111. Parabucki AB, Bozić ID, Bjelobaba IM, et al. Hyperbaric oxygenation alters temporal expression pattern of superoxide dismutase 2 after cortical stab injury in rats. *Croat Med J.* 2012;53(6):586-597. doi:10.3325/cmj.2012.53.586
112. Silva ML, Tasso L, Azambuja AA, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on tooth extraction sites in rats subjected to bisphosphonate therapy-histomorphometric and immunohistochemical analysis. *Clin Oral Investig.* 2017;21(1):199-210. doi:10.1007/s00784-016-1778-3.
113. Grey D, White RJ, Cooper P. The wound healing continuum. *British Journal of Community Nursing* 2002; 7 (Suppl): 4.
114. Lemo N, Marignac G, Reyes-Gomez E, Lilin T, Crosaz O, Ehrenfest DMD. Cutaneous reepithelialization and wound contraction after skin biopsies in rabbits: a mathematical model for healing and remodelling index. *Veterinarski Arhiv.* 2010; 80(5): 637-652.
115. Valizadeh R, Hemmati AA, Houshmand G, Bayat S, Bahadoram M. Wound healing potential of *Althaea officinalis* flower mucilage in rabbit full thickness wounds. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(11): 937–943. doi:org/10.1016/j.apjtb.2015.07.018

12 SEZNAM ZKRATEK

HBOT	hyperbaric oxygen therapy (lčba hyperbarickým kyslíkem)
ADP	adenosindifosát
ATP	adenosintrifosát
ROS	reactive oxygen species (reaktivní sloučeniny kyslíku)
VEGF	vascular endothelial growth factor (endoteliální růstový faktor)
TGF	transforming growth factor (transformační růstový faktor)
HIF	hypoxia – inducible factor (hypoxií indukovatelný faktor)

13 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Schématické znázornění citrátového (Krebsova) cyklu.....	9
Obr. 2 – Schématické znázornění vlivu reaktivních forem kyslíku na hojení rány; upraveno podle Zhu a kol. (14).....	12
Obr. 3 – Postup vytvoření unifikované rány.....	25
Obr. 4 – Vytvořené rány na pokusném zvířeti.....	26
Obr. 5 – Boxy s králíky v tlakové komoře při expozici.....	29
Graf 1 – Průběh relativního tlaku při expozici HBOT.....	30
Graf 2 – Průtok kyslíku expozičním boxem.....	31
Graf 3 – Znázornění denního harmonogramu expozic HBOT.....	32
Graf 4 – Analýza principiálních komponent.....	48
Graf 5 – Hierarchické klastrování všech exprimovaných genů napříč vzorky.....	49
Obr. 6 – Snížení proteazomových komponent a současné zvýšení IL1A u skupiny A v průběhu experimentu.....	57
Obr. 7 – Geny keratinů, v průměru zvýšené u skupiny A v porovnání se skupinou C 7. poop. den.....	60
Obr. 8 – Geny kreatinů, kolagenu 11 a prozánětlivých CCL2 a IL1A, které byly v průměru snížené ve skupině A v porovnání se skupinou C 10. poop. den.....	65
Obr. 9 – Změny exprese genů zánětu v průběhu HBOT.....	66
Obr. 10 – Geny spojené s tvorbou a degradací ECM v průběhu HBOT.....	67
Obr. 11 – Geny spojené s angiogenezí v průběhu HBOT.....	68
Obr. 12 – Geny spojené oxidačním stresem v průběhu HBOT.....	69
Obr. 13 – Geny spojené s proliferací a diferenciací v průběhu HBOT.....	70

14 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Testování boxů pro experimentální zvířata v humánní barokomoře.....	28
Tab. 2 – Parametry histopatologického skóre hojení epitelu.....	36
Tab. 3 – Parametry histopatologického skóre hojení vaziva.....	38
Tab. 4 – Parametry histopatologického skóre zánětu.....	38
Tab. 5 – Histopatologické parametry hojení povrchového epitelu.....	42
Tab. 6 – Délka a plocha epidermálních listů.....	43
Tab. 7 – Vzdálenost epidermálních listů (μm).....	43
Tab. 8 – Mitotická aktivita.....	44
Tab. 9 – Histopatologické skóre hojení vaziva.....	44
Tab. 10 – Histopatologické skóre zánětu.....	46
Tab. 11 – Počet mikroabscesů v celém rozsahu rány.....	46
Tab. 12 – Celkové histopatologické skóre hojení ran.....	46
Tab. 13 – Počet významně změněných transkriptů v jednotlivých skupinách a časech...47	
Tab. 24 – Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině C 4. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	50
Tab. 15 – Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině A 4. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	50
Tab. 16 – Procesy genových ontologií snižené ve skupině C 4. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	50
Tab. 17 – Procesy genových ontologií snižené ve skupině A 4. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	51
Tab. 18 – Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině C 7. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	51
Tab. 19 – Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině A 7. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	52
Tab. 20 – Procesy genových ontologií snižené ve skupině C 7. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	52
Tab. 21 – Procesy genových ontologií snižené ve skupině A 7. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	53
Tab. 22 – Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině C 10. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	53

Tab. 23 – Procesy genových ontologií zvýšené ve skupině A 10. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	54
Tab. 24 – Procesy genových ontologií snižené ve skupině C 10. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	54
Tab. 25 – Procesy genových ontologií snižené ve skupině A 10. poop. den v porovnání s referenční kůží.....	54
Tab. 26 – Nejvíce zvýšené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 4. poop. den.....	55
Tab. 27 – Nejvíce snižené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 4. poop. den.....	57
Tab. 28 – Nejvíce zvýšené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 7. poop. den.....	59
Tab. 29 – Nejvíce snižené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 7. poop. den.....	61
Tab. 30 – Nejvíce zvýšené geny ve skupině C v porovnání se skupinou C 10. poop. den....	62
Tab. 31 – Nejvíce snižené geny ve skupině A v porovnání se skupinou C 10. poop. den.....	64

Příloha č. 1

č.j.

Operační protokol

Subjekt:

Králík domácí (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) – subjekt kódové označení:
.....

Stáří:

Váha:

Aplikovaná farmaka:

název farmaka	celková dávka, jednotky

Celková doba anestezie:

Celková doba výkonu:

Popis výkonu:

Subjekt uveden do CA. Dezinifikace operačního pole. Vytvoření 4 unifikovaných poranění v oblasti hřbetní svaloviny dle metodiky. Krvácení zastaveno kompresně. Celková krevní ztráta ml. Dále bez komplikací. Rány sterilně kryty a následně přelepeny. Subjekt vyveden z CA, bez komplikací.

Účastníci:

hodnost, titul, jméno, příjmení	podpis

V dne

Příloha č. 2

č.j.

Protokol odběrů vzorků

Subjekt:

klec č.:

.....

Králík domácí (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) – subjekt kódové označení:

.....

Váha:

1. odběr (4. pooperační den – datum):

2. odběr (7. pooperační den – datum):

3. odběr (10. pooperační den – datum):

Aplikovaná farmaka:

1. Odběr (4. pooperační den – datum)

název farmaka	celková dávka, jednotky

2. Odběr (7. pooperační den – datum)

název farmaka	celková dávka, jednotky

3. Odběr (10. pooperační den – datum)

název farmaka	celková dávka, jednotky

Příloha č. 3

Geny spojené s hojením rány nebo HBOT v publikovaných experimentech

Tabulka 1. Geny spojené se zánětem ve studiích účinků HBOT.			
Zánět			
Gen	Popis	Systém	Reference
AIM2	Absent In Melanoma 2	Traumatické poranění mozku myší	(Geng et al., 2016)
ARG1	Arginase 1	Transgenní myší model Alzheimerovy nemoci	(Shapira et al., 2018)
CASP1	Caspase 1	Přetětí míchy u potkana	(Liang et al., 2015)
CASP3	Caspase 3	Přetětí míchy u potkana	(Long et al., 2014)
CD40	CD40 Molecule	Léze v kortexu potkanů	(Lavrnja et al., 2015)
CD40L	CD40 Ligand	Léze v kortexu potkanů	(Lavrnja et al., 2015)
CD83	CD83 Molecule	Ozářené myší slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
CXCL1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1	Endokarditida <i>S. aureus</i> u myší	(Lerche et al., 2017)
HMGB1	High Mobility Group Box 1	Kožní štěp u potkanů	(Kang et al., 2014)
HMGB1	High Mobility Group Box 1	Traumatické poranění mozku myší	(Geng et al., 2016)
IFNG	Interferon Gamma	Kontaktní dermatitida myší	(Kim et al., 2014)
IFNG	Interferon Gamma	Ozáření močového měchýře potkanů	(Oscarsson et al., 2017)
IL10	Interleukin 10	Transgenní myší model Alzheimerovy nemoci	(Shapira et al., 2018)
IL10	Interleukin 10	Ozáření močového měchýře potkanů	(Oscarsson et al., 2017)
IL13	Interleukin 13	Ozáření močového měchýře potkanů	(Oscarsson et al., 2017)
IL17A	Interleukin 17A	Kontaktní dermatitida myší	(Kim et al., 2014)
IL18	Interleukin 18	Traumatické poranění mozku myší	(Geng et al., 2016)

Tabulka 2. Geny spojené s produkcí mezibuněčné hmoty (ECM) ve studiích účinků HBOT			
ECM			
Gen	Popis	Systém	Reference
CDH2	Cadherin 2	Model rakoviny prsu	(Yttersian Sletta et al., 2017)
COL1A1	Collagen Type I Alpha 1 Chain	Rány na končetinách ischemických a neischemických potkanů	(André-Lévigne et al., 2016)
CTGF	Connective Tissue Growth Factor	Ozářené myší slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1	Léze v kortexu potkanů	(Lavrnja et al., 2015)
IGF1	Insulin Like Growth Factor 1	Fibroblasty z keloidů a kontrolní kůže	(Romero-Valdovinos et al., 2011)
ITGB1	Integrin Subunit Beta 1	Model rakoviny prsu	(Yttersian Sletta et al., 2017)
MMP1	Matrix Metalloproteinase 1	Potkaní ischemické rány	(Zhang and Gould, 2014)
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2	Potkaní ischemické rány	(Zhang and Gould, 2014)
MMP8	Matrix Metalloproteinase 8	Potkaní ischemické rány	(Zhang and Gould, 2014)
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9	Myší nádor	(Lu et al., 2016)
SERPINE1	Serpin Family E Member 1	Ozářené myší slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
TGFB1	Transforming Growth Factor Beta 1	Fibroblasty z keloidů a kontrolní kůže	(Romero-Valdovinos et al., 2011)
TGFB1	Transforming Growth Factor Beta 1	Ozáření močového měchýře potkanů	(Oscarsson et al., 2017)
THBS1	Thrombospondin 1	Ozářené myší slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
TIMP2	TIMP Metalloproteinase Inhibitor 2	Potkaní ischemické rány	(Zhang and Gould, 2014)
VIM	Vimentin	Léze v kortexu potkanů	(Lavrnja et al., 2015)
VIM	Vimentin	Rány na končetinách ischemických a neischemických potkanů	(André-Lévigne et al., 2016)

Tabulka 3. Geny spojené s angiogenezí ve studiích účinků HBOT			
Angiogeneze			
Gen	Popis	System	Reference
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12	Kožní štěp u potkana	(Liu et al., 2014)
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4	Kožní štěp u potkana	(Liu et al., 2014)
PECAM1	Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1	Model rakoviny prsu	(Yttersian Sletta et al., 2017)
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	Endokarditida <i>S. aureus</i> u myší	(Lerche et al., 2017)
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	Myší nádor	(Lu et al., 2016)
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	Rána kůže a orální mukózy myší	(Chen et al., 2012)
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	Kožní štěp u prasete	(Kalns et al., 2003)
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	Diabetické lidské rány	(Wang et al., 2011)
VWF	Von Willebrand Factor	Diabetické lidské rány	(Wang et al., 2011)

Tabulka 4. Geny spojené s oxidačním stresem ve studiích účinků HBOT

Oxidační stres			
Gen	Popis	Systém	Reference
CAT1	Catalase 1	Potkaní ischemické rány	(Zhang and Gould, 2014)
CYBB	Cytochrome B-245 Beta Chain	Potkaní ischemické rány	(Zhang and Gould, 2014)
FOS	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	In vitro kultura lidských mikrovaskulárních	(Godman et al., 2010)
FOS	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	Ozářené myší slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
FOSB	FosB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	In vitro kultura lidských mikrovaskulárních endotelií (HMEC-1)	(Godman et al., 2010)
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit	Diabetické lidské rány	(Thom et al., 2011)
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit	Rána kůže a orální mukózy myší	(Chen et al., 2012)
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit	Kontaktní dermatitida myší	(Kim et al., 2014)
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit	Myší nádor	(Lu et al., 2016)
HMOX1	Heme Oxygenase 1	In vitro kultura lidských mikrovaskulárních endotelií (HMEC-1)	(Godman et al., 2010)
HMOX1	Heme Oxygenase 1	Ozáření močového měchýře potkanů	(Oscarsson et al., 2017)
HMOX1	Heme Oxygenase 1	Svalové zranění potkanů	(Cebi et al., 2016)
HSPA1A	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A	In vitro kultura lidských mikrovaskulárních endotelií (HMEC-1)	(Godman et al., 2010)
IDO1	Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1	Kontaktní dermatitida myší	(Kim et al., 2014)
JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	In vitro kultura lidských mikrovaskulárních endotelií (HMEC-1)	(Godman et al., 2010)
JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	Ozářené myší slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)

Tabulka 5. Geny spojené s oxidačním stresem ve studiích účinků HBOT			
Oxidační stres			
Gen	Popis	Systém	Reference
JUNB	JunB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	Ozářené myši slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2	In vitro kultura lidských mikrovaskulárních endotelií (HMEC-1)	(Godman et al., 2010)
NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2	Ozáření močového měchýře potkanů	(Oscarsson et al., 2017)
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2	Vliv stresu na hojení u myši	(Gajendrareddy et al., 2005)
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2	Poranění míchy u potkanů	(Huang et al., 2013)
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2	Potkaní ischemické rány	(Zhang and Gould, 2014)
NOS3	Nitric Oxide Synthase 3	Diabetické lidské rány	(Wang et al., 2011)
SOD1	Superoxide Dismutase 1	Potkaní ischemické rány	(Zhang and Gould, 2014)
SOD1	Superoxide Dismutase 1	Ozáření močového měchýře potkanů	(Oscarsson et al., 2017)
SOD2	Superoxide Dismutase 2	Ozáření močového měchýře potkanů	(Oscarsson et al., 2017)
SOD2	Superoxide Dismutase 2	Léze v kortexu potkanů	(Parabucki et al., 2012)
TXN	Thioredoxin	Diabetické lidské rány	(Thom et al., 2011)

Tabulka 6. Geny spojené s oxidačním stresem ve studiích účinků HBOT			
Proliferace a diferenciac			
Gen	Popis	Systém	Reference
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2	Zubní lůžko potkanů po extrakci	(Silva et al., 2017)
CD34	CD34 Molecule	Diabetické lidské rány	(Thom et al., 2011)
CYR61	Cysteine Rich Angiogenic Inducer	Ozářené myši slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
DYRK3	Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 3	Ozářené myši slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
EGF	Epidermal Growth Factor	Diabetické lidské rány	(Wang et al., 2011)
EGR1	Early Growth Response 1	Ozářené myši slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
EGR2	Early Growth Response 2	Ozářené myši slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
EGR3	Early Growth Response 3	Ozářené myši slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	Diabetické lidské rány	(Wang et al., 2011)
PROM1	Prominin 1	Diabetické lidské rány	(Thom et al., 2011)
RET	Ret Proto-Oncogene	Ozářené myši slinné žlázy	(Spiegelberg et al., 2014)
TNFRSF11B	TNF Superfamily Member 11B	Zubní lůžko potkanů po extrakci	(Silva et al., 2017)
TNFSF11	TNF Superfamily Member 11	Zubní lůžko potkanů po extrakci	(Silva et al., 2017)

Příloha č. 4

Hodnoty histopatologických parametrů individuálních zvířat

Tab. A. Kontrolní skupina

ID	4. den (X v ID = 1)				7. den (X v ID = 2)				10. den (X v ID = 3)			
	E	V	Z	C	E	V	Z	C	E	V	Z	C
I01 XK	0/0 (0)	0/0/0/0/ 0 (0)			1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)			2/1 (3)	0/2/1/1/ 1 (5)		1 1
I02 XK	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)			1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)			2/2 (4)	1/4/1/2/ 1 (9)		1 5
I03 XK	0/0 (0)	0/0/0/0/ 0 (0)			1/1 (2)	0/2/0/1/ 1 (4)			1/2 (3)	0/4/1/2/ 1 (8)		1 3
I04 XK	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)			1/1 (2)	0/2/0/1/ 1 (4)			2/1 (3)	1/3/0/2/ 1 (7)		1 3
I05 XK	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)			2/1 (3)	0/1/0/1/ 1 (3)			2/1 (3)	1/2/1/1/ 1 (6)		1 2
I06 XK	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)			2/1 (3)	0/2/0/1/ 1 (4)		1	3/2 (5)	4/4/1/3/ 1 (13)		2 2
I07 XK	0/0 (0)	0/1/0/1/ 0 (2)			1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)			2/2 (4)	0/2/0/1/ 1 (4)		1 0
I08 XK	0/0 (0)	0/1/0/1/ 0 (2)			1/1 (2)	0/2/0/2/ 1 (5)			3/2 (5)	4/4/1/3/ 1 (13)		2 2
I09 XK	0/0 (0)	0/0/0/0/ 0 (0)			1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)			2/1 (3)	0/3/0/1/ 1 (5)		1 1
I10 XK	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)			1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)			2/1 (3)	0/3/1/1/ 1 (6)		1 0
I11 XK	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)			1/1 (2)	0/2/0/1/ 1 (4)			2/1 (3)	1/4/1/3/ 1 (10)		1 6

II2	1/0	0/0/0/0/			1/1	0/2/0/1/			3/1	1/4/1/3/		1
XK	(1)	0 (0)	2	3	(2)	1 (4)	3	9	(4)	1 (10)	3	7

E – histopatologické parametry hojení povrchového epitelu: rozsah epitelizace/diferenciace (celkové skóre)

V – histopatologické skóre hojení vaziva: množství granulační tkáň/množství časného kolagenu/množství pozdního kolagenu/orientace kolagenních vláken/vzor kolagenních vláken (celkové skóre)

Z – histopatologické skóre zánětu

C – celkové histopatologické skóre hojení ran

Tab. B. Zvířata léčená hyperbarickou oxygenoterapií 1× denně.

ID	4. den (X v ID = 1)				7. den (X v ID = 2)				10. den (X v ID = 3)			
	E	V	Z	C	E	V	Z	C	E	V	Z	C
II0 1X T	0/0 (0)	0/0/0/0/ 0 (0)	1	1	2/1 (3)	0/2/0/1/ 1 (4)	2	9	2/2 (4)	0/3/0/3/ 1 (7)	4	5
II0 2X T	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	2	3	1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)	2	7	2/2 (4)	0/4/1/2/ 1 (8)	2	4
II0 3X T	1/1 (2)	0/1/0/1/ 0 (2)	1	5	1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)	2	7	3/1 (4)	1/4/1/2/ 1 (9)	2	5
II0 4X T	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	1	2	2/1 (3)	0/1/0/1/ 1 (3)	2	8	3/1 (4)	1/3/0/2/ 1 (7)	3	4
II0 5X T	<i>zvíře uhynulo před odběrem vzorků</i>											

II0 6X T	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	2	3	2/1 (3)	0/2/0/2/ 1 (5)	3	1 1	2/1 (3)	0/2/0/1/ 1 (4)	4	1 1
II0 7X T	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	2	3	1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)	3	8	2/2 (4)	0/2/0/2/ 1 (5)	3	1 2
II0 8X T	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)	2	5	2/1 (3)	0/2/0/1/ 1 (4)	3	1 0	2/1 (3)	0/3/1/1/ 1 (6)	1	1 0
II0 9X T	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	1	2	2/1 (3)	0/1/0/1/ 1 (3)	3	9	2/1 (3)	0/3/1/2/ 1 (7)	2	1 2
III 0X T	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)	1	4	1/0 (1)	0/2/0/1/ 1 (4)	3	8	2/2 (4)	1/2/0/2/ 1 (6)	3	1 3
III 1X T	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	1	2	2/1 (3)	0/2/0/1/ 1 (4)	2	9	2/2 (4)	0/2/0/1/ 1 (4)	3	1 1
III 2X T	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)	1	4	1/1 (2)	0/1/0/1/ 1 (3)	3	8	2/1 (3)	1/4/1/2/ 1 (9)	2	1 4

E – histopatologické parametry hojení povrchového epitelu: rozsah epitelizace/diferenciace (celkové skóre)

V – histopatologické skóre hojení vaziva: množství granulační tkáň/množství časného kolagenu/množství pozdního kolagenu/orientace kolagenních vláken/vzor kolagenních vláken (celkové skóre)

Z – histopatologické skóre zánětu

C – celkové histopatologické skóre hojení ran

Tab. C. Zvířata léčená hyperbarickou oxygenoterapií 2× denně.

ID	4. den (X v ID = 1)				7. den (X v ID = 2)				10. den (X v ID = 3)			
	E	V	Z	C	E	V	Z	C	E	V	Z	C
III0 1X F	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	1	2	1/1 (2)	0/1/0/1/1 (3)	2	7	2/1 (3)	0/2/0/1/ 1 (4)	3	0
III0 2X F	1/1 (2)	0/1/0/1/ 0 (2)	1	5	1/1 (2)	0/2/0/1/1 (4)	2	8	2/1 (3)	1/4/1/3/ 1 (10)	3	6
III0 3X F	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)	1	4	2/1 (3)	0/2/1/1/1 (5)	1	9	2/2 (4)	0/2/0/1/ 1 (4)	3	1
III0 4X F	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)	1	4	1/1 (2)	0/2/0/1/1 (4)	1	7	2/1 (3)	1/2/0/1/ 1 (5)	3	1
III0 5X F	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)	2	5	2/1 (3)	0/2/0/1/1 (4)	3	0	3/2 (5)	1/3/0/2/ 1 (7)	1	3
III0 6X F	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	1	2	2/1 (3)	0/3/0/1/1 (5)	2	0	2/2 (4)	1/3/1/1/ 1 (7)	4	5
III0 7X F	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)	1	4	1/1 (2)	0/1/0/1/1 (3)	2	7	2/1 (3)	2/4/1/2/ 1 (10)	3	6
III0 8X F	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	2	3	1/1 (2)	0/2/0/2/1 (5)	2	9	2/1 (3)	0/3/0/1/ 1 (5)	3	1

III0 9X F	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	2	3	1/1 (2)	0/1/0/1/1 (3)	2	7	3/1 (4)	1/4/2/2/ 1 (10)	3	7	1
III1 0X F	1/0 (1)	0/1/0/1/ 0 (2)	1	4	1/1 (2)	1/3/1/1/1 (7)	2	1 1	2/2 (4)	0/3/1/2/ 1 (7)	3	4	1
III1 1X F	1/0 (1)	0/0/0/0/ 0 (0)	2	3	1/1 (2)	0/1/0/1/1 (3)	2	7	2/1 (3)	0/2/0/2/ 1 (5)	3	1	1
III1 2X F	0/0 (0)	0/1/0/1/ 0 (2)	2	4	1/1 (2)	0/1/0/1/1 (3)	3	8	3/2 (5)	2/4/2/3/ 1 (12)	4	1	2

E – histopatologické parametry hojení povrchového epitelu: rozsah epitelizace/diferenciace (celkové skóre)

V – histopatologické skóre hojení vaziva: množství granulační tkáň/množství časného kolagenu/množství pozdního kolagenu/orientace kolagenních vláken/vzor kolagenních vláken (celkové skóre)

Z – histopatologické skóre zánětu

C – celkové histopatologické skóre hojení ran