

UNIVERZITA KARLOVA

Fakulta tělesné výchovy a sportu

**Metodologická studie šetření změn
mechanických vlastností kolagenních tkání u
pes equinvarus congenitus**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Ing. František Lopot, Ph.D.

Vypracoval:

Bc. Gustav Červený

Praha, duben 2017

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis:

Evidenční list

Souhlasím se zapůjčením své diplomové práce ke studijním účelům. Uživatel svým podpisem stvrzuje, že tuto diplomovou práci použil ke studiu a prohlašuje, že ji uvede mezi použitými prameny.

Jméno a příjmení:

Fakulta / katedra:

Datum vypůjčení:

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval Ing. Františkovi Lopotovi Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady, nápady a inspirativní přístup při řešení náhlých situací. Dále bych rád poděkoval Ing. Mgr. Danielovi Hadrabovi za obsluhu technického vybavení během experimentu a za metodologické i teoretické připomínky.

Abstrakt

Cílem práce bylo vytvoření a provedení testovacího protokolu pro simultánní detekci mechanických a strukturálních charakteristik vazivové tkáně u PEC. Na základě rešeršních úkolů bylo předpokládáno, že vazivová tkáň se bude na mediální a laterální straně nohy dětí postižených touto deformitou navzájem v těchto doménách lišit. Vzhledem k nízké dostupnosti vzorků, bylo důležité navrhnout a popsat případné úpravy použitého testovacího protokolu pro minimalizaci neúspěšných pokusů měření. Pro experiment tak byl použit jeden vzorek z mediální a jeden vzorek z laterální strany nohy u PEC. Každý ze vzorků byl dále rozdělen na dva. Popsaná a diskutovaná metodika má umožnit čtenáři vhléd do úskalí tohoto šetření.

Pro zjištění použitelnosti metody byly navrženy a otestovány stanovené hypotézy. Vlastní experiment se skládal z kombinace jednoosé tahové zkoušky na speciálním mikro-testeru a mikroskopického šetření pomocí SHG.

Výsledkem experimentu bylo zjištění, že očekávané strukturální rozdíly u vzorků v nenataženém stavu nejsou patrné. Rozdílnost mezi vzorky se projevuje především v nataženém stavu. Nicméně nebyl identifikován trend těchto odlišností. Výsledky jednoosé tahové zkoušky poukazují na vyšší tuhost a vyšší křehkost tkáně na mediální straně nohy.

Pro zjištění případného trendu rozdílných strukturálních charakteristik tkání je do budoucna potřeba stanovit konkrétní parametry obrazové analýzy, otestovat vyšší počet vzorků a statisticky vyhodnotit výsledky. Obrazovou analýzu pak korelovat s výsledky mechanické jednoosé tahové zkoušky. Druhou variantou šetření se jeví upřednostnění dat mechanické zkoušky na úkor snížení množství dat SHG mikroskopie.

Klíčová slova: *Pes equinovarus congenitus*, mechanické vlastnosti, tahová zkouška, mikroskopie, extracelulární hmota, kolagen, napětí-deformace

Abstract

The goal of this thesis was to invent and perform a testing protocol, which can detect connective tissue mechanical and structural properties simultaneously in patients with clubfoot. Based on literature findings, it was presumed that connective tissue differ between medial and lateral side of foot. Because of low availability of specimen, it was important to draw and mention crucial alterations of testing protocol, for minimization of failed measurements. For reasons above, two specimens divided into two samples was used for experiment. Described and discussed methodics may enable of reader to insight to drawbacks of this examination.

For usability of this protocol, a setting and testing of few hypotheses was performed. One axis tensile testing with SHG microscopy examination was used in combination for experiment.

One of the main result was finding, that structural differences which were expected, were not distinctive in samples in untensioned state. But, distinctive differences may be drawn in tensioned samples. This differences for low number of specimen, cannot show any tendency. Results of tensile testing showed, that samples from medial side of foot can have higher toughness and higher fragility.

For future acquisition of tendencies in specimen differences, it is important to set particular structural parameters for measure, test higher number of specimen and compare by statistical methods. Then compare tensile testing results with image measurements. As second variant of examination can be to prioritize of tensile testing data, at the expense of lower number of SHG data.

Key words: Pes equinovarus congenitus, mechanical properties, tensile test, microscopy, extracellular matrix, collagen, stress-strain

Obsah

1	Úvod.....	12
2	Cíle.....	14
3	Teoretická východiska	15
3.1	Pojivová tkáň	15
3.1.1	Rozlišení šlachy a vazy ve struktuře, složení a v biomechanických vlastnostech	15
3.2	Šlacha, její anatomie a vývoj	17
3.2.1	Identifikace mikro a makro struktur šlachy.....	22
3.2.2	Biomechanické vlastnosti šlachy, jejich testování a identifikace.....	23
3.3	Reologické minimum	26
3.4	Fibroproliferativní onemocnění pojivové tkáně	33
3.5	Pes equinovarus congenitus.....	33
3.5.1	Etiologie a incidence	36
3.5.2	Terapeutická intervence	37
3.5.3	Buněčné změny vazivové tkáně	40
3.5.4	Mezibuněčné změny vazivové tkáně.....	40
3.5.5	Biomechanické změny vazivové tkáně	42
4	Hypotézy	43
5	Experiment.....	44
5.1	Cíle experimentu.....	44
5.2	Testované objekty.....	44
5.3	Mechanická jednoosá tahová zkouška.....	45
5.4	Mikroskopické šetření pomocí buzení druhé harmonické (SHG).....	48
5.5	Předexperiment a návrh experimentálního protokolu	50
5.6	Postup měření a experimentální protokol	54
6	Zpracování dat	56

6.1	Snímky.....	56
6.2	Tahové zkoušky.....	57
7	Výsledky.....	71
7.1	Porovnání vzorků odlišné anatomické lokalizace u PEC na SHG snímcích.....	71
7.1.1	Klidový stav.....	71
7.1.2	Reakce na tah.....	76
7.1.3	Vybrané snímky pro účely diskuze.....	84
7.2	Porovnání vzorků z dat tahové zkoušky.....	87
8	Diskuze.....	89
9	Závěr.....	97
	Seznam literatury.....	98
	Seznam příloh.....	106
	Příloha č. 1: Seznam obrázků.....	107
	Příloha č. 2: Seznam grafů.....	110
	Příloha č. 3: Seznam tabulek.....	111
	Příloha č 4: Souhlas etické komise.....	112
	Příloha č 5: Informovaný souhlas.....	113

1 Úvod

Pes equinovarus congenitus (PEC) je vrozená deformita nohy, jejíž incidence je například ve Velké Británii u každého tisícího nově narozeného. Výskyt bývá jednostranný či oboustranný, a její klinický obraz se v jednotlivých případech liší poměrným zastoupením komponent deformity. Základní charakteristické komponenty jsou equinozita v hlezenním kloubu, varozita paty, inverze nohy, exkavace a addukce přednoží. Na (obr. 1) lze vidět snímek novorozence s PEC. Dominujícím jevem u PEC je přítomnost kontraktur vazivové tkáně na postero-mediální straně nohy (včetně šlach), změny tvaru a pozice kostí. Ačkoliv není jasné, která z patoanatomických změn je primární, existují propracované terapeutické systémy usilující o maximální redukci deformity. Někdy se léčba obejde bez chirurgického zásahu, avšak často je operace nezbytná. Menší chirurgické zásahy mohou být využity jako doplněk konzervativní léčby. V některých případech je však potřeba přistoupit k rozsáhlejším operačním výkonům. Zvolený postup závisí na individuálním posouzení stavu postiženého jedince ošetřujícím lékařem.



Obrázek 1: *Pes equinovarus congenitus*. Zdroj: Cooke a další, 2008

Do dnes není jasné, jaký mechanismus stojí za tvorbou vlastní kontraktury vazivové tkáně. Výzkum v této oblasti však probíhá. Na základě teorie o aktivní kontrakci tkáně byly v historii vzorky měkkých tkání u PEC podrobeny analýzám na prokázání přítomnosti cytokontraktilních proteinů a přítomnosti tzv. myofibroblastů. Tento výzkum byl také prováděn u ještě nezralých lidských plodů, jelikož deformita je přítomna už i v tomto období lidského vývoje (obr. 2)



Obrázek 2: Pes equinovarus congenitus přítomný u lidského plodu. Zdroj: Fukuhara a další, 1994

V dnešní době se hledají cesty a spoušťové mechanismy, které by mohly způsobovat nadměrné ukládání mezibuněčné hmoty v místě projevu onemocnění. PEC je často přirovnáván k Dupuytrenově kontraktuře jako zástupci benigního fibroproliferativního onemocnění. Fibroproliferativní onemocnění jsou charakterizována mimo nadměrné ukládání mezibuněčné hmoty také především její remodelací a změnou biomechanických vlastností tkáně. Na rozdíl od Dupuytrenovy kontraktury (DK), mechanické vlastnosti vazivových tkání u PEC zmapovány nejsou. Brát mechanické chování kontrahovaných provazců u DK jako vzor přímo nelze, jelikož na rozdíl od mikroskopických nálezů u PEC, je vláknitá struktura provazců organizována do jednoho směru. Zároveň se v odborné literatuře setkáváme s náznaky, že měkké tkáně na různých stranách nohy u PEC mají rozdílné složení. Na základě klinických zkušeností s kontrakturami na posteromediální straně nohy u PEC, byly tkáně v historii nejednou analyzovány z mediální a laterální strany nohy zároveň. Většina studií však prováděla výzkum jen na vnitřní straně nohy.

Předmětem zájmu této práce budou právě strukturální a mechanické charakteristiky vazivových tkání u PEC.

2 Cíle

Cílem práce je získat informace o základní terapeutické problematice onemocnění v klinické sféře, blíže zmapovat studie zabývající se charakterem změn vazivových tkání u PEC a navrhnout a provést vlastní experiment jako vstup do připravované rozsáhlé studie, která bude hledat rozdíly postižené vazivové tkáně od zdravé a jejich příčiny.

Cíle bude dosaženo splněním následujících dílčích úkolů:

1. Nastudovat a shromáždit informace o obecné struktuře šlachy jako zástupci vazivové tkáně. Popsat experimentální metody určování jejich mechanických vlastností a strukturálního uspořádání.
2. Provést rešerši dostupných informačních zdrojů o charakteristikách změn u fibroproliferativních onemocnění pojivové tkáně reprezentovaných jejich kontrakturou, vznikem deformity a omezením funkce dané lokality.
3. Navrhnout a provést vlastní experiment za účelem stanovení protokolu měření s využitím SHG mikroskopie a testeru mechanických vlastností vzorků.
4. Interpretovat výsledky vlastní experimentální práce a dát je do souvislostí s výstupy předchozích rešeršních úkolů.

3 Teoretická východiska

3.1 Pojivová tkáň

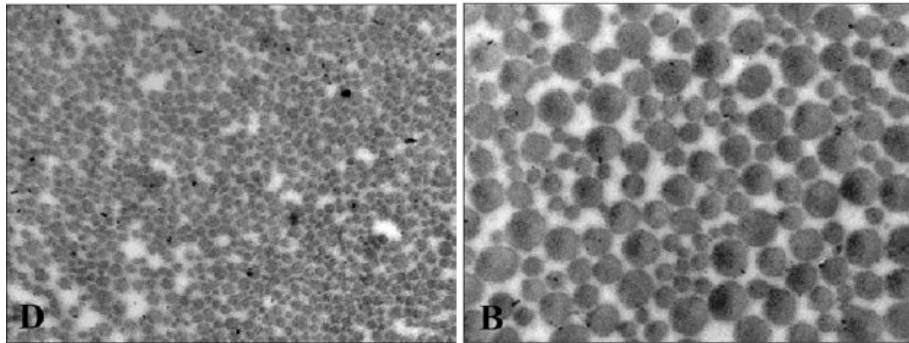
Pojivové tkáně se také nazývají jako podpůrné a jsou jimi vazivo, chrupavka a kost. Složky pojivové tkáně jsou mezibuněčná hmota a buňky. Mezibuněčná hmota (MH) se dělí na složku amorfni a vláknitou. Amorfní složka je tvořena bílkovino-polysacharidovým komplexem a složka vláknitá vlákny (fibrilami) převážně bílkovinné povahy. Vlákna se rozdělují na retikulární, kolagenní a elastická. Vazivo se rozděluje na mezenchymální, rosolovité, retikulární, elastické, kolagenní řídké (fibrilární), kolagenní tuhé uspořádané a kolagenní tuhé neuspořádané. Rozdělení je dáno podle zastoupení druhu buněk a vláken, a podle poměru buněčné složky a mezibuněčné hmoty. Tuhé kolagenní vazivo je charakterizováno převažujícím množstvím mezibuněčné hmoty nad složkou buněčnou. Mezibuněčná hmota tohoto druhu vaziva je složena převážně z tlustých kolagenních vláken a z vláken elastických. Neuspořádané kolagenní vazivo obsahuje vlákna plst'ovitě propletená, zatímco uspořádané kolagenní vazivo obsahuje vlákna orientovaná v určitém směru. Tento směr je determinován směrem mechanického zatěžování. Zástupcem neuspořádaného vaziva je škára kůže a zástupci uspořádaného vaziva jsou vazy (ligamenta), svalové povázky (fascie) a vazivové vrstvy okostnice (periostu). Šlachy (tendo) jsou pak speciálním druhem tuhého uspořádaného kolagenního vaziva (Čihák, 2016). V přímé souvislosti s tématem práce je další text zaměřen na problematiku šlach a vazů.

3.1.1 Rozlišení šlachy a vazy ve struktuře, složení a v biomechanických vlastnostech

Z hlediska struktury a různorodosti složení představují šlachy a vazy velmi stabilní a poměrně jednoduché materiály, které však s ohledem na jejich funkce v rámci pohybového aparátu člověka mají značně odlišné vlastnosti. Následující text přináší souhrn zásadních rozdílů mezi šlachou a vazem z řady důležitých hledisek. Detailní vysvětlení zde uvedených pojmů a konkrétní popis struktury kolagenní tkáně je uveden v kapitole 3.2.

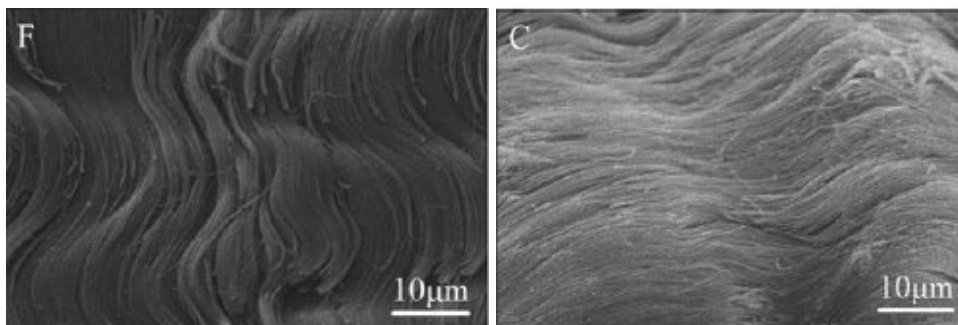
Vaz a šlacha se liší v převažující šířce fibril (obr. 1A, B), v procentuálním zastoupení fibril v celkovém průřezu tkáně a v obsahu kolagenu a proteoglykanů. Ve šlachách probíhají fibrily více těsně s menším množstvím okolní amorfni hmoty než u vazů. Zároveň šlachy obsahují

vyšší množství kolagenu. Obsah proteoglykanů je ve šlachách naopak nižší. Ve vazech převládají spíše fibrily s menším šířkovým průměrem (Rumian a další, 2007).



Obrázek 3 Porovnání šířky fibril v příčném řezu vazivové tkáně člověka. Zobrazení pomocí TEM. A) vlevo: přední zkřížený vaz. B) vpravo: šlacha ze zadní skupiny stehenních svalů. Zdroj: Zhu a další, 2012

Zvlnění povrchu tkáně se také liší. Povrch vazy je zvlněn výrazněji a ve více rovinách, zatímco šlacha má vlny méně výrazné a v jedné rovině (obr. 2A, B) (Zhu a další, 2012).

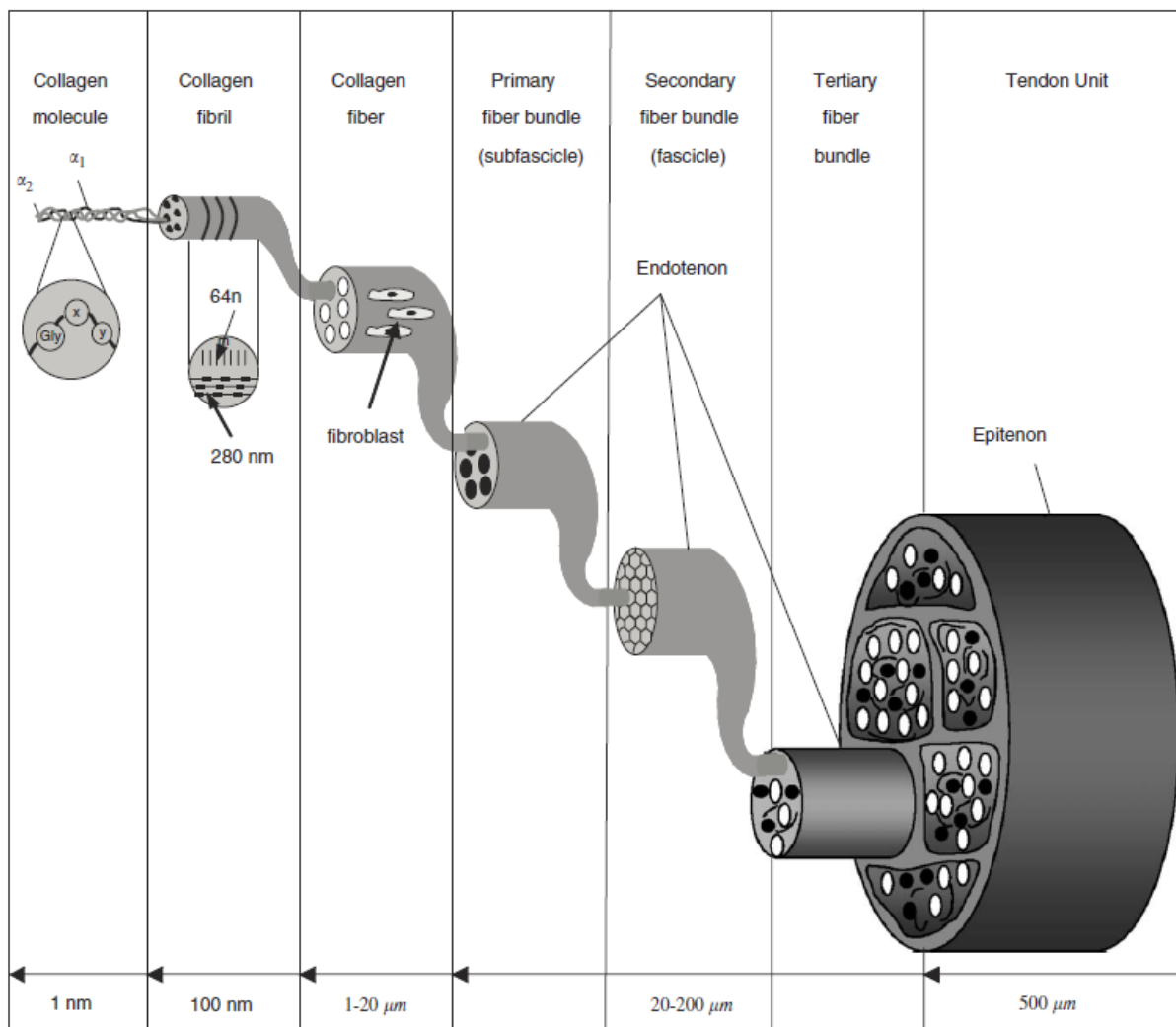


Obrázek 4 Porovnání zvlnění povrchu vazivové tkáně člověka. Zobrazení pomocí SEM. A) vlevo: přední zkřížený vaz. B) vpravo: šlacha ze zadní skupiny stehenních svalů. Zdroj: Zhu a další, 2012

Rozdíl lze nalézt také v biomechanických vlastnostech. Vazy vykazují během relaxačních testů odlišné chování než šlachy. S rostoucím napětím rychlost relaxace napětí klesá (Duenwald a další, 2009). Podle Birch a další (2013) se biomechanické vlastnosti vazů podobají šlachám, které jsou schopny uchovat více energie (energii uchovávající šlachy). Toto chování je charakterizováno schopností vyššího prodloužení a následné akumulace elastické energie. Ovšem mez pevnosti se může lišit. Vazy na rozdíl od těchto šlach nemusejí snášet cyklickou zátěž ve vysoké deformaci, proto je jejich mez pevnosti nižší. Ačkoliv mohou být vazy vystaveny poměrně vysoké deformaci, jejich schopnost uchovávat elastickou energii je oproti šlachám nižší.

3.2 Šlacha, její anatomie a vývoj

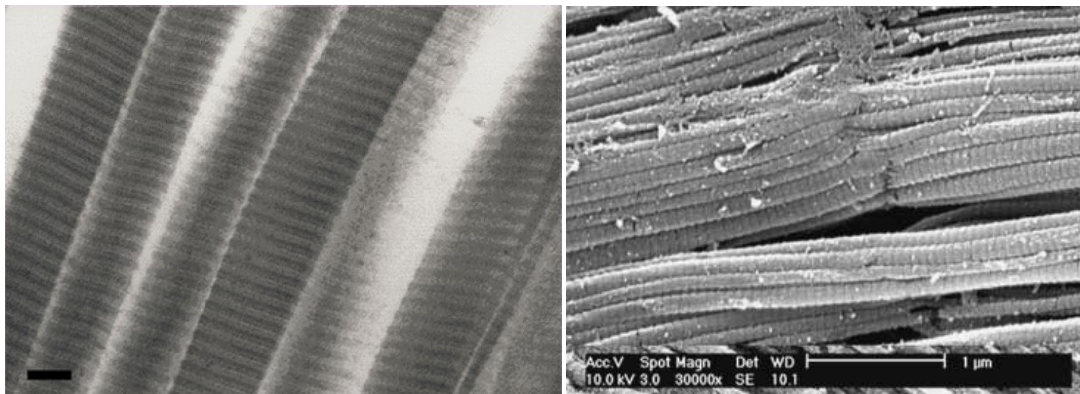
Šlachy spojují svými konci kosti a svaly. Pomocí tohoto spojení je umožněn přenos svalové síly na kost, jehož důsledkem je pohyb v kloubu (Kannus, 2000). Kromě přenosu sil mezi kostí a svalem je další funkcí šlachy skladování a uvolňování elastické energie. Šlacha je vystavována především tahovému zatížení. V některých případech i tlakovému, zejména pokud šlacha probíhá kolem kostěných výčnělků (Valenta a Konvičková, 1997). Rozhraní mezi šlachou a svalem se nazývá svalově-šlachová junkce a inserce šlachy na kost potom enthesis (Benjamin a další, 2002). Povrch šlachy je tvořen řídkou vazivovou tkání nazývanou epiteton. Vnitřní struktura šlachy je zformována ze třech úrovní svazků kolagenních vláken organizovaných převážně v podélné ose šlachy. Z tzv. terciálních, sekundárních a primárních svazků (obr. 5). Na nejnižší úrovni se nachází samotné kolagenní vlákno. Vlákná svazků a svazky mezi sebou, jsou k sobě na všech úrovních vázána řídkým vazivem endotenonem (Wang, 2006; Kannus, 2000). V endotenonu probíhají krevní cévy, lymfatické cévy a nervy, které zásobují šlachu (Franchi a další 2007; Wang, 2006). Jednotlivé svazečky šlachy nejsou mezi sebou pevně spojeny a mohou vůči sobě klouzat. Skluz je umocněn pomocí mazacího filmu tvořeného tkáňovou kapalinou (Valenta a Konvičková, 1997). Morfologie šlachy se v různých oblastech liší, v místech tlakové části šlachy jsou kolagenní vlákna organizována do sítě (Valenta a Konvičková, 1997).



Obrázek 5 Schéma hierarchické organizace šlachy. Zdroj: Wang, 2006

Pod úrovní kolagenních vláken se rozlišují kolagenní fibrily tvořené kolagenními mikrofibrilami. Mikrofibrily jsou agregovány z molekul kolagenu. Fibrila jako taková, je považována za základní tahu odolávající jednotku šlachy (obr. 6A). Orientace kolagenních fibril v malém procentu nekoresponduje s podélnou osou šlachy, čímž šlacha získává mechanickou odolnost vůči působení sil i v jiných směrech (Kannus, 2000). Mezi kolagenními fibrilami se ještě popisují molekulární spojení tzv. „cross-links“, které zvyšují tuhost a usnadňují přenos sil v celé struktuře (Connizzo a další, 2013; Wang, 2006). Fibrily vykazují periodické žíhání (Gutsmann, 2003). Toto žíhání se opakuje každých 64 nm (Wang, 2006), nebo 67 nm (Gutsmann, 2003) Franchi a další (2007) popisují, že tato vzdálenost závisí na formě kolagenu fibrily. Není jisté, zda fibrila tvoří jeden kontinuální svazek kolagenu prostupující celou délkou šlachy, nebo zda jsou pospojovány (Connizzo a další, 2013). Na toto téma se lze v literatuře setkat s údaji o délce fibril v řádech milimetrů (Herod a další, 2016),

nicméně výsledky prý nejsou konzistentní (Holmes a další, 2001). Tloušťka (průměr) fibril je proměnlivá od jednotek či popisovaných dvou desítek nanometrů, až po 500nm (Franchi a další, 2007; Wang, 2006; Holmes a další, 2001). Fibrily se na vrcholu vln šlachy (viz dále) ohýbají či krouťí ve stejné rovině. V tomto místě se utváří malý uzel a některé fibrily ztrácejí svou charakteristickou periodicitu. Při natažení šlachy se tyto záhyby oplošťují a i při úplném natažení fibril jsou uzly stále patrné (obr. 6B) (Franchi a další, 2007 (2)).



Obrázek 6 A) vlevo: Detail kolagenní fibrily s typickou periodicitou každých 64nm. Zobrazení pomocí TEM. Zdroj: Franchi a další, 2007. B) vpravo: Stále patrné fibrilární uzly při natažení myší šlachy. Zobrazení pomocí SEM. Zdroj: Franchi a další, 2007 (2)

Šlacha je po svém povrchu zvlněna (obr. 4B) (Franchi a další, 2007). Předpokládá se, že na formování vlnitého vzoru šlachy má vliv aktivní buněčná kontrakce fibroblastů (Hershenmann a další, 2011; Franchi a další, 2007), biomechanické vlastnosti MH šlachy (Hershenmann a další, 2011), nebo střížné síly způsobené buňkami mezi vrstvami fibril (Franchi a další, 2007). Pokud je šlacha natažena (in vitro) o 0-1 %, klesne počet vln a povrch se opticky vyhladí. Po ukončení zátěže se vlnitý vzor znovu objeví. To však neplatí v situaci, pokud byla šlacha natažena nad 3-4% své délky. Tato deformace se však ve fyziologickém kloubním rozsahu pohybu nevyskytuje (Legerlotz a další, 2014; Franchi a další, 2007). Ve znovustvoření vln po zátěži tzv. „recoil“ hrají významnou roli elastická vlákna (Wang, 2006). U vlny lze popsat její výšku, délku základny, úhel a frekvenci vln. Tyto parametry jsou velice proměnlivé a jejich hodnoty odpovídají způsobu zatěžování šlachy, anatomickému umístění, historii zátěže a věku jedince (Legerlotz a další, 2014; Birch, 2013; Hershenmann a další, 2011). Podle Birch a další (2013) vychází zvlnění šlachy z fibrilární úrovně.

Buněčná složka šlachy je zastoupena z 90-95 % fibroblasty, zbytková procenta připadají na chondrocyty, buňky cév a synoviální buňky. Za patologických situací mohou být přítomny i makrofágy a myofibroblasty (Giusti a Pepe, 2016). Chondrocyty se nalézají zejména

v místech vyšší mechanické zátěže a synoviální buňky ve šlachových pochvách (Giusti a Pepe, 2016; Franchi a další, 2007).

Fibroblasty jsou odpovědné za syntézu složek MH. Buňky, které již přestaly secerovat složky MH se nazývají fibrocyty (Čihák, 2016). Fibroblasty secerované látky jsou bílkovinné povahy jako kolageny, proteoglykany, glykoproteiny, „cross-linky“ utvářející bílkoviny, enzymy nebo proteázy (Babaei a další, 2016). Syntéza kolagenních bílkovin je pak stěžejní při utváření vlastní kolagenní struktury (Kannus, 2000).

Fibroblasty mohou mít vřetenovitý, oválný (Franchi a další, 2007) či hvězdicovitý (Čihák, 2016) tvar. Délka buněk se pohybuje od 20 do 70 μm , šířka od 7 do 20 μm . Fibrocyt má rozměry větší, průměr buňky pak činí 80-300 μm . Oba vývojové stupně buněk mají na povrchu cytoplasmatické výběžky zanořené do MH. Fibrocyty mají výběžky tenčí a delší než fibroblasty (Franchi a další, 2007, Kannus, 2000). Tvar buňky je spjat s mechanickou zátěží šlachy přinesenou k buňce přes MH, přičemž na druhou stranu je MH zase ovlivněna změnou tvaru buňky pomocí aktivní buněčné kontrakce (Hershenhann a další, 2011; Franchi a další, 2007).

Celková hmotnost šlachy je tvořena z 65-75% vodou, zbytková hmotnost připadá na pevnou složku (Benjamin a Ralphs, 1997). Suchý podíl šlachy je ze 70-80% tvořen kolagenními proteiny tvořícími kolagenní strukturu, z 2% elastickými vlákny, zbytek připadá na nekolagenní proteiny (Wang, 2006) a glykosaminglykany (Connizzo a další, 2013; Kannus, 2000). Ve šlaše je kolagen zastoupen z 95% kolagenem typu I. Zbylých 5% připadá na kolagen typu III a V. Ostatní typy kolagenu II, VI, IX, X, a XI jsou ve šlachách zastoupeny ve stopových množstvích (Wang, 2006) a jejich role je spojována s fibrilogenezí během růstu a hojení šlachy (Connizzo a další, 2013). Elastická vlákna jsou tvořena elastinem. Nekolagenními proteiny ve šlachách jsou glykoproteiny a proteoglykany (Giusti a Pepe, 2016; Wang, 2006).

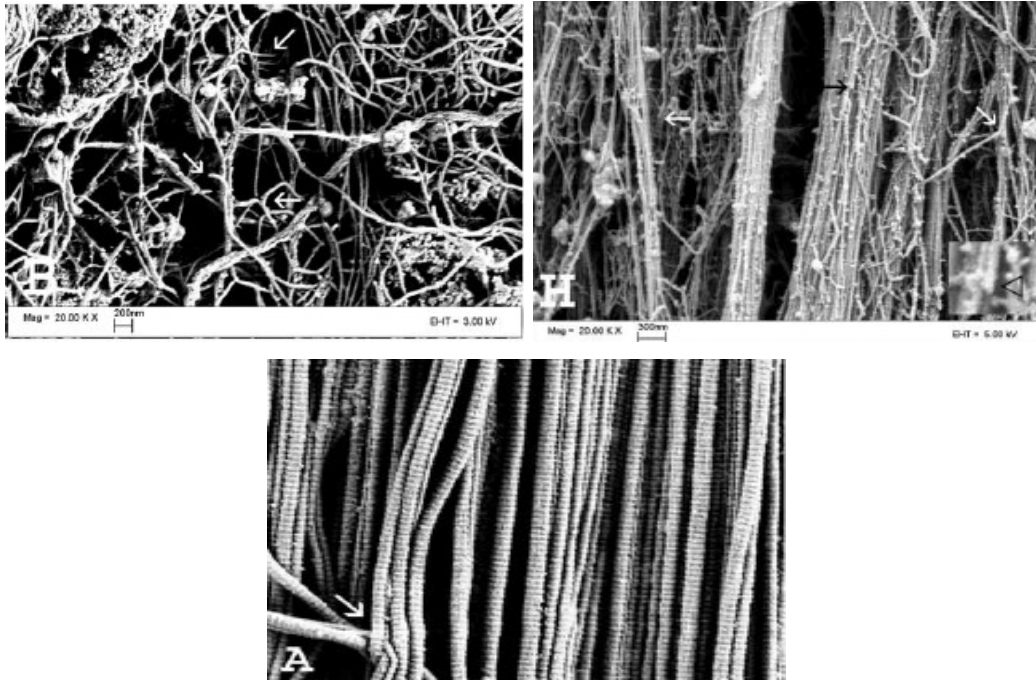
Proteoglykany mají vztah k mechanickým vlastnostem šlachy (Franchi a další 2007; Wang, 2006) a jsou spojovány s fibrilogenezí (Halper, 2014; Connizzo a další, 2013; Franchi a další 2007). Proteoglykany spojují fibrily mezi sebou a usnadňují jejich skluz (Franchi a další 2007), jejich zástupci mohou být například decorin, biglykan, fibromodulin, lumican a versican (Halper, 2014). Proteoglykany jsou díky řetězci glykosaminglykanů schopny přitahovat a vázat molekuly vody (Connizzo a další, 2013). Hladina proteoglykanů je vyšší v oblastech vyšší mechanické zátěže a schopnost vázat vodu ovlivňuje její mechanické vlastnosti (Franchi a další 2007; Wang, 2006). Nicméně existují studie, které přímý vztah proteoglykanů a mechanických

vlastností nepotvrzují (Connizzo a další, 2013). O glykoproteinech jako je fibronectin se uvažuje ve vztahu ke stabilitě ostatních složek MH (Wang, 2006).

Šlachy se začínají vyvíjet v 6-8 týdnu intrauterinního vývoje ze zárodečného mezenchymu spolu s končetinovými svaly, na jejichž vývoji jsou závislé. Šlachy horních končetin spolu se šlachami flexorových svalů se vyvíjejí rychleji než šlachy dolních končetin a šlachy extenzorových svalů. V této době již šlachy obsahují kolagen typu I a III, proteoglykany a fibroblasty. Kolagenní fibrily jsou 10 – 30 nm tlusté a šlacha obsahuje vysoké množství buněk na jeden mm³ (až 200 000 buněk). V průběhu postnatálního vývoje množství fibroblastů klesá. Během prvních 5 let věku klesá na 100 000 na jeden mm³. V období od 15 do 20 let věku je počet buněk v jednom mm³ přibližně 50 000. Tloušťka kolagenních fibril se také mění, od zárodečných 40 nm a méně po 500-600 nm v průřezu u starších šlach (Dahners, 2005).

Změnami procházejí i samotné buňky. Z fibroblastů se stávají fibrocyty, cytoplasmatické výběžky buněk se prodlužují a vytvářejí hustou síť proplétající kolagenní vlákna mezibuněčné hmoty. Zároveň klesá množství buněčných organel zodpovědných za syntézu bílkovin (Dahners, 2005; Kannus 2000). Charakterově se buňky stávají delšími a štíhlejšími (Giusti a Pepe 2016; Dahners, 2005), s těmito změnami korespondují i tvarové změny buněčných organel. Zároveň se podélné osy buněk a jejich organel organizují do směru podélné osy šlachy (Russo a další, 2015).

Vývojem prochází i charakter vlastní kolagenní struktury. Během raného fetálního vývoje nejsou fibrily šlach směrově organizované jako u dospělých (obr. 7A-C), v elektronovém mikroskopu lze spatřit obnažené konce fibril. Vlákna tvoří charakteristické svazky a jsou mezi sebou propletena. Propletení přetrvává i do pozdějšího fetálního vývoje, kde již začíná být přítomen charakteristický vlnovitý vzhled mikrostruktury šlachy, avšak zatím s nízkou periodicitou vln (Provenzano a Vanderby, 2006). Zvlnění povrchu šlachy s věkem nelineárně roste. Od určité věkové hranice pak dochází k redukci zvlnění, jak bylo například demonstrováno na ocasní šlaše myši (Legerlotz a další, 2014). Poměr krycího vaziva je u zárodečných šlach vyšší než vlastní pevností složka vaziva (Russo a další, 2015).



Obrázek 7: Organizace mikrostruktury šlachy během vývoje. Zobrazení pomocí SEM. A) vlevo nahoře: raný fetální vývoj šlachy ovce. B) vpravo nahoře: pozdější fetální vývoj šlachy u myši. C) dole: Dospělá myšičí šlacha. Zdroj: Provenzano a Vanderby, 2006

3.2.1 Identifikace mikro a makro struktur šlachy

Pro zkoumání struktury šlachy se napříč studii využívá různých zobrazovacích technik. Často jsou její jednotlivé úrovně popisovány pomocí elektronové mikroskopie. Používanými typy elektronové mikroskopie pro tyto účely je skenovací elektronová mikroskopie (SEM) (Herod a další, 2016; Tang a další, 2014; Zhu a další, 2012; Herchenhann a další, 2011; Franchi a další, 2007 (2); Provenzano a Vanderby, 2006) a transmisní elektronová mikroskopie (TEM) (Magnusson a další, 2002; Holmes a další, 2001).

Při popisu fibril byla použita jak SEM (Tang a další, 2014; Franchi a další, 2007 (2)), tak i TEM. Zobrazení fibril při TEM byla například prováděna ve zvětšení 40,000x - 45,000x (Zhu a další, 2012; Rumian a další, 2007). Pro pozorování úrovně přechodu fibril a ultrastruktury zvlnění povrchu pomocí SEM, bylo použito zvětšení do 20,000x (Herod a další, 2016; Provenzano a Vanderby, 2006) a pro přehledné sledování zvlnění povrchu šlachy pomocí SEM bylo použito zvětšení 1000x - 5000x (Zhu a další, 2012). Podle (Provenzano a Vanderby, 2006) je vhodné použít pro zobrazení organizace kolagenních vláken zvětšení 100-500x a pro zobrazení organizace kolagenních fibril 10,000-50,000x, nejlépe však do 20,000x.

Lépe dostupnou metodou sledování povrchu šlachy je polarizační světelná mikroskopie často doplněna o barvení vzorku, použitá například při sledování obsahu složek šlach flexorů kolenního kloubu ve zvětšení 40x – 400x (Zhu a další, 2012).

Další mikroskopickou metodou je mikroskopie s buzením druhé harmonické (SHG, second harmonic generation). Tato metoda poskytuje snímky s vysokou ostrostí a kontrastem (Lau a další, 2012). Své využití SHG nalézá při pozorování organizace kolagenní struktury na supramolekulární úrovni. Organizaci struktury lze kvantifikovat, a je možné využít některé parametry snímku jako je orientace, rozestup a tloušťka vláken kolagenní struktury. Tento druh mikroskopie lze aplikovat na tkáně schopných emitovat SHG signál. Těmi jsou především tkáně bílkovinné povahy jako je například myosin v aktino-myosinovém komplexu a tkáně na bázi kolagenu I. a II. typu (Chen a další, 2012).

SHG byla například použita při určení orientace kolagenních vláken prasečí rohovky, chrupavky průdušnice a ucha (Rao a další, 2009), pro určení orientace kolagenních vláken zdravých a poraněných šlach koní (Sivaguru a další, 2010), orientace kolagenních vláken prasečí skléry (Lau a další, 2012), pozorování zvlnění kolagenních svazků ocasové šlachy myši (Legerlotz a další, 2014) či šlachy prasat (Tang a další, 2014), nebo při pozorování organizace kolagenních fibril ve šlaše prasat a gelu obsahujícím kolagen (Tang a další, 2014).

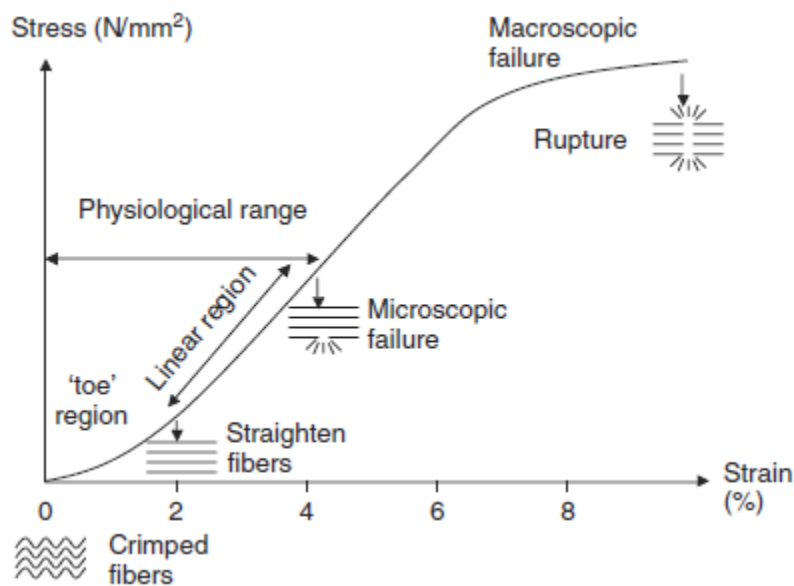
Nejběžněji používané metody pro analýzu získaného obrazu jsou založeny na konvolučních produktech jádra obrazu. Tyto metody často používají gradient intenzity obrazu (Courtney a další, 2006; Karlon a další, 1998), fraktály (Thomason a další, 1996), Houghovu (Bayan a další, 2009), Fourierovu (Sivaguru a další, 2010), Gaborovu (Osman a další, 2013) a Waveletovu transformaci (Castellano a další, 2004), nebo jejich kombinace (Frisch a další, 2012).

3.2.2 Biomechanické vlastnosti šlachy, jejich testování a identifikace

Jak již bylo zmíněno v úvodu minulé kapitoly, šlacha je vystavována především tahovému zatížení a v některých případech i tlakovému. Pevnost šlachy v tahu je přibližně čtyřnásobně vyšší, než je maximální izometrický tah příslušného svalu. Mechanické vlastnosti tkáně závisejí především na uspořádání kolagenní struktury a složení tkáně (Valenta a Konvičková, 1997). Šlachy vykazují anisotropní, nelineární chování a vykazují viskoelastické vlastnosti jako je relaxace napětí, hystereze, tečení (creep) a závislost mechanických vlastností na rychlosti zatížení. Za viskózní složkou stojí zejména hydratace šlachy, a za složkou elastickou stojí mechanické vlastnosti struktury a kolagenu (Connizzo a další, 2013).

Mechanické vlastnosti šlach bývají hojně testovány pomocí jednoosých tahových zkoušek (Gatt a další, 2015; Legerlotz a další, 2014; Duenwald a další, 2009). Při provádění jednoosé tahové zkoušky lze sledovat závislost napětí a deformace (Valenta a Konvičková, 1997; Gatt a další, 2015; Legerlotz a další, 2014; Duenwald a další, 2009), napětí a času (Duenwald a další, 2009) a deformace a času (Wren a další, 2003).

Na křivce závislosti napětí a deformace (obr. 8) během testování šlachy v její podélné ose se popisují tři regiony: úpatí („toe region“), lineární oblast, oblast tvorby mikrotrhlin a oblast přetížení. Úpatí je oblastí narůstající deformace šlachy s mírným nárůstem napětí. Tato oblast odpovídá redukci zvlnění povrchu šlachy tím, že se mění orientace kolagenních vláken do podélného směru zatížení. Po narovnání se začnou kolagenní vlákna natahovat, a zde začíná lineární oblast. Za tímto regionem již dohází k trhlinám jednotlivých kolagenních vláken (oblast tvorby mikrotrhlin) a při pokračujícím zvyšování zátěže dojde k celkovému selhání struktury (oblast přetížení). Po překročení konečné hranice lineární oblasti zůstávají po odlehčení reziduální deformace (Legerlotz a další, 2014; Valenta a Konvičková, 1997). Parametrem ovlivňujícím hladinu napětí během deformace je rychlost růstu deformace. Se vzrůstající rychlostí deformace roste odpor tkáně (Svensson a další, 2012; Duenwald a další, 2009).



Obrázek 8 Závislost napětí a deformace šlachy. Ilustrace chování kolagenních vláken. Zdroj: Wang, 2006

Fyziologický rozsah deformace šlachy (aby u ní nedocházelo ke vzniku a rozvoji poškození) se pohybuje kolem 4%. Tento rozsah deformace překrývá lineární region napnutých kolagenních vláken, ve kterém se uplatňují právě jejich viskoelastické vlastnosti (Wang, 2006). Pro srovnání, limitní hodnoty vazů na této hladině se nacházejí o řád výš (Birch a další, 2013).

Vyhodnocení závislosti napětí a času se používá pro sledování fenoménu relaxace. Pokles napětí za jednotku času při vystavení šlachy určité hladině deformace se nazývá relaxací napětí. U šlach rychlost poklesu napětí roste se vzrůstající hladinou udržovaného napětí (Duenwald a další, 2009). Tzv. creep, je fenomén zjišťovaný z křivky závislosti deformace a času. Zkoumaný vzorek je vystaven určité hladině napětí a odečítají se hodnoty deformace v blíže specifikovaném čase (Wren a další, 2003).

Po ukončení napěťového zatížení lze sledovat hysterezi (Valenta a Konvičková, 1997) a zotavení (Duenwald a další, 2009). Zotavení je rapidně pomalejší proces než relaxace. Jedná se o schopnost šlachy obnovit hladinu napětí při nižší deformaci na původní hodnoty po odeznění deformace vyšší. Předchozí zátěž může být například vystavení šlachy 6% deformaci po dobu 100 sekund. Po této deformaci následuje její pokles na 2% na blíže specifikovanou dobu. Při této udržované hladině deformace se pak odečítají hodnoty napětí v čase. Tento jev má svůj význam při testech cyklické zátěže (Duenwald a další, 2009). Hystereze (viz kap. 3.3) odpovídá ztrátám elastické energie při návratu tkáně z deformovaného stavu do původního stavu (Connizzo a další, 2013). Hystereze je reprezentována plochou mezi křivkou napětí-deformace během zatížení a odtížení (obr. 12). Plocha vzniklé hysterezní smyčky se u šlach pohybuje od 2,5 % do 20%. Šlachy jsou pomocí nízké hystereze schopny uložit a uvolnit elastickou deformační energii. Během zátěže in vivo tak dohází k minimálním ztrátám energie (Valenta a Konvičková, 1997). Podle elastických vlastností se lze setkat s rozdělením šlach na poziční a energii uchovávající šlachy (Herod a další, 2016).

Šlachy vykazují anizotropické vlastnosti. Jak se mění směr zatížení vzhledem ke směru vláken šlachy, mění se i křivka závislosti napětí a deformace (Böl a další, 2015). Stejně tak se liší změny objemu šlachy během tahových jednoosých zkoušek z různých směrů vzhledem ke směru vláken. Tyto změny mohou být vyjádřeny pomocí Poisonova čísla (Gatt a další, 2015).

Vlastnosti šlachy na různých úrovních její hierarchie jsou odlišné. Byl nalezen rozdíl v délce úpatí fibrily a šlachy (Svensson a další, 2012). Modul pružnosti (v lineární části) směrem k menším strukturám roste. Celá šlacha má hodnoty přibližně 700 MPa, kolagenní snopeček přibližně 1000 MPa a kolagenní vlákno přibližně 5100 MPa (Valenta a Konvičková, 1997).

Při testování vzorku sledujeme deformaci a sílu, kterou daný vzorek tkáně klade. Pro zjištění napětí však potřebujeme znát průřez vzorku, který je zjišťován před vlastním měřením. Biomechanická šetření často předchází tzv. prekondice vzorku dle speciálního protokolu (Duenwald a další, 2009). Během prekondice dochází ke změnám mechanických vlastností vzorku, za kterými nejvíce stojí změna organizace struktury (Connizzo a další, 2013).

3.3 Reologické minimum

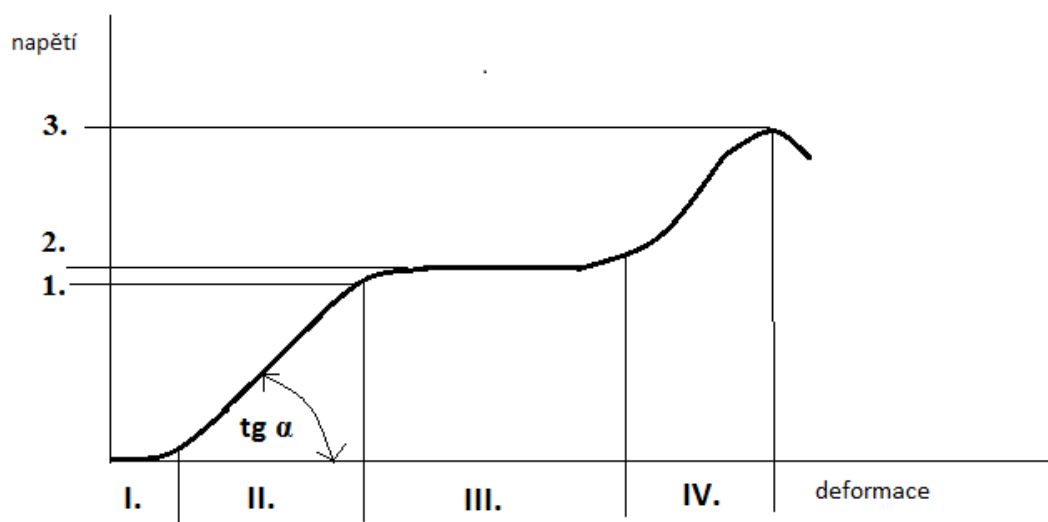
Teoretický obsah dále uvedených podkladů je syntézou vědomostí získaných na přednáškách z biomechaniky, která je součástí navazujícího magisterského studia fyzioterapie na FTVS UK.

Biologické tkáně jako je organizované kolagenní vazivo, vykazují elastické a viskózní charakteristiky. Hovoří se tedy o viskoelastických tkáních.

Elasticita (pružnost) je schopnost tělesa navrátit se do původního tvaru po odeznění vnější zátěže. Elasticita je definována Youngovým modulem pružnosti, vyvozeného z Hookova zákona:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (1)$$

kdy σ je napětí vzorku, ε je relativní prodloužení a E je tzv. Youngův modul pružnosti. Napětí a relativní prodloužení jsou osami pracovního diagramu (obr. 9) jednoosého zatížení tělesa tahem. V tomto diagramu se rozlišuje několik oblastí (viz dále), kde E platí pouze pro oblast II (tedy oblast elastické deformace s lineárním průběhem závislosti napětí na relativním prodloužení).



Obrázek 9 Pracovní diagram tahové zkoušky. I. Úpatí, nebo také oblast bez odezvy napětí, II. Lineární oblast, III. Oblast plastické deformace 1. Mez úměrnosti, 2. Mez kluzu, 3. Mez pevnosti Zdroj: vlastní

Na křivce napětí je možné identifikovat řadu významných bodů, kdy pro účely základního popisu sledovaného průběhu jsou zde uvedeny následující:

1. Mez úměrnosti (bod 1): Do této meze platí Hookův zákon vztažený k elastické deformaci.
2. Mezi kluzu (bod 2): Od tohoto bodu dále se začíná uplatňovat plastická deformace (viz dále) charakterizována růstem deformace bez nárůstu napětí (tato oblast nemusí být přítomna).
3. Mez pevnosti (bod 3): Mez pevnosti definuje nejvyšší hodnotu napětí, kterou je těleso schopno přenést. Po mezi pevnosti následuje makroskopické strukturální rozrušení vzorku. Diagram lze srovnat s pracovním diagramem tahové zkoušky šlachy (obr. 8, kapitola 3.2.2) rozděleným na úpatí, lineární oblast, oblast tvorby mikrotrhlin a oblast přetížení.

Hodnota E je v lineární oblasti křivky konstantní, jelikož napětí a deformace rostou lineárně (přímá úměra). Toto však neplatí pro oblast před a za lineární oblastí. Při testování tělesa sledujeme, zda se lineární oblast přiklání více podél osy napětí či podél osy deformace. Z úhlu sklonu lineární části křivky lze E také identifikovat a to pomocí vzorce:

$$E = \tan \alpha \quad (2)$$

Výsledné absolutní hodnoty, nebo porovnání křivek různých vzorků nás informuje, zda je těleso více či méně protažitelné, respektive více či méně **tuhé**. Youngův modul popisuje čistě mechanické vlastnosti materiálu a nezávisí na rozměrech vzorku. Tuhost je veličinou každého pružného tělesa definovanou vzorcem:

$$k = \frac{F}{\Delta l} \quad (3)$$

Při měření mechanických vlastností na „trhačce“ (testeru) měříme jen sílu a délku vzorku, z čehož získáme křivku závislosti síly a délky, která nás informuje o tuhosti tělesa k . Tvar této křivky je totožný s tvarem křivky závislosti napětí a deformace (relativní prodloužení). Tuhost tak může být také vyjádřena s využitím Youngova modulu pružnosti vzorcem:

$$k = \frac{E \times A}{l_0} \quad (4)$$

spojením s předešlým vzorcem získáme rovnici

$$\frac{F}{\Delta l} = \frac{E \times A}{l_0} \quad (5)$$

Ze vzorce je patrné, že pro výpočet E nestačí měřit pouze sílu a délku. Jak vyplývá ze vzorce pro výpočet napětí σ , je nutno zjistit plochu průřezu vzorku A .

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (6)$$

V návaznosti na to, zda je detekovaná okamžitá síla vztažena k příslušnému okamžitému průřezu, či k průřezu nedeformovaného vzorku, je definováno buď okamžité skutečné napětí, nebo napětí smluvní (v anglosaské literatuře často tzv. engineering stress). V praxi je velmi výhodné pracovat právě se smluvními hodnotami, protože se jedná o hodnoty s jasným vztahem k vlastnostem zkoumaného materiálu bez ohledu na jeho geometrii.

Podobně podílem původní délky tělesa l_0 a prodloužením tělesa Δl během zatížení dostaneme hodnotu relativního prodloužení ε . Pokud známe σ a ε , můžeme dosadit do vzorce Hookova zákona:

$$\sigma = E \times \varepsilon \quad (5)$$

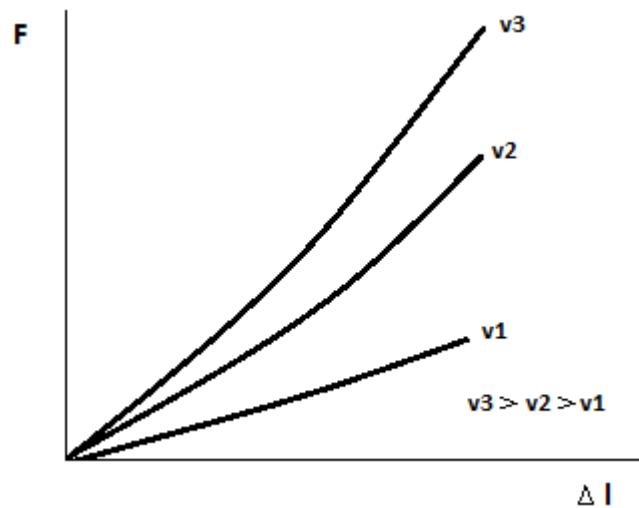
po úpravě

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (6)$$

a po rozepsání dostáváme kompletní vzorec pro výpočet Youngova modulu pružnosti se všemi veličinami

$$E = \frac{F}{\frac{\Delta l}{l_0}} \quad (7)$$

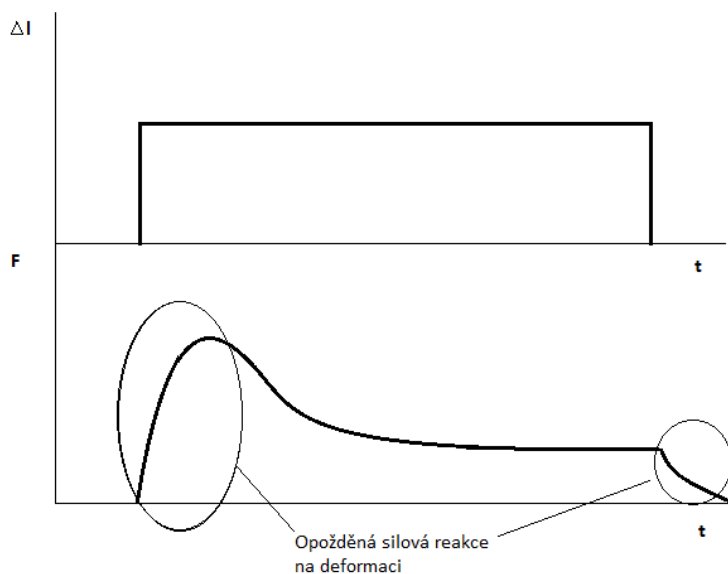
Viskózní složka je definována součinitelem dynamické, resp. kinematické vazkosti. Důsledkem viskózní složky biologické tkáně je především závislost mechanického chování tělesa na rychlosti zatížení. S tímto faktorem je třeba počítat při mechanickém testování. Do měřených veličin se touto cestou dostává časové hledisko. Pro posouzení míry viskozity se kvůli své názornosti často využívá definice tzv. relaxačního času, který udává dobu, za kterou se odehraje pokles sledované veličiny z počáteční hodnoty na stanovenou mez (typicky např. 50% počáteční hodnoty). Takto definovaný kvantifikátor lze poměrně snadno identifikovat u creepových a relaxačních testů. Zásadním efektem je růst napětí či silové odezvy s růstem rychlosti zatížení, které se navenek projevuje jako nárůst tuhosti a v tomto ohledu lze hovořit o zpevnění sledované tkáně (obr. 10).



Obrázek 10 Pracovní diagramy tělesa ve třech různých rychlostech (v) zatížení. Zdroj: vlastní

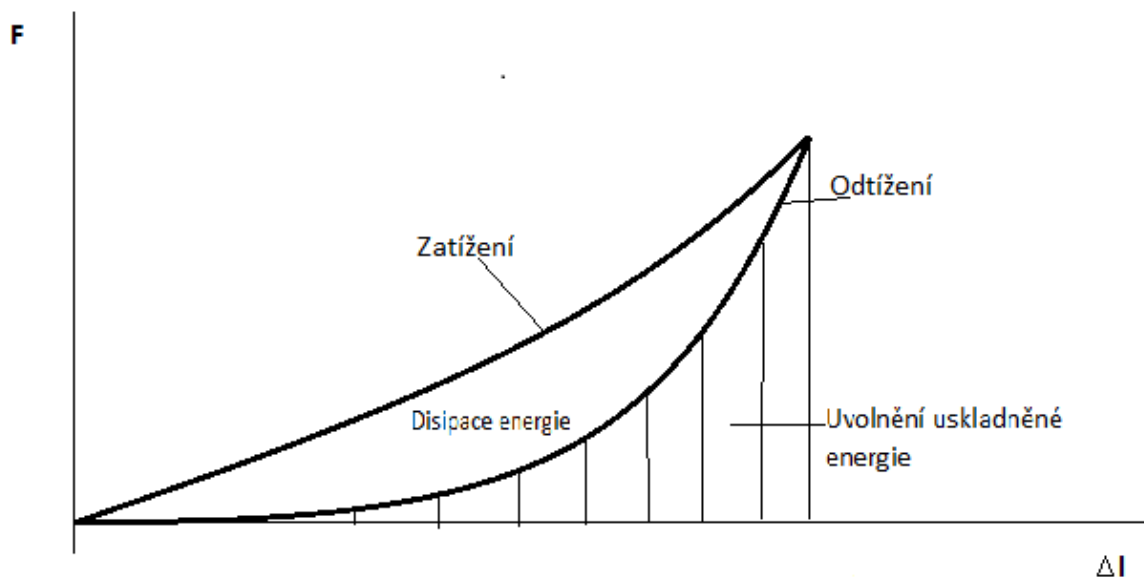
Viskózní a elastickou složku lze v modelech tkání kombinovat principiálně řazením za sebou = sériově, nebo vedle sebe = paralelně. Pro popis elastických tkání se hodí paralelní kombinace, tedy tzv. Kelvinův model a jeho deriváty.

Zatížení lze z pohledu jeho původu možné rozdělit na kinematické a dynamické. Pokud je původcem zatížení deformační účinek, pak se hovoří o kinematickém zatížení, pokud je jím účinek silový, jedná se o zatížení dynamické. Obr. 11 ukazuje odezvu Kelvinova tělesa (dolní graf) na kinematické zatížení (horní graf). Střední část grafu odpovídá tzv. relaxaci síly. Z charakteru tohoto průběhu lze pak identifikovat základní materiálové vlastnosti zkoumané tkáně – tedy viskózní a elastickou složku.



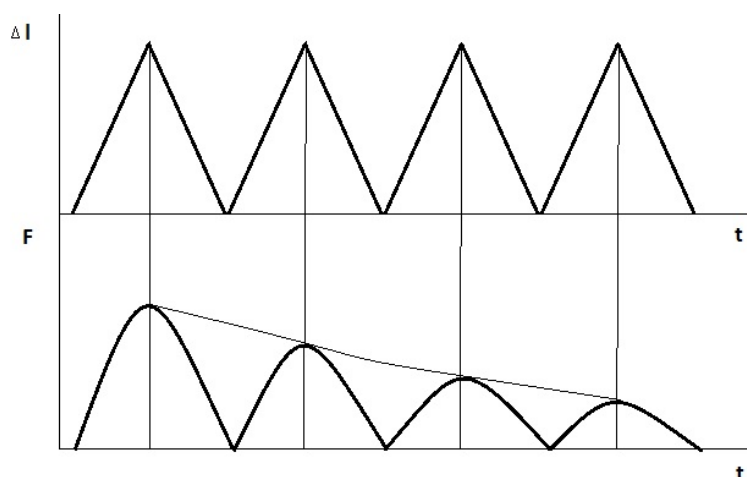
Obrázek 11 Náhlá deformace a odlehčení konstantní velikosti (nahore) a silová odezva tělesa v čase. Zdroj: vlastní

Z přímého porovnání průběhu zatížení, které má skokový charakter s průběhem odezvy lze s využitím definice relaxačního času identifikovat jisté „zpoždění“ reakce. Tento fenomén má svůj značný význam mimo jiné u cyklického testování tělesa, při kterém dochází ke střídání zatížení a odtížení. Na pracovním diagramu pak nemají vzestupná a sestupná křivka totožný průběh, ačkoliv se v závěru vrátí do stejného výchozího bodu. Křivky na diagramu vytvoří ohraničenou oblast (smyčku), jejíž plocha vyjadřuje ztrátu energie vloženou do vytvoření deformace. Jedná se o tzv. hysterezní smyčku (obr. 12). Oblast pod spodní křivkou je úměrná energii, která se navrátila vlivem vlastní elasticity zkoumaného materiálu. energii vypočteme dle výpočtu pro práci $\mathbf{W}=\mathbf{F}\times\mathbf{s}$ pro vzestupnou a sestupnou část smyčky zvlášť, kdy s je dráha, v našem případě Δl .

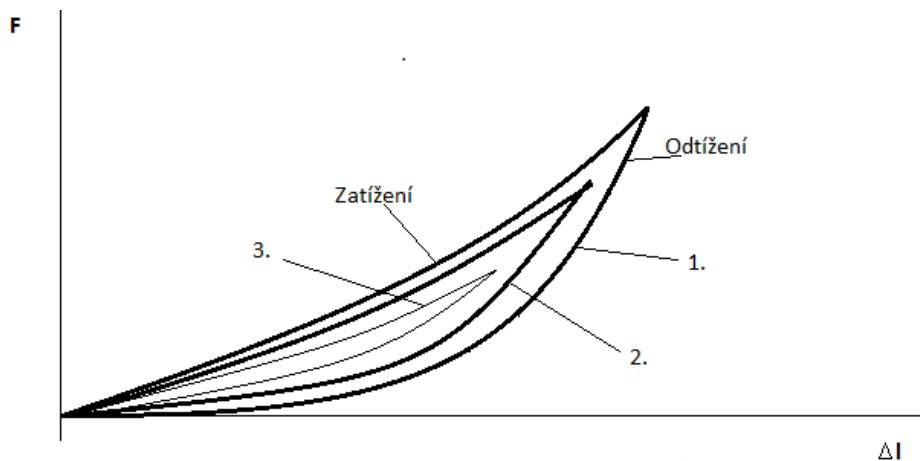


Obrázek 12 Hysterezní křivka. Zdroj: vlastní

Při cyklickém zatěžování je podstatným faktorem rychlost zatížení a frekvence opakování zátěžného cyklu. Typickým průběhem odezvy na opakovaně kinematicky vnášené zatížení je pozvolný pokles reakční síly (obr. 13). Tento efekt se projeví, je-li frekvence opakování zátěžného cyklu dostatečně nízká, aby tkáň „stíhala“ relaxovat. Pokud přes sebe zakreslíme hysterezní smyčky každého cyklu, bude se jejich plocha zmenšovat (obr. 14) – jinými slovy disipace energie bude klesat. A protože za disipací energie je s odkazem na výše uvedené zodpovědná viskózní složka, bude klesat její význam.



Obrázek 13 Cyklická deformace konstantní velikosti a rychlosti (nahore) a snižující se silová odpověď tělesa v čase. Zdroj: vlastní



Obrázek 14 Vliv viskozity na hysterezní křivky tří po sobě jdoucích cyklů zátěže v rámci plně elastického regionu.
Zdroj: vlastní

Jiný případ nastává v situaci, kdy je frekvence opakování zátěžných cyklů vysoká a tkáň „nestíhá“ relaxovat. V tomto případě dochází k pozvolnému načítání (sumaci) odezvy. Toho efektu se v pozitivním světle využívá v terapii, kdy se aplikuje opakovaná zátěž např. za účelem obnovení rozsahu pohybu. Uvedený jev však může mít i negativní dopad, protože vlivem sumace může odezva dosáhnout limitních hodnot a způsobit tak poškození zatěžované tkáně (např. vyčerpání chrupavky při běhu apod.).

Je nutné zmínit, že se vzrůstající deformací vzorku se mění jeho průřez. Tento fenomén velmi úzce souvisí se stlačitelností zkoumaného materiálu a do modelu a popisu jeho odezvy na zatížení je zaváděn prostřednictvím tzv. Poissonova čísla:

$$\mu = -\frac{\varepsilon_y}{\varepsilon_x}, \quad (8)$$

kde ε_y představuje poměrnou deformaci v podélném směru (= ve směru působícího zatížení) a ε_x je deformace příčná (v rovině kolmé na směr působícího zatížení). Poissonovo číslo μ je zjevně bezrozměrné a pro většinu materiálů nabývá hodnot od 0 do 0,5 v souvislosti s jejich stlačitelností. Při dodržení znaménkové konvence, je Poissonovo číslo pro většinu materiálů, u kterých při protažení dochází k zúžení příčného průřezu, kladné.

Uvedená teorie platí především pro homogenní materiály, tedy materiály s rovnoměrnou distribucí jednoho typu hmoty v objemu. Pokud není zkoumaný materiál homogenní, závisí mechanické vlastnosti nejen na složení, ale i na organizaci jeho struktury. Výše uvedená teorie pak postihuje vždy úzkou oblast v okolí zkoumaného zátěžného bodu.

Mimo materiálové vlastnosti definované elastickou či viskózní složkou, závisí mechanická odpověď tělesa na jeho rozměrech. Pokud je těleso vystaveno jednoosému zatížení, tak distribuce vnitřního napětí tělesa závisí na poměru jeho šířky a délky. Čím delší je podélně namáhané těleso, tím je vnitřní napětí více organizováno v podélném směru a vytváří tak obraz homogenního vektorového pole, pro které platí výše uvedené vztahy. U případů, kdy jsou šířka vzorku s jeho délkou srovnatelné, je třeba počítat se složitějším obrazem napjatosti a tedy s významně vyšší chybou výpočtů při využití výše uvedených vztahů.

3.4 Fibroproliferativní onemocnění pojivové tkáně

Fibroproliferativní onemocnění lze rozdělit na maligní a benigní formy. Mezi maligní formy se řadí idiopatická plicní fibróza či jaterní cirhóza. Tato kategorie je charakterizována akumulací mezenchymálních buněk a jejich produkty v různých anatomických oblastech. Tento proces může následně narušit chod životně důležitých funkcí. Mezi benigní formy lze zařadit hypertrofické jizvy, keloidy a Duputrenovu kontrakturu (DK). Jejich typickou vlastností je nadměrné ukládání MH, které vede ke kontraktuře tkáně a poruše funkce postižené oblasti (Huang a Ogawa, 2012).

Obraz poruchy se podobá hojení rány, avšak během hojení rány existují „stop-mechanismy“, které nakonec růst jizevnaté tkáně zastaví. U fibroproliferativních onemocnění se zdá, že tyto mechanismy nefungují. Ačkoliv není známa podstata mechanismů podílejících se na progresy onemocnění, předpokládá se, že se nebude jednat o jeden stěžejní mechanismus (Murray, 2016).

3.5 Pes equinovarus congenitus

Pes equinovarus congenitus je vrozená deformita nohy složená z pěti základních komponent. Jednotlivé komponenty jsou u každého jedince variabilního poměru. Jsou jimi equinozita v hlezenním kloubu, varozita paty, inverze, exkavace a addukce přednoží (Ošťádal, 2015 (2)). Vlastní deformitu utvářejí především změny pojiva, respektive vaziva a kostí. Typické jsou kontraktury pouzder a vazů na posteromediální straně hlezenních kloubů. U kostí se popisují změny tvaru, velikosti a postavení (Foster a Davis, 2007; Ippolito, 1995).

Deformita je hrubě rozlišována na rigidní PEC se značnou fibrózou, a méně rigidní PEC, který je snadněji korigovatelný (Ošťádal, 2015 (2)).

Při popisu celkového obrazu bývá noha a bérce postižené dolní končetiny menší (Moon a další, 2014; Duce a další, 2013; Merrill a další, 2011; Ippolito 1995). Největší snížení objemu připadá na svalovou tkáň a to až o 45 % ve srovnání se zdravou končetinou u jednostranného PEC. Objem kostní tkáňe bývá snížen v průměru o 8,5 %. Naopak zastoupení tukové tkáňe bývá zvýšeno, toto zvýšení pak kompenzuje objemové ztráty. Výsledný rozdíl v objemu může být tedy kolem 1,5 % (Duce a další, 2013). Změny v objemu tkáňových souborů bývají výraznější u nekorigovatelných deformit (Moon a další, 2014). Hypotrofie svalstva se považuje za plnohodnotnou vrozenou komponentu PEC (Ippolito, 2009).

V hrubých změnách kostí dochází k deformitě přední části os calcaneus (dále jen calcaneus) ležící pod os talus (dále jen talus), což způsobí varózní a equinozní postavení paty (Foster a Davis, 2007), zároveň je calcaneus ohnutý mediálně (Ippolito, 1995). Krček talu je kopulovitě zakřiven a rotován krčkem mediálně a plantárně flektován. Tělo talu a artikulační plošky pro talocalcaneární kloub jsou zmenšeny (Ippolito, 1995). Naopak Hosking a Scott, (1982) popisují krček talu jako zevně rotovaný. Os navicularis (dále jen naviculární kost) je vystrčena mediálně (Foster a Davis, 2007). Tvar naviculární kosti bývá klínovitý. Tarzální kůstky jako celek bývají menší. Se změnami poměrů mezi kostmi vznikají patologická nastavení kloubů. Zadní plocha těla talu, kde již není kloubní chrupavka, se stává artikulující ploškou pro talocrurální kloub. Kostí bérce mohou také artikulovat pouze se zadní porcí trochlei tali a přední plocha trochlei je pak kryta nataženým kloubním pouzdem hlezenního kloubu. Talus a naviculární kost spolu artikulují přes mediální část hlavy talu. Stejná situace je i u calcaneocuboideálního kloubu, kdy os cuboideum artikuluje pouze z mediální porcí předního výběžku calcanea. Subtalární skloubení je vpředu rozevřené a vzadu naopak uzavřené (Ippolito, 1995).

Pro hrubé změny měkkých tkání jsou typické, jak již bylo zmíněno výše, kontraktury pouzder a vazů na posteromediální straně hlezenních kloubů. Anatomické struktury měkkých tkání bývají hypertrofické, často se přemostují nadbytečnou vazivovou tkání a pak formují celé tkáňové komplexy. Ze známých anatomických struktur se lze setkat se změnami jako s tlustčí syndesmosis tibiofibularis, hypertrofickou Achillovou šlachou, tlustčím lig. calcaneonaviculare (Ippolito 1995). Šlachy svalů zadní hluboké skupiny bérce bývají přesunuty mediálně (Foster a Davis, 2007).

Změny na kostěných a měkkých strukturách se vyskytují zároveň ve vzájemné souvislosti. Equinózní složkou deformity udržuje především zkrácená Achillova šlacha (Ippolito, 1995). Omezení dorzální flexe v hlezenním kloubu je dále zapříčiněno jak zkrácením m. tibialis posterior tak i dorzálním posunem fibuly způsobeným zkráceným lig. calcanofibulare. Tím je znemožněn everzní pohyb calcanea potřebným pro dorziflexi nohy. Zkrácení m. tibialis posterior navíc způsobuje addukci a supinaci nohy (Scott a další, 1984; Hosking a Scott, 1982). Addukční postavení je dále přisuzováno zkrácenému lig. deltoideum, lig. calcaneonaviculare, lig. talonaviculare. K inverznímu postavení nohy přispívají i mediálněji uložené úpony extenzorů prstů (Cooke a další, 2008) a mediálněji uložený úpon m. tibialis anterior (Ippolito, 1995).

Mimo změny objemu svalové tkáně (viz výše) se popisují i změny její kvality. Literatura se však různí. Byly nalezeny disproporce ve svalových vláknech mm. peronei (Loren a další, 1998), větší množství vaziva na úkor svalových vláken (Ippolito, 1995), disproporce ve svalových vláknech a změnách svalových buněk, avšak bez zvýšení vaziva u posteromediální a laterální skupiny svalů bérce (Issaack a další, 1977). Dále degenerace svalových vláken mm. gastrocnemii (Ioanescu a další, 1974). Naopak jiní autoři známky svalových abnormalit vyvracejí (Herceg a další, 2006; Gray a Katz, 1981).

Dalšími anatomickými nálezy jsou změny ve vaskularizaci oblasti nohy (Foster a Davis, 2007). Byla nalezena insuficientní a. tibialis anterior (Sodre a další, 1990) a zmenšení až absence a. dorsalis pedis (Merril a další, 2010; Hootnick a další, 1982).

Stupeň závažnosti PEC se hodnotí podle speciálních klasifikačních systémů. Známými klasifikačními systémy jsou klasifikace dle Dimeglia z roku 1991 nebo dle Piraniho. Výsledkem hodnocení je zařazení deformity určité třídy reprezentující závažnost onemocnění. Klasifikace dle Dimeglia je založena na měření úhlů deformity pomocí goniometru a měření možné korekce deformity. Hodnotí se tyto čtyři složky deformity: equinózní deviace v sagitální rovině, varózní deviace ve frontální rovině, derotace calcaneopedálního bloku v horizontální rovině a relativní addukce přednoží v horizontální rovině. Mimo to se hodnotí další tzv. nepříznivé příznaky jako přítomnost zadní rýhy, mediální rýhy, kavózní deformity a hypotrofie lýtkového svalstva. Ty se hodnotí a bodují na subjektivním úsudku vyšetřujícího (Ošťádal, 2015 (2)). Výstupní kategorie jsou čtyři:

1. Benigní forma (Soft-soft)
2. Mírná deformita (Soft-stiff)
3. Závažná deformita (Stiff-soft)
4. Velmi závažná deformita (Stiff–stiff, nebo také Stiff foot) (Ošťádal, 2015 (2); Nordin, 2002).

Klasifikace dle Piraniho hodnotí deset parametrů: zakřivení laterálního okraje nohy, závažnost mediální rýhy, závažnost zadní rýhy, interval mediální kotník- os naviculare, palpce laterálního okraje talu, interval fibula-Achillova šlacha, rigidita equinózní složky při extenzi kolena, rigidita addukční složky a kontraktura dlouhých flexorů prstů (Ošťádal, 2015 (2); Cooke a další 2008).

3.5.1 Etiologie a incidence

Ve Velké Británii je popisován výskyt onemocnění u 1 na 1000 narozených. V 50% je výskyt bilaterální. Chlapci jsou postiženi více a to v poměru 3:1. Incidence se liší i u etnických skupin. Novo Zélandská původní populace má incidenci vyšší a to v poměru 7 na 1000 narozených (Foster a Davis, 2007).

V historii bylo zvažováno a stále se uvažuje nad množstvím teorií vzniku onemocnění. Byly jimi porucha vaskularizace talu, faktory zevního prostředí, nitroděložní poškození, genetické faktory, abnormální svalové úpony či mechanická teorie vzniku deformity in utero, neuromuskulární onemocnění, dystrofická onemocnění, primární porucha vývoje kostí (Ošťádal, 2015 (2)). Jelikož primární etiologie zatím nebyla zjištěna, považuje se vznik onemocnění za multifaktoriální (Ošťádal, 2015 (2); Gibbons a Gray, 2013; Foster a Davis, 2007; Nordin a další, 2002).

Za jeden z etiologických faktorů se považuje genetické zatížení. Pravděpodobnost vzniku PEC u novorozenců je 17x vyšší pokud měli PEC jejich rodiče. Pokud PEC trpěli prarodiče, riziko je potom 6x vyšší oproti normální populaci. Pokud bylo první dítě postižené PEC, je vysoká pravděpodobnost, že i druhé dítě bude postiženo také. Zvýšená pravděpodobnost deformity je u potomků postižených žen (Foster a Davis, 2007). Předpokládá se, že za přítomnost vady nemůže pouze jeden gen, ale že se jedná o polygenetický etiologický faktor (Gibbons a Gray, 2013).

Za rizikový faktor se považuje kouření v těhotenství, zejména v kombinaci s genetickou zátěží. PEC je ve 20 % součástí jiných syndromů jako například myotonická dystrofie, myelomeningokéla (Gibbons a Gray, 2013; Dobbs a Gurnett, 2012), Downův syndrom, Larsonův syndrom či arthrogrypóza (Foster a Davis, 2007).

Mechanismus kontraktur nebyl zatím uspokojivě vysvětlen. Na jejich vzniku mohou hrát určitou roli remodelační procesy MH (Ošťádal, 2015 (2)). Kontrakturu vazivové tkáně je třeba

odlišit od svalové kontraktury. Kontraktura vazivové tkáně je permanentní, nízkoenergetický, tkáň zkracující proces, který ovlivňuje buňky a ve kterém dominuje remodelace MH (Tomasek a další, 2002). Při remodelaci vazivové tkáně hrají velkou roli fibroblasty, konkrétně jejich syntetická aktivita a schopnost buněčné kontrakce. Během remodelačního procesu vyvinou fibroblasty tah na přilehlou MH a ostatní fibroblasty. Zároveň dochází k sekreci bílkovin, kolagenu, proteoglykanů, glykoproteinů, proteáz, „cross-linky“ utvářejících bílkovin a enzymů do MH. Výsledkem je nově organizovaná vazivová tkáň (Babaei a další, 2016).

Vazivová tkáň u PEC byla zkoumána v několika studiích (Ošťádal a další, 2015(1); Poon a další, 2009; Zhao a další, 2005; Khan a další, 2001; Sluis a Pruys 1999; Sano a další, 1998; Fukuhara a další, 1994). Autoři nemálo studií se snažili o srovnání možných rozdílů ve struktuře, složení, přítomnosti buněk ve vazivové tkáni, nebo rozdílů ve struktuře svalů na mediální a laterální straně nohy či bérce PEC (Ošťádal a další, 2015 (1); Poon a další, 2009; Herceg a další, 2006; Khan a další, 2001; Zimny a další, 1985; Gray a Katz, 1981; Issaack a další, 1977). Výsledky některých autorů stranový rozdíl s převahou změn na mediální straně naznačují (Ošťádal a další, 2015 (1)) či potvrzují (Poon a další, 2009; Zimny a další, 1985; Issaack a další, 1977). Nicméně při popisu základních topických charakteristik onemocnění jiní autoři nezůstávají jen na medio-posteriorní straně nohy. Například změna v objemu tkání bérce a nohy jako celku (Moon a další, 2014; Duce a další, 2013; Merrill a další, 2011; Ippolito 1995), nebo hrubé anatomické nálezy na laterální straně bérce (Scott a další, 1984; Hosking a Scott, 1981), nebo abnormální struktura peroneálních svalů (Loren a další, 1998).

3.5.2 Terapeutická intervence

Pro terapeutickou léčbu je obtížné stanovit standartní schéma léčby a to z důvodu nehomogenní patoanatomické situace a nejednotnou klasifikaci postižení (Nordin a další, 2002).

3.5.2.1. Konzervativní léčba

Konzervativní léčba je založena na principu manuálního protahování měkkých tkání a průběžné pasivní korekce pomocí dlah nebo sáder (Cooke a další, 2008; Nordin a další, 2002). Jako ucelené metody jsou nejpoužívanější Francouzská technika a Ponsetiho metoda. Obě jsou založeny na výše zmíněném principu (Cooke a další, 2008).

Ponsetiho metoda využívá pro korekci deformity sádrování, přičemž je snahou najednou provést subtalární derotaci, abdukci a korekci equinózního postavení s varozitou (Ošťádal, 2015 (2); Nordin a další 2002). Sádra se obměňuje každý týden (Cooke a další, 2008;

Nordin a další, 2002). Po sundání sádrové dlahy provede lékař vyhodnocení stavu dle zvoleného klasifikačního systému. Jedna série sáder čítá čtyři až deset aplikací. Pokud je deformita po 10. sádře v neuspokojivém stavu, hodnotí se konzervativní léčba jako neúspěšná a přistupuje se k léčbě operační. Pokud však stav vyhovuje, aplikuje se na deset týdnů dlažka s botičkami, kterou má pacient celý den vyjma koupání. Noha je v této dlaze držena na úrovni šíře ramen v 70° abdukci a 15° dorzální flexi. Po tomto období se až do čtyř let věku dlažka aplikuje jen na noc a na odpolední spánek (Cooke a další, 2008). Dle Ošťádal (2015(2)) do věku 3-6 let. Metoda se může doplnit o tenotomii Achillovy šlachy pro dosažení požadovaného postavení (Ošťádal, 2015 (2); Cooke a další, 2008).

Francouzská technika používá stejné schéma postupu korekce jednotlivých složek deformity, avšak jiný přístup. Pacient dochází každý den na manuální korekční intervence po dobu dvou týdnů. Mezi intervencemi jsou aplikovány flexibilní dlažky pasivně korigující postavení. Udává se, že 6-8 týdnů je třeba pro korekci vyklenuté nohy, varózní a addukční složky. Několik měsíců pak trvá korekce equinózního postavení. Metoda je více účinná u mírnějších deformit, a pokud selže, je třeba radikálnější operace než jen doplnění o tenotomii Achillovy šlachy (Cooke a další, 2008).

3.5.2.2. *Operační léčba*

Operační výkony lze rozdělit do tří základních skupin. První skupinou jsou zákroky na měkkých tkáních, druhou skupinou jsou pak zákroky na kostěných strukturách a třetí skupinou jsou pak zákroky kombinované. Hlavní koncept operace spočívá v dosažení kompletní a permanentní korekce během jedné operace. O tom jaké výkony budou použity, pak rozhoduje věk pacienta, patoanatomická situace deformity a její rigidita. Vhodnou dobou z hlediska budoucí remodelace kostí se považuje věk 3-6 měsíců (Nordin a další, 2002).

Výkony na měkkých tkáních jsou cíleny na vazy, kloubní pouzdra a šlachy. Deformované a ztluštěné úseky těchto tkání se operatér snaží buď uvolnit či prodloužit. Mezi tyto výkony se řadí i transpozice úponů šlach. Výkony se provádějí z několika operačních přístupů, jsou jimi zadní, plantární a laterální uvolnění. Zadní uvolnění (tzv. posterior release) spočívá v prodloužení Achillovy šlachy, capsulotomii horního hlezenního a subtalárního kloubu, resekci lig. calcaneofibulare a lig. talofibulare posterior. Přístup se občas doplňuje o transpozici šlach pro dosažení dynamické rovnováhy mezi svaly provádějícími inverzi a everzi (Cook a další 2008; Nordin a další, 2002). Během plantárního uvolnění se provádějí výkony na

kloubních pouzdrech calcaneocuboideálního a talonaviculárního kloubu. Začátky plantární fascie, lig. calcaneonaviculare a krátkých flexorů prstů se od sebe oddělí. Plantární uvolnění se používá pro korekci kavozní složky deformity. Při laterálním uvolnění se otevře přístup k pouzdrům talonaviculárního a calcaneocuboideálního kloubu. Tento přístup se používá v situaci, pokud mají výše zmíněné postupy nedostatečný vliv na obnovu rozsahu pohybu (Cooke a další, 2008).

Mezi výkony na kostěných strukturách se řadí různé druhy osteotomií metatarzálních, tarzálních nebo crurálních kostí. Svůj význam mají zejména u reziduálních deformit po konzervativní léčbě. Někdy se provádějí artrodézy kloubů. Tyto výkony jsou však již rezervní metodou (Cooke a další, 2008; Nordin, 2002). Výkony na kostěných strukturách se doporučují provádět ve vyšším věku pro riziko přerušení jejich vývoje. Nordin a další (2002) doporučují provádět operace u dětí nad 10 let věku, Cooke a další (2008) doporučují počkat s operacemi na kostěných strukturách alespoň do věku 4 let.

3.5.2.3. *Efekt terapie a recidivující PEC*

Výskyt recidiv je podle Cooke a další (2008) u 1/3 konzervativně léčených a nekoreluje se závažností choroby. Recidiva onemocnění je často spojena s nedůsledným přístupem rodičů v období nasazování dlažek s botičkami. Její výskyt vzhledem k věku je nejvyšší v prvních 2 letech života, zbytek do 6 let věku. Asi u 5 % pacientů PEC recidivuje i ve vyšším věku, často však v asociaci s předtím nedignostikovanou neuromuskulární chorobou (Gibbons a Gray, 2013; Cooke a další, 2008).

Podle Ošťádal (2015 (2)) je průměrná doba od začátku konzervativní léčby k operaci z důvodu recidiv 2,7 roku. A dodává, že s rostoucí dobou od ukončení konzervativní léčby roste i pravděpodobnost recidivy. V 6-8 letech věku se recidiva může objevit u 65% úspěšně korigovaných. Nejvyšší výskyt recidiv je pak nad dvěma roky věku.

Léčba recidivující deformity spočívá v retenotomii Achillovy šlachy, transpozicích svalových úponů a dalšími operačními výkony dle aktuálního stavu pacienta. Operace se v některých případech provádějí i opakovaně (Ošťádal, 2015 (2), Cooke a další, 2008).

3.5.3 Buněčné změny vazivové tkáně

Autoři popisují protichůdné trendy změn v počtu buněk různých tkání. Ve vazivovém stroma svalů byl nalezen zvýšený celkový počet buněk (Ioanescu a další 1974), ve vazech a šlachových pochvách naopak nižší (Fukuhara a další, 1994; Diets a další, 1984). Zastoupení druhu buněk se také může lišit. Se zvýšenou hladinou fibroblastů ve svalech byl nalezen zvýšený počet žírných buněk (Ioanescu a další, 1974).

Jsou uváděny zmínky o změně charakteru fibroblastů. Ve vazech a šlachových pochvách byl nalezen kulový tvar fibroblastů s menšími rozměry a objemem cytoplazmy, namísto tvaru vřetenovitého (Diets a další, 1984). Změnám tvaru fibroblastů odpovídá i tvar jader. Popisuje se výskyt velkých vřetenovitých buněk s nápadným jádrem tzv. myofibroblastů (Fukuhara a další, 1994), přičemž buňky podobající se jejich popisu byly nalezeny na mediální straně plantární fascie postižené nohy. Na laterální straně plantární fascie však objeveny nebyly (Zimny a další, 1985).

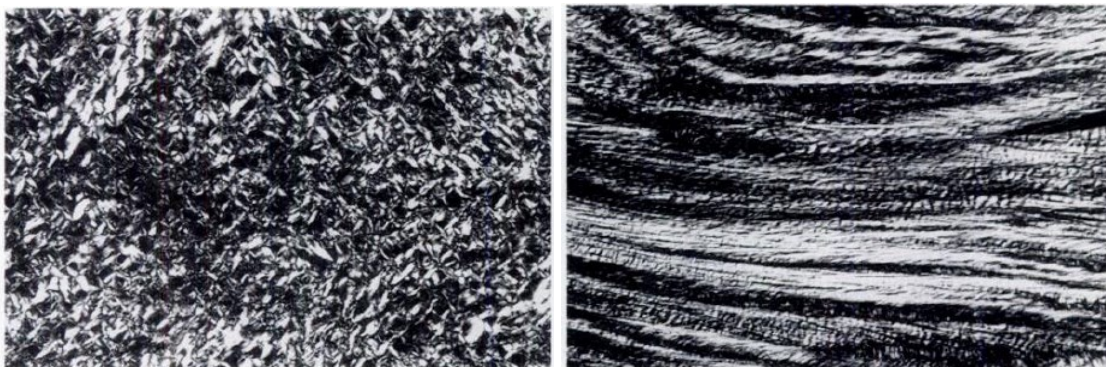
Fibroblasty ve vazivovém stroma svalů vykazovaly zvýšenou syntézu kolagenu (Ioanescu a další 1974). V literatuře jsou zmínky o změnách poměru syntézy kolagenních a nekolagenních bílkovin (Cooke a další, 2008).

3.5.4 Mezibuněčné změny vazivové tkáně

Na mikroskopické úrovni vazivové tkáně byly popsány změny v organizaci vláknité struktury. (Sano a další, 1998) a (Fukuhara a další, 1994) našly vlákna vazivové tkáně z mediální strany nohy bez prostorové orientace (obr. 15A, B). Uvedené změny byly nalezeny již u zárodků s PEC, naopak u zárodků bez PEC tato dysorganizace přítomna nebyla (Fukuhara a další, 1994). Naopak (Khan a další, 2001) žádné známky dysorganizace kolagenních vláken v kloubních pouzdrech a vazech mediální i laterální strany nenalezly. Stejně tak ve fasciích a šlachových pochvách posteromediální skupiny svalů. Autoři nenalezli ani žádné buněčné abnormality.

Dále byly popsány změny v typech kolagenu. V dysorganizovaných oblastech tkání u PEC byl nalezen převažující silný typ kolagenu III oproti slabému u kontrolních vzorků (Fukuhara a další, 1994). Zároveň byl kolagen typu III nahuštěn kolem buněk (Fukuhara a další, 1994; Sano a další, 1998).

Zhao a další (2005) našli celkově zvýšenou hladinu kolagenu v měkkých tkáních u pacientů s PEC. Největší zastoupení měli typy I, II a III. S tím souhlasí výsledky proteomické studie (Ošťádal a další, 2015 (1)), kteří navíc našli přítomnost kolagenů typu V, VI a XII.



Obrázek 15 Porovnání mikrostruktury vazivové tkáně u lidského plodu s PEC a lig. calcaneonaviculare nepostiženého plodu. Fotomikrografie barveného vzorku ze světelného mikroskopu. A) vlevo: fibrotická tkáň mediální strany PEC. B) vpravo: lig. calcaneonaviculare. Zdroj: Fukuhara a další, 1994

Někteří autoři se zabývali vzhledem ke kontraktuře stanovením hladiny cytokontraktálních bílkovin buněk. Byli jimi desmin, vimentin a alfa aktin hladké svaloviny. Studie ukazují rozdílné výsledky. Fukuhara a další (1994) našli u zárodků s PEC jen zvýšenou hladinu desminu. Naopak Sano a další (1998) popisují zvýšenou hladinu vimentinu a aktinu hladké svaloviny, avšak u vzorků již narozených dětí.

Poon a další (2009) ve své studii pátrali po proteinu beta-kateinu, který hraje roli v regulaci buněčné aktivity fibroblastů. Při porovnání vzorků vaziva z mediální části talonavikulárního kloubu a plantární části calcaneocuboideálního kloubu, našli na mediální straně významně vyšší hladinu beta-kateinu a navíc našli zvýšenou expresi genu pro kolagen typu III. Důvodem zkoumání byla podle autorů role beta-kateinu u palmární fibromatózy (Dupuytrenova kontraktura) a hypertrofických žizev.

Ošťádal a další (2015 (1)) zjistili přítomnost dalších proteinů, zejména z kategorie proteoglykanů. Zdá se, že některé proteoglykany jako decorin, biglykan, fibromodulin, lumican a versican ovlivňují fibrilogenezy. Během fibrilogeneze mohou limitovat průměr fibrily a rychlost procesu. Versican zase umožňuje MH expandovat a měnit její viscoelastické vlastnosti čímž podporuje proliferaci buněk (Halper, 2014).

3.5.5 Biomechanické změny vazivové tkáně

Biomechanické studie v korelaci se změnami struktury podle povědomí autora této práce chybějí. Autor našel jen jednu studii (Hatori a další, 2007) sledující biomechanické vlastnosti tkáně u PEC (bohužel nedostupnou v plném znění). Autoři zjišťovali Youngův modul pružnosti při zatížení kloubního pouzdra a ligament z mediální a laterální strany u PEC. Autoři této studie zjistili, že Youngův modul pružnosti je vyšší na laterálních strukturách.

PEC je kvůli buněčným změnám a změnám MH porovnáván s Dupuytrenovou kontrakturou (DK) (Poon a další, 2009; Sano a další, 1998; Fukuhara a další, 1994). Na rozdíl od studií u PEC, byla u studií zabývajících se DK provedena měření sledující mechanické vlastnosti. DK je onemocnění ruky, které je charakterizováno změnami buněk a MH palmární aponeurózy (PA). Tyto změny mohou vést k flekční kontraktuře prstů a vzniku deformity (Rodriguez a další, 2014).

Rodriguez a další (2014) porovnávali kontrahované provazce PA, klinicky nepostiženou přilehlou část PA a fascii předloktí. Zjistily, že tkáň tvořená kontrahovanými provazci je bohatá na vlákna a buňky. Kolagenních vláken bylo téměř o čtvrtinu více než u přilehlé PA. Počet buněk byl významně vyšší a výsledky ukázaly větší zastoupení buněk pozitivních na aktin hladké svaloviny. Podobný trend měla i okolní klinicky nepostižená část PA. Orientace vláken kontrahovaných provazců byla organizována ve směru zatěžování PA, což se lišilo od fascie předloktí a okolní PA. Poměr typu kolagenů III a I byl u provazců a přilehlé PA změněný oproti fascii předloktí. Zároveň k tomu kontrahované provazce obsahovaly vyšší zastoupení retikulárních vláken, avšak méně vláken elastických. Na úrovni mRNA byl nalezen rozdíl v expresy proteinů pro decorin a fibronectin ve smyslu zvýšení a versicanu ve smyslu snížení. V expresy genů pro glykosaminglykany byl rozdíl mezi oběma kategoriemi vzorků z PA oproti fascii předloktí. Buňky, které byly izolované a následně kultivované z kontrahované i nekontrahované části PA, vykazovaly rychlejší proliferaci než buňky z fascie předloktí. Autoři tak podotýkají, že i klinicky nepostižená část palmární fascie je ovlivněna DK.

Forsmann a další (2005) porovnávali agresivní (rekurentní) formu DK a formu u pacientů bez téhož onemocnění v anamnéze. Popisují, že vysoké množství buněk může předvídat agresivní formu onemocnění. Avšak s postupem rozvoje onemocnění prý počet buněk klesá a naopak zastoupení kolagenu typu III roste oproti počátečnímu období.

V dřívějších letech proběhly biomechanické zkoušky postižené palmární fascie. Melling a další (2000) srovnávali vztah mezi množstvím kolagenu typu III, závažností onemocnění a

mechanickými vlastnostmi PA. Zjistili, že s rostoucí klinickou závažností onemocnění roste množství kolagenu typu III a zvyšují se hodnoty časové konstanty během relaxace a procenta zastoupení viskózní frakce. Hodnoty Youngova modulu se však nezvyšovaly. Mimo to, stejně jako Rodriguez a další (2014) našli organizované uspořádání kolagenních vláken ve směru zatížení PA.

Millesi a další (1997) provedli porovnání mechanických vlastností postižené palmární fascie. Vzorky byly rozděleny na kontrahované provazce, ztluštěnou část PA a normálně vypadající PA korespondující s klinickou závažností. Kontrolními vzorky byla zdravá šlacha m. palmaris longus a zdravá palmární fascie. Autoři zjistili, že s růstem závažnosti onemocnění podle chirurgických nálezů, rostly i hodnoty mechanických parametrů jako reziduální napětí, velikost hysterezní smyčky, potřebná doba obnovy mechanických vlastností při cyklické zátěži, relaxace napětí, inverzní relaxace napětí, retardační test (creep), inverzní retardační test. Zároveň zjistili, že může být rozdíl mezi normální PA a normálně vypadající PA. Tedy, že mechanické změny mohou být přítomny ještě před klinickou manifestací.

4 Hypotézy

Na základě studia dostupných podkladů byly s ohledem na stanovený cíl práce stanoveny tyto pracovní hypotézy:

Hypotéza 1:

Struktura vazivové tkáně na mediální straně nohy u PEC bude zjevně dysorganizovaná, v porovnání z vazivovou tkání na laterální straně nohy. To bude reprezentováno nehomogenní orientací vláknité složky tkáně.

Hypotéza 2:

Vláknité struktury vzorků na laterální straně nohy u PEC se budou markantněji organizovat do směru působícího zatížení.

Hypotéza 3:

Vazivové tkáně na mediální straně nohy u PEC budou vykazovat vyšší tuhost než tkáně na laterální straně.

5 Experiment

5.1 Cíle experimentu

Na základě shromážděných informací o experimentálních metodách určování mechanických a strukturálních charakteristik a o informacích ohledně změn vazivové tkáně u fibroproliferativních onemocnění jsme stanovili tyto cíle experimentu:

- 1) Získat snímky struktury vazivové tkáně u PEC na mediální a laterální straně během mechanického testování.
- 2) Porovnat vzhled a organizaci struktury vzorků na mediální a laterální straně nohy a jejich reakci na zatížení.
- 3) Vzhledem k malé velikosti testovaných vzorků získat konzistentní mechanická data vzorků vhodná pro vyhodnocení.
- 4) Na základě zhodnocení celého testovacího protokolu navrhnout opatření vedoucí k získání konzistentních mechanických dat a snímků pro použití v rozsáhlejším výzkumu.
- 5) Porovnat výsledky získaných dat vzorků mediální a laterální strany dle stanovených hypotéz.

5.2 Testované objekty

Tkáňové vzorky byly získány od pacientů ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Bulovka, kteří podstoupili chirurgický zákrok pro recidivující PEC. Chirurgický zákrok obsahoval tyto výkony: subtalární uvolnění (podle McKaye), transpozice úponu m. tibialis anterior s osteotomií os ceuneiforme a os cuboideum, nebo zadní uvolnění. Všichni pacienti byli od narození léčeni Ponsetiho konzervativní metodou a k operaci bylo přistoupeno pouze v případě recidivy, kde již nebylo možno provést konzervativní léčbu. Věk pacientů se pohyboval v intervalu jednoho až tří let.

Vlastní vzorky kontrahované tkáně pocházejí z mediální části talonaviculárního kloubu. Vzorky nekontrahované tkáně z plantární části calcaneocuboideálního kloubu sloužily jako kontrolní vzorky. Výběr tkání byl zvolen podle Poon a další (2009) a jsou dále diskutovány jako vzorky mediální a laterální strany. Odstranění těchto tkání během výše zmíněných chirurgických procedur je běžné, a byly by odstraněny v každém případě. Extrahované vzorky byly ihned vloženy do speciálního buněčného média pro zachování vitality buněk a následně ve

zkumavkách zmrazeny v páře tekutého dusíku při m $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro experimentální část této práce byly použity dva tkáňové vzorky. Jeden pocházel z mediální a druhý z laterální části nohy postižené PEC. Oba vzorky byly těsně před zmrazením nasnímány SHG mikroskopem. Pro další experiment byly rozmrazeny v chladničce při teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky nesly označení 1 a 3. V rámci zaslepení studie neměli vyšetřující v průběhu experimentu informace o skutečném anatomickém původu tkáně. Oba vzorky měli na dvou protilehlých koncích uzly ze šicího materiálu. Tyto uzly sloužily jako identifikační značky anatomické orientace vzorku ve smyslu proximo-distálním.

Vzhledem k nevhodnému poměru délky a šířky vzorku pro distribuci napětí, byl každý ze vzorků rozdělen na dvě poloviny. Druhým důvodem půlení vzorku bylo navýšení počtu testovaných objektů za účelem snížení rizika neúspěšného měření. Vzorky byly označeny 1a, 1b, 3a a 3b.

Rodiče všech pacientů vyjádřily písemný souhlas s použitím vzorků pro výzkumné účely. Vyjádření rozhodnutí etické komise Fakultní Nemocnice na Bulovka a vzor písemného souhlasu rodičů jsou uvedeny v příloze č. 4 a č. 5 této práce. Vlastní experiment se odehrával na půdě Fyziologického ústavu Akademie věd ČR v Praze.

5.3 Mechanická jednoosá tahová zkouška

Jednoosá mechanická zkouška byla prováděna na testeru vlastní výroby (obr. 16), speciálně vyrobeném pro mechanické testování drobných vzorků pod mikroskopem. Součástí testeru jsou dvě polovodičová tenzometrická čidla VTS Zlín, vyrobená na zakázku s rozlišením $0,004\text{ N}$. Pohyb čelistí trhačky je uskutečněn pomocí dvou servomotorů ServodriveNema 8 N. Každý z motorů je schopen vyvinout sílu až 40 N v závislosti na rychlosti posuvu. Čelisti se pohybují po hladkých vodících ocelových tyčích s průměrem 5 mm a motory se pohybují po ocelových závitových tyčích.

Specifikace testeru:

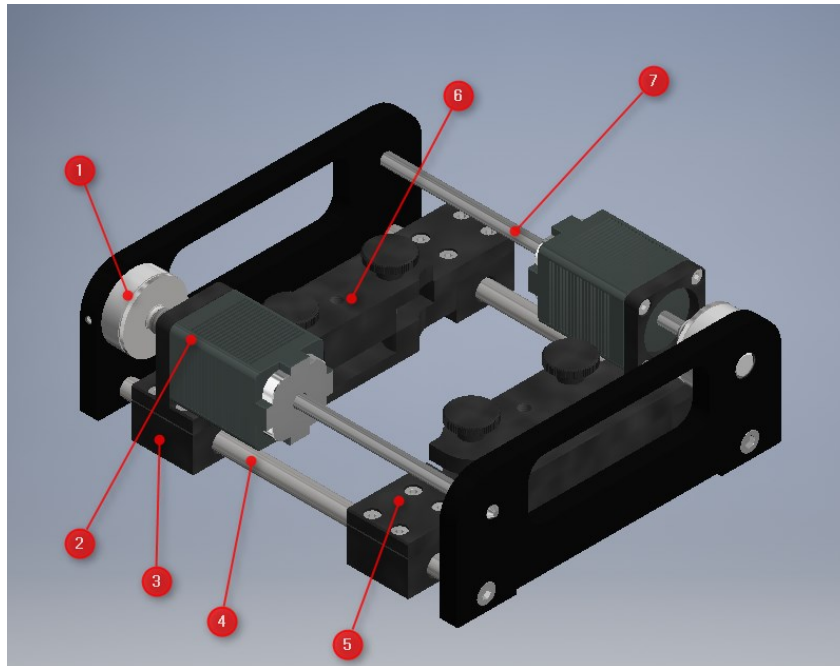
Vzorkovací frekvence: 250 Hz , každých deset naměřených dat je zprůměrováno a odesláno na sběrnici pracující s frekvencí 25 Hz

Rychlost posuvu jedné čelisti: $0,5\text{ mm/s}$

Rychlost změny vzdálenosti čelistí: 1 mm/s

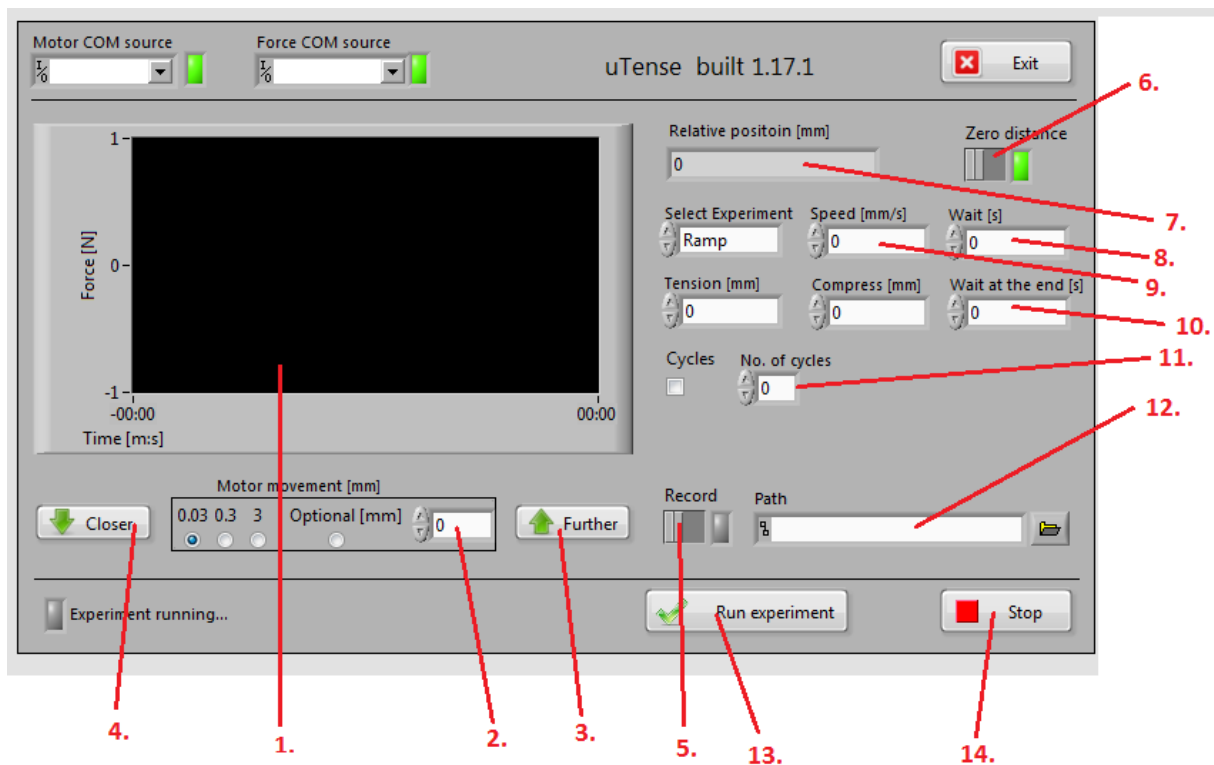
Měřená veličina: napětí můstků v jednotkách AU (arbitrary units, bitový zápis hodnot napětí)

Tester neumožňoval zpětnovazebně určit vzdálenost čelistí. Údaje o vzdálenosti čelistí jsou softwarového (datového) původu, ty jsou počítány od vynulovaných hodnot ve chvíli vzájemného dotyku čelistí. Vzdálenost je udávána v jednotkách tisícín milimetru.



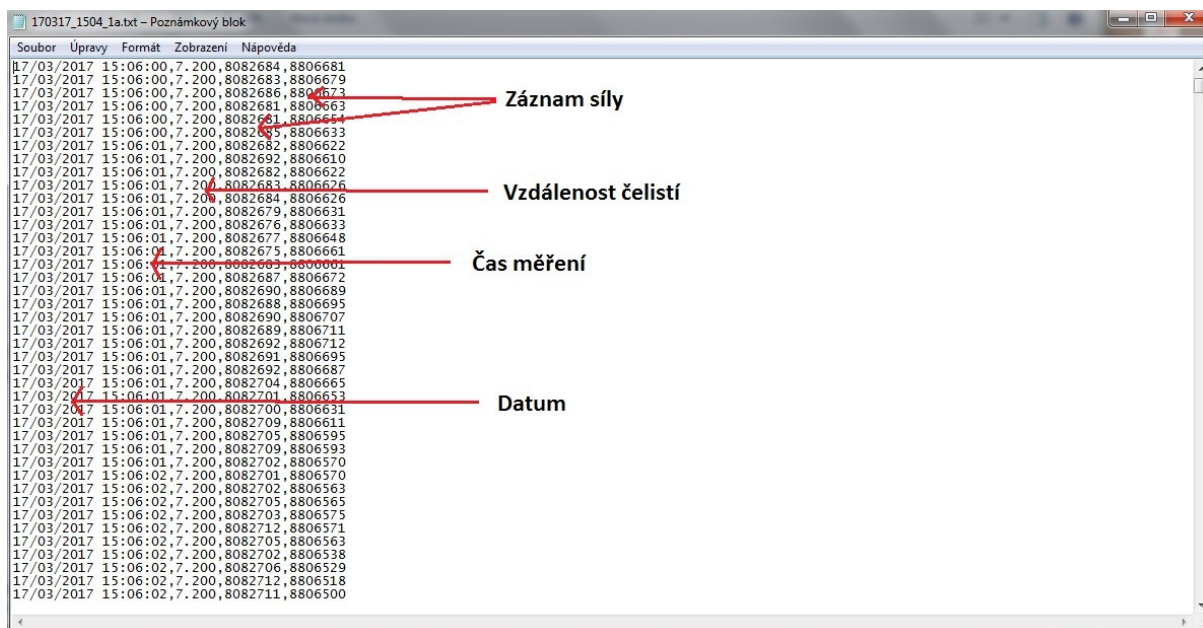
Obrázek 16 3D model trhačky. 1) Silové čidlo, 2) motor, 3) nosič čelistí, 4) vodící tyč pro čelistí, 5) čelist, 6) upnutí vzorku 7) závitová pohybová tyč pro motor. Zdroj: Iška, 2016

Ovládání trhačky bylo uskutečněno pomocí softwaru LabView. Na (obr. 17) je zobrazen panel pro ovládání testeru. Data uložená v cílovém textovém souboru jsou zobrazena na (obr. 18). Záznam síly obsahuje data z obou čidel zvlášť.



Obrázek 17 Ovládací panel pro tester

- 1) Obrazovka pro zobrazení grafu závislosti síly na čase u obou tenzometrů
- 2) Nastavení délky jednoho kroku pro posun čelistí
- 3) Oddálení o jeden krok
- 4) Přiblížení o jeden krok
- 5) Zapnout/ vypnout nahrávání snímaných dat
- 6) Vynulování hodnot měřené vzdálenosti čelistí
- 7) Ukazatel relativní vzdálenosti čelistí (od relativní nulové vzdálenosti)
- 8) Prodléva mezi cykly
- 9) Rychlost pohybu čelistí
- 10) Prodléva na konci cyklu
- 11) Počet cyklů
- 12). Cílový soubor pro uložení dat
- 13) Spustit nastavený experiment
- 14) Ukončit probíhající experiment



Obrázek 18 Hrubá data z trhačky uložena v textovém souboru

5.4 Mikroskopické šetření pomocí buzení druhé harmonické (SHG)

S odkazem na kapitolu 3.3.1 ve které jsou zmíněny některé používané zobrazovací metody vazivové tkáně a možné použití SHG mikroskopie, zde bude uveden bližší popis principu SHG mikroskopie a námi použitého mikroskopu.

Metoda SHG spadá do oblasti nelineární optiky. Pro stimulaci SHG signálu se využívá pulzního laserového záření o délce impulzu v řádech femtosekund. Emitovat SHG signál mohou pouze materiály (tkáně) bez centrosymetrických struktur. Emitovaný signál má polovinu vlnové délky a dvojnásobnou frekvenci než stimulující laserové záření.

Generovaný femtosekundový paprsek po svém vzniku prochází skenovací hlavou (obr. 19), která pomocí soustavy zrcadel blíže specifikuje skenovanou oblast vzorku. Paprsek je dále veden skrz dichroické zrcadlo do objektivu. Pomocí objektivu se pak zaostří paprsek do ohniskové roviny. Emitovaný (odražený) signál vzorku prochází zpět objektivem a pomocí dichroického zrcadla je signál odkloněn k detektoru SHG signálu. Před vstupem k detektoru prochází odražený paprsek dvěma filtry (F1 a F2). Pomocí filtrů dochází k selekci úzkého rozsahu specifické vlnové délky vhodné pro detekci. První filtr odstraňuje vlnovou délku laseru a druhý filtr propouští úzkou část spektra vlnové délky odpovídající SHG signálu. Data z detektoru pak putují do počítače, kde jsou dále automaticky zpracovány pomocí softwaru

daného mikroskopu. Pro správné fungování mikroskopu je nutné udržovat stálou teplotu prostředí a zamezit jakémukoliv světelnému znečištění během skenování. Pro tyto účely je místnost s mikroskopem vybavena výkonnou klimatizací a stěny jsou černé barvy. Jelikož je během skenování potřeba používat monitor, lze použít tmavé příkrývky skenovacího stolku pro odstranění záře monitorů.

Parametry použitého mikroskopu:

Konfokální skenovací platforma Leica TCS SP8 a inverzní mikroskop Leica DMi8

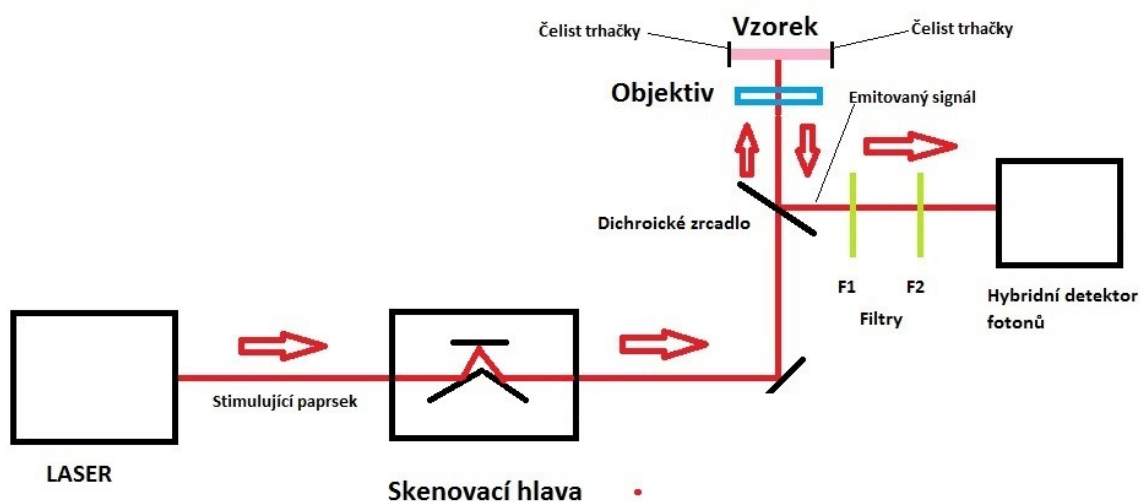
Filtry: 1. filtr: shortpass 703 HSP (110410), 2. filtr: bandpass 430 DF15.

Laser: Pulzní infračervený laditelný laser Chameleon Ultra I (Coherent Inc., CA). Rozsah vlnových délek 690 – 1040 nm. Pulzní frekvence 80 MHz. Délka pulsu ~140 fs.

Detektor: Hybridní detektor Leica HyD s rozsahem detekce vlnění 400 – 720 nm.

Software pro práci s mikroskopem: LAS X

Objektiv: HC PL FLUOTAR (FLUOR) 10x/0.30 NA, DRY, WD= 11 mm, a



Obrázek 19 Schéma sestavy mikroskopu

Výstupní data mikroskopu jsou soubory ve formátu .lif. Data snímané oblasti obsahují řezy na ose Z. Jednotlivé řezy zahrnují trojdimenzionální úsek vzorku. Některé snímky mohou být složeny z dílčích snímků na osách X-Y. Software tyto snímky automaticky spojí v celistvý

obraz. Metodika získání celistvého obrazu z řezů na ose Z snímané oblasti je popsána v kapitole 6.1.1.

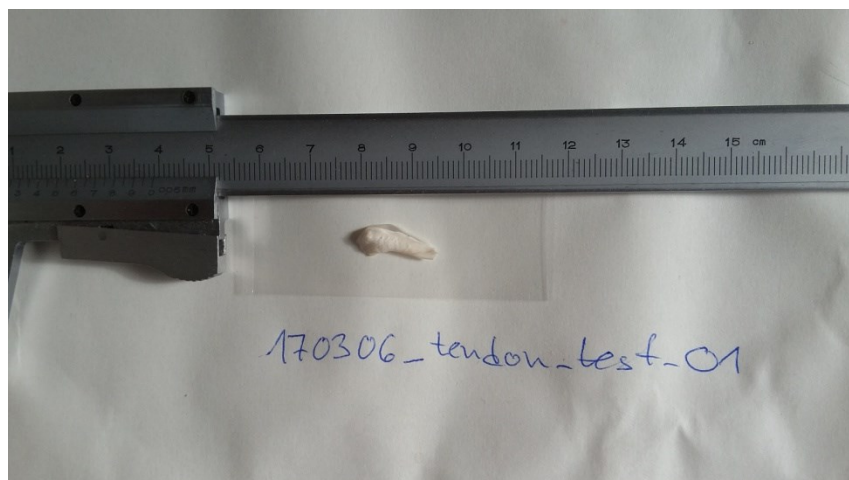
5.5 Předexperiment a návrh experimentálního protokolu

Zkušební experiment byl proveden na vzorcích Achillovy šlachy králíka (obr. 20). Cílem byl nácvik a zhodnocení použitelnosti základní koncepce metodiky pro účely šetření na lidských vzorcích.

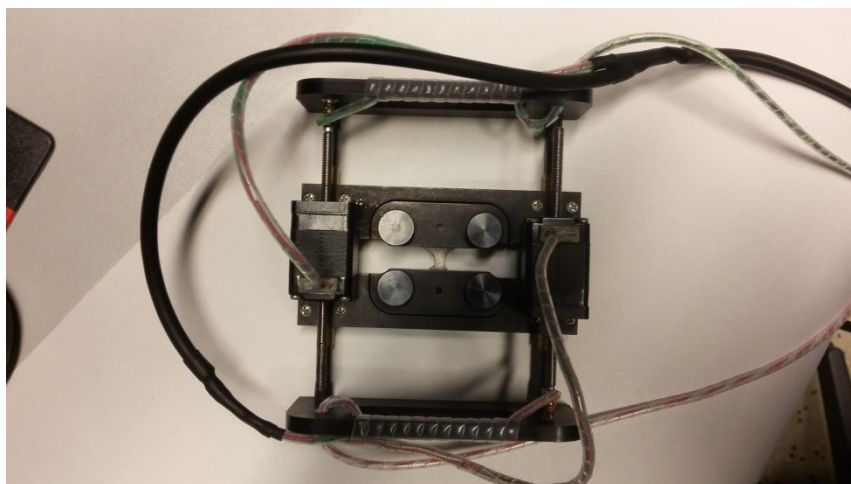
Postup měření probíhal takto:

1. Vyfocení vzorku fotoaparátem na sklíčku
2. Změření průměru vzorku šuplerou
3. SHG snímek na sklíčku pod mikroskopem
4. Upnutí do čelistí testeru a SHG snímek pod mikroskopem
5. Krokovité zvyšování deformace, mezi každým krokem snímek pod SHG mikroskopem
6. Odstranění vzorku z čelistí

Vzorky šlach králíka byly vystaveny prodloužení v krocích různé velikosti o velikosti 0,5 – 5% původní délky a to pomocí testeru popsané v předchozí kapitole. Vzorek byl nejprve upnut do testeru a následně i s celou trhačkou vložen do stolku mikroskopu. Upnutí vzorku je zobrazeno na obr. 21. Mezi každým krokem byl vzorek nasnímán SHG mikroskopem.

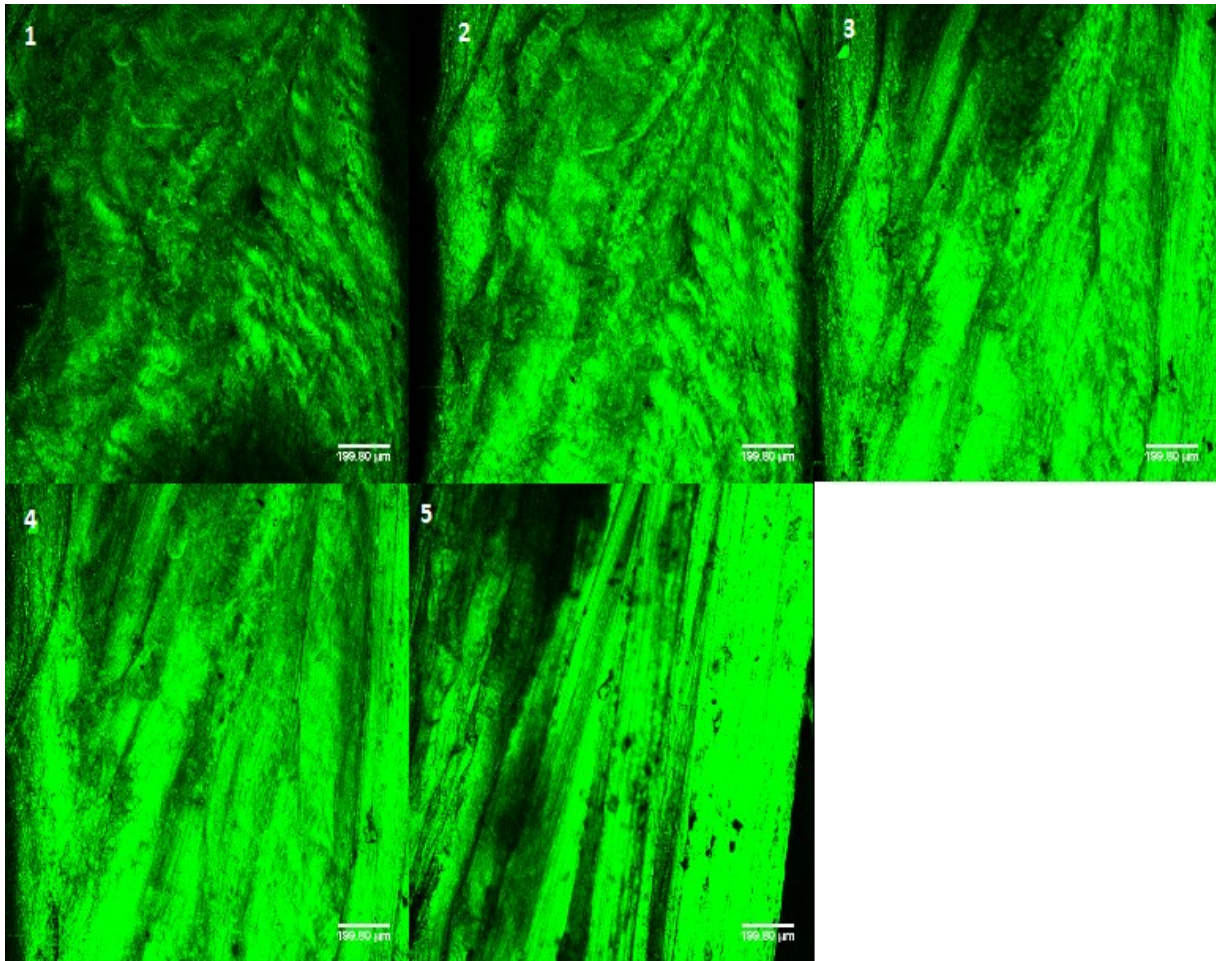


Obrázek 20 Fotka vzorku Achillovy šlachy králíka

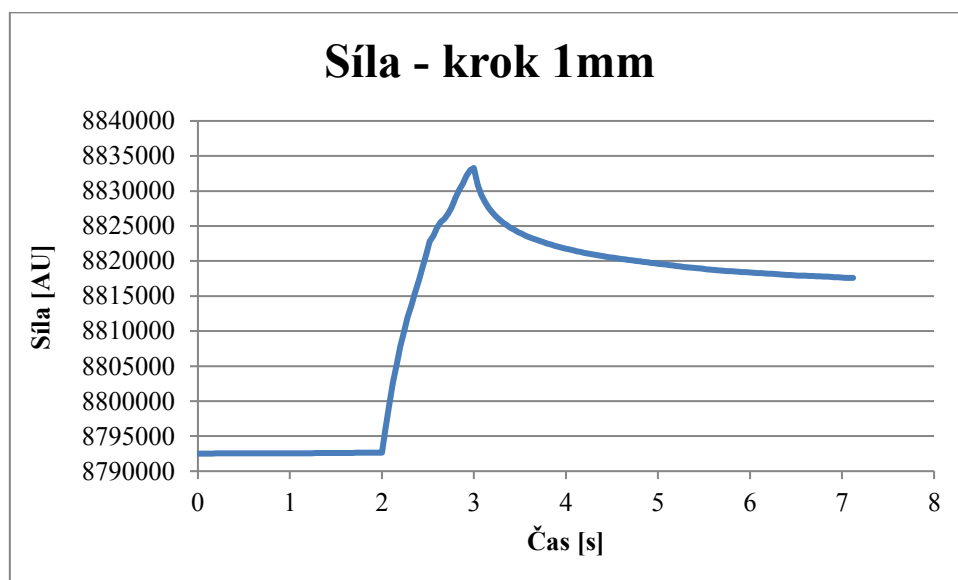


Obrázek 21 Upnutí a natažený vzorek v čelistech testeru

Na obr. 22 jsou demonstrovány snímky jedné oblasti vzorku šlachy králíka v pěti stupních prodloužení. Z obrázku je možno pozorovat změnu charakteru struktury vzorku. Na prvním snímku je povrch vzorku vlnovitý, toto zvlnění s postupným natažením vzorku mizí do vytracena a celá struktura nakonec poskytuje dojem plného natažení. Tato reakce tkáně je popsána v kapitole 3.2 a 3.2.2. Na Graf 1 je pak demonstrována silová odpověď vzorku na prodloužení sestavená z hrubých dat získaných pomocí trhačky.

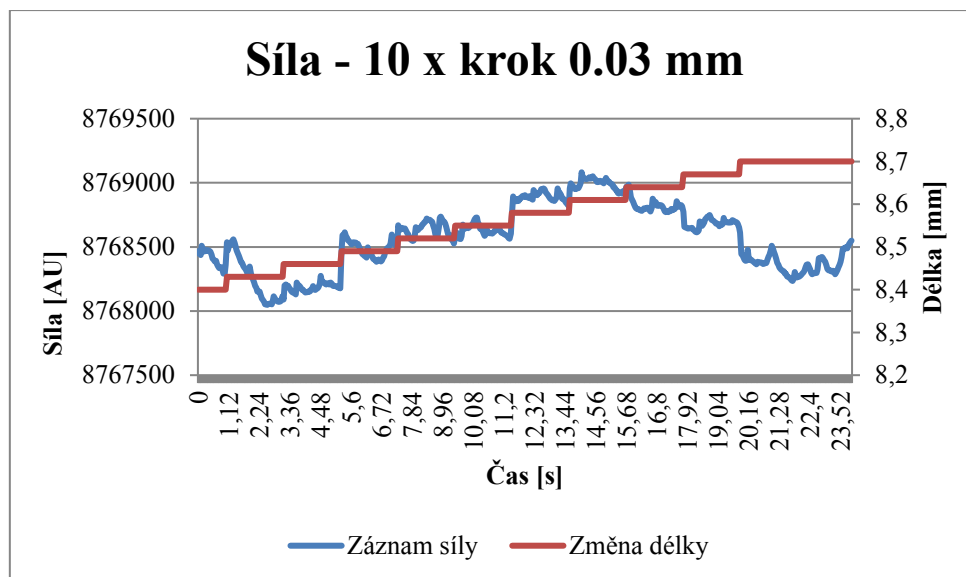


Obrázek 22 SHG snímky vzorku šlachy králíka během pěti kroků prodloužení



Graf 1 Závislost síly na čase. Data jednoho kroku získaná během předeexperimentu na šlachách králíka

V předexperimentu byl zjištěn fakt, že během krátkých kroků (kolem 0,5 % původní délky) nezískáváme čistá data z trhačky. Křivky jednotlivých kroků jsou nejednoznačné (Graf 2). Dalším nedostatkem byl výkluz vzorku z čelistí. Pro zajištění připevnění vzorku byl povrch čelistí přelepen hrubou látkovou náplastí (obr. 24B).

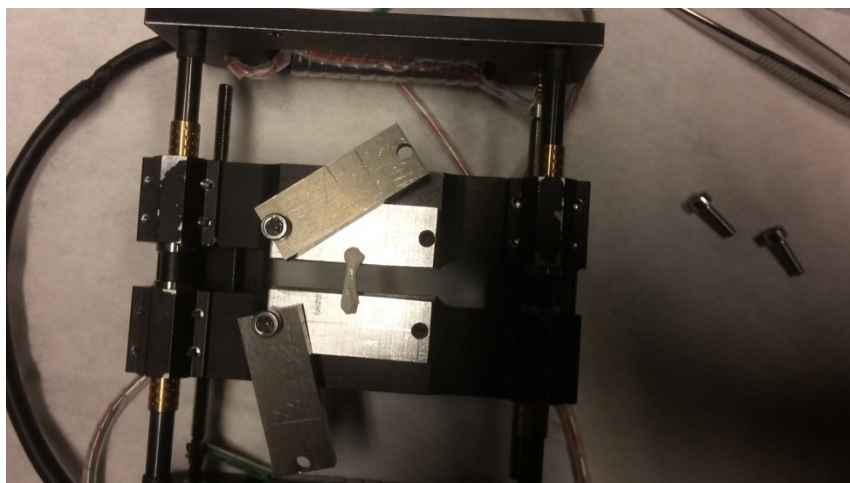


Graf 2 Závislost síly a délky vzorku na čase. Červená křivka značí kinematické zatížení (deformaci) v deseti krocích. Modrá křivka je složena ze záznamu síly během testování. Přes zjevné značné zatížení křivky šumem, je patrný počáteční růst reakční síly následovaný poklesem, kdy došlo k vyklouzávání vzorku z čelistí

Celý protokol mechanické zkoušky byl tedy přizpůsoben tak, aby umožňoval skenování vzorku SHG mikroskopií během zvyšujícího se prodloužení vzorku. Tím by bylo možné zachytit chování tkáně během zatížení.

Při prvním pokusu o předexperiment jsme narazili na technický nedostatek týkající se vzdálenosti objektivu od vzorku v testeru. Tato trhačka byla již dříve použita v kombinaci s mikroskopem Leica SP2. Objektiv byl příliš daleko, a nebyli jsme schopni doostrit SHG signál vzorku ani po maximálním posunu objektivu v ose Z. Tester byl tedy upraven tak, aby se vzorek dostal blíže mikroskopu. Toho bylo docíleno přiděláním nástavce na spodní stranu čelistí (obr. 23). Dalším nedostatkem se jevílo prověšení vzorku před natažením a změna jeho polohy během napínání. Změna polohy vzorku posunula vzorek mimo ohnisko snímání mikroskopu, a tak bylo nutné zejména před napřimením vzorku ručně měnit polohu objektivu. Jelikož byly vzorky během testování vystaveny vzduchu a laserovému paprsku, bylo nutné vzorky

pravidelně vlhčit roztokem PBS (Phosphate Buffered Saline). V jiném případě vzorek uschl a ztuhl, což se projevovalo zablokováním posunu čelistí trhačky. Na tento faktor bylo potřeba myslet zejména v konečných stádiích deformace, během kterých byl vzorek prakticky „ždímán“.



Obrázek 23 Uložení vzorku na upravené trhačce

5.6 Postup měření a experimentální protokol

Po získání dat uvedených v předexperimentu vypadal postup měření vzorků následovně:

1. Vyfocení celého kusu tkáně fotoaparátem na sklíčku
2. Podélné rozdělení tkáně na dva vzorky pomocí skalpelu
3. Vyfocení vzorku fotoaparátem s označením a měřítkem
4. SHG snímek vzorku pod mikroskopem v klidovém stavu na sklíčku
5. Nasazení vzorku do čelistí testeru
6. SHG snímek vzorku pod mikroskopem v klidovém stavu v testeru bez tahu
7. **Testovací protokol – viz dále**
8. Vyjmutí vzorku z čelistí

Po upnutí vzorku v testeru (bod 5) a vložení pod mikroskop (bod 6) následovalo krokové zatěžování vzorku pomocí jeho prodloužení ve dvou sériích. Zatížení bylo nutné krokovat, aby mohl mikroskop pořádit v průběhu deformace snímky tkáně (viz předexperiment). Rychlost

změny vzdálenosti čelistí byla vždy: 1 mm/sec. Dále je uvedeno pouze základní schéma sérií, během testování byly připuštěny odchylky (viz. kap. 6). Série byly započaty ve chvíli první silové odezvy vzorku.

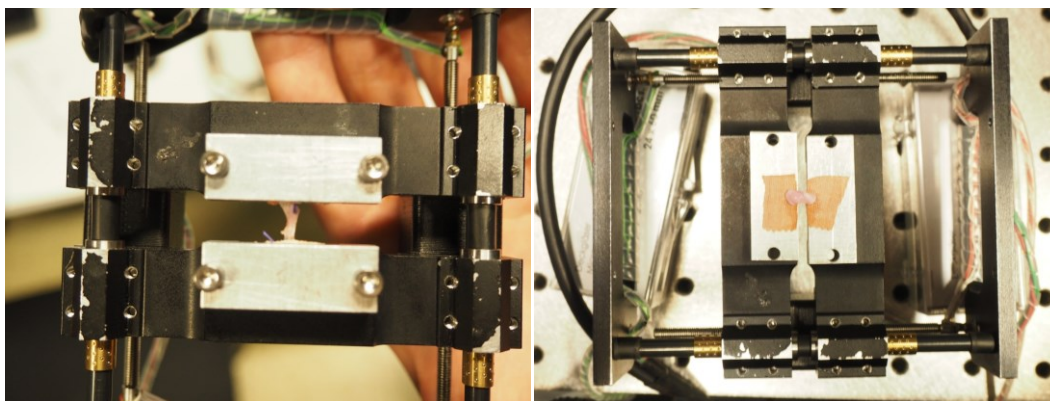
- 1) Série krátkých kroků: krok: 0.1 mm, 11 opakování
- 2) Série dlouhých kroků: krok 1mm, 4 opakování
- 3) Závěrečné natažení do maxima

Série krátkých kroků byla zvolena za účelem nasnímání prvních reakcí struktury vzorku na zatížení (odpovídající fázi napřímení povrchu struktury vzorku). Série dlouhých kroků sloužila pro zvýraznění chování vzorků v reakci na zatížení a získání intenzivnější mechanické odezvy.

Mezi každým krokem trhačky byla nastavena dostatečná prodleva pro úspěšné zakončení procesu skenování SHG mikroskopu. Doba této prodlevy se odvíjela od doby skenování mikroskopu, která se lišila podle velikosti snímané oblasti a dalších parametrů (několik sekund až 3 minuty). Software pro ovládání mikroskopu při spuštění skenování zobrazí odhadovanou (poměrně přesnou) dobu trvání procesu. Proto jsme před nastavením parametrů kroků pro trhačku spustili skenování, a jakmile byla zobrazena odhadnutá doba skenování, byl proces v mikroskopu přerušen. V nastavení trvání kroků pro trhačku pak byla nad tuto dobu přičtena ještě desetisekundová rezerva. Ne vždy bylo použito stejné nastavení mikroskopu pro klidový stav, jako pro jednotlivé kroky a tak bylo nutné tento čas zjistit výše zmíněným postupem. Podrobné parametry mikroskopu pro snímání v této práci nebudou uvedeny. Nastavení mikroskopu se odvíjelo od aktuální potřeby, a celý proces se odrážel od zkušeností technika. Mikroskop nebyl nijak synchronizován s testerem, načasování procedur tak bylo nutno provádět manuálně.

Pro sérii kroků po 1mm bylo používáno detailnějšího skenování a vzhledem k nižšímu počtu kroků, větší deformaci a případnému ostření, byl každý cyklus trhačky spouštěn ručně.

Pro sledování chování vzorku na monitoru v reálném čase, bylo možné sledovat vzorek pod mikroskopem v režimu „live“. Ten umožňoval náhled vzorku bez skenovacího procesu. Pokud mikroskop skenoval, nebylo možno mít tento režim spuštěný. Tkáň ale bylo možno sledovat na řezech aktuálně probíhajícího procesu skenování. Během měření byly vzorky průběžně hydratovány roztokem PBS pomocí kapátka. Kromě sledování vzorku pod mikroskopem bylo možné sledovat silovou odezvu vzorku na obrazovce řídicího softwaru testeru. Zda se data nahrávala či nenahrávala, záleželo na volbě uživatele.



Obrázek 24 A) vlevo: natažený a částečně přetržený vzorek po ukončení testování v trhačce B) vpravo: uložení vzorku na hrubé náplasti před upevněním horní poloviny čelisti

Testování bylo ukončeno závěrečným plynulým natažením vzorku s cílem ho přetřhnout. Toho nebylo dosaženo kvůli nedostatečné síle motorů trhačky. Na obr. 24A je fotografie natrženého vzorku před jeho odstraněním v bodě 8.

6 Zpracování dat

6.1 Snímky

Snímky pořízené SHG mikroskopií uložené v souborech .lif byly otevřeny pomocí volně dostupného programu Fiji. Tento program je schopen otevřít řezy pro jednu snímanou oblast v jednom okně. Pomocí jezdce ve spodní části okna potom uživatel prochází každý řez zvlášť. Každý ze snímků je vždy orientovaný tak, že spojnice horního a dolního okraje snímku reprezentuje jeho podélnou osu (výjimkou jsou snímky před zmrazením, které jsou potočeny o 90° vlevo).

Pro vytvoření jednoho celistvého obrazu z řezů na ose Z, byla v programu Fiji využita funkce „maximální intenzita“. Tato funkce vybere pixely na jedné souřadnici s nejvyšší intenzitou ze všech řezů snímané oblasti. Po volbě této funkce je uživatel dotázán z kolika řezů se budou pixely vybírat, toho lze využít pro selekci nevhodných řezů. U některých, méně čitelných snímků, byla upravena světlost a kontrast snímku. Tato úprava byla prováděna v režimu 16-ti bitové hloubky obrazu. Po převedení snímku do tohoto režimu, bylo nutné před samotnou úpravou provést zobrazení v odstínech zelené barvy. Program totiž po změně režimu na 16-ti bitovou hloubku převedl snímky do odstínů šedivé barvy. Vytvořený snímek byl následně uložen v formátu .tif.

Při prezentování více snímků v řadě za sebou (například pohled na vzorek ve více stupních deformace), byl vytvořen pomocí programu Fiji jeden složený obrázek. Po výběru vhodných snímků bylo ke každému z nich přiřazeno měřítko. Před přidáním měřítka bylo nutné snímky převést na režim RGB (red-green-blue), jinak zůstalo měřítko zbarvené do zelené barvy. Číselná hodnota v mikrometrech je automaticky vypočtena z metadat snímků. Jednotlivé celistvé snímky s měřítkem byly převedeny do jednoho okna pomocí funkce „stoh“ (angl. stack). Mezi snímky tak lze přecházet jezdcem na spodní části okna, stejně jako mezi řezy původní snímané oblasti. Po seřazení snímků (nástroj třídič stohu), byla zvolena funkce „montáž obrázků“. Snímky jednoho okna byly po nastavení požadovaného počtu řad a sloupců zobrazeny v řadě za sebou (obr. 22).

Ačkoliv existují automatizované metody schopné kvantifikovat jevy na snímcích (viz kapitola 3.2.1), nebyly v této práci použity. Z hlediska vyhodnocení použitelnosti kombinace jednoosé tahové zkoušky a SHG mikroskopie jsou dále snímky popsány především slovně.

Pro kvantifikaci některých jevů na snímcích, bylo použito ruční měření v programu Fiji. Při zachování původních rozměrů snímků byly měřicí nástroje kalibrovány podle jejich měřítka. Měření bylo provedeno pomocí nástroje přímka. Program umožňuje po stisku klávesy „m“ ukládat měřená data přímo do tabulky. Po změření vybraných parametrů byla tato data zkopírována do MS Excell. Měřenými hodnotami byly vzdálenost mezi dvěma body a úhel odchýlení přímky od horizontály (počítáno proti směru hodinových ručiček). Zvýraznění všech míst měření (oblastí zájmu) bylo na snímcích ponecháno pomocí funkce „label“. Výsledný snímek byl uložen ve formátu .tif. Pro označení snímků a zvýraznění některých jevů na snímku (ve formátu .tif), byl použit program Malování (Windows). Jelikož je nekomprimovaný formát .tif pro ukládání do MS Word příliš objemný, byly snímky před vložením převedeny na formát .png. Tento formát obrázků zachovává vysokou kvalitu snímků při snížení jejich datového objemu.

6.2 Tahové zkoušky

Cílem této podkapitoly je popis metodiky získání hodnot charakterizující tuhost vzorků. Pro demonstraci a metodické účely je tato kapitola rozšířena o podrobnější popis naměřených dat.

Všechna data z trhačky uložená v souborech .txt (obr. 18) byla zkopírována do tabulkového procesoru MS Excel, kde byla dále zpracována. Uvedená metodika je demonstrována na

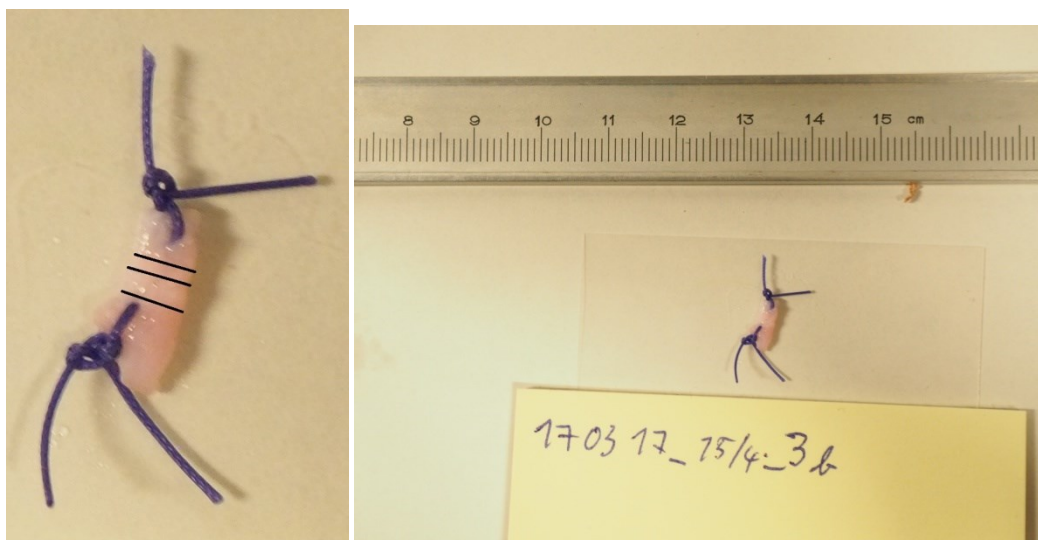
jednom ze vzorků (1b). Výsledky experimentu vztažené ke stanoveným hypotézám jsou uvedeny v kapitole 7.2.

Pro práci s napětím vzorku σ bylo nezbytné určit průřez vzorkem **A** v klidovém stavu. Pro jeho identifikaci byly použity fotografie z bodu 3 (obr. 25A,B). Fotografie byla zpracována ve volně dostupném programu Fiji, který umožňuje identifikovat množství pixelů na přímce mezi dvěma body. Pomocí nástroje přímka byl na fotce vzorku označen bod na jeho okraji a následně byl kurzor přetažen na protilehlou stranu vzorku. Zaznamenávání dat probíhalo stejným způsobem jako při měření na SHG snímcích. Každému vzorku byl takto změřen šířkový rozměr na třech místech (obr. 25A,B). Naměřené údaje byly zprůměrovány. Pro převod pixelů na délkové rozměry byl zjištěn stejným způsobem počet pixelů na přímce spojující hranice značeného 1 cm na měřítku ležícího vedle vzorku. Pro zjištění skutečné délky rozměrů vzorku, byl počet pixelů jedné přímky vzorku vydělen počtem pixelů odpovídajících 1 cm na měřítku.

Průřez vzorkem byl zvažován jako kruh. Pro výpočet průřezu **A** byl použit vzorec pro výpočet obsahu kruhu. (Při fotografiích vzorků ze dvou kolmých rovin, by tak bylo možné získat rozměry pro výpočet elipsy).

$$A = \pi \times r^2 \quad (9)$$

Hodnota **r** byla tedy polovinou průměrné šíře vzorku. Výsledek byl převeden na milimetry čtvereční.



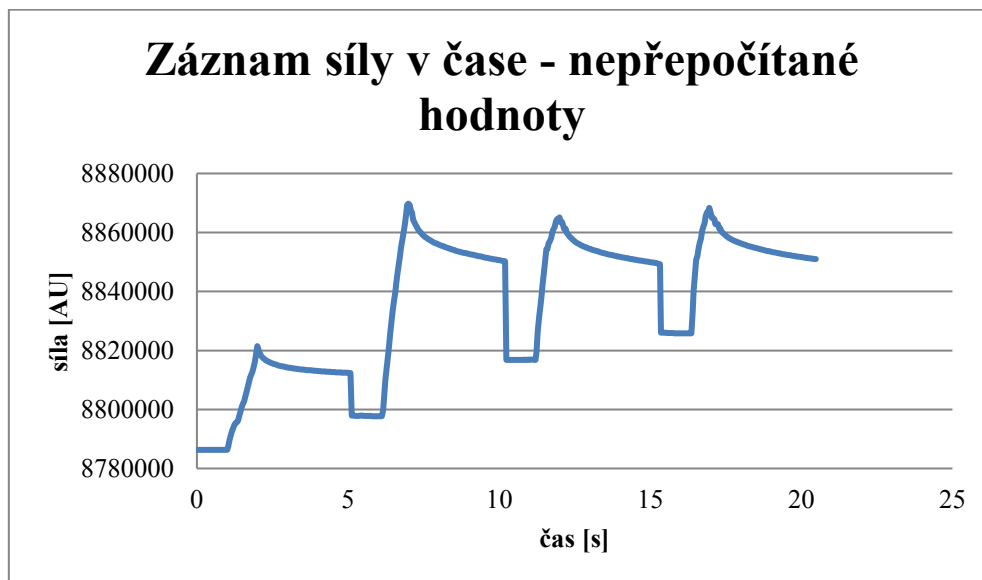
Obrázek 25 Demonstrativní fotografie vzorku 3b A) vlevo: Znázornění vedení přímek pro měření počtu pixelů napříč vzorkem B) vpravo: vzorek na sklíčku vedle měřítka

Z hrubých dat získaných z trhačky bylo možno zpracovat jen data ze série dlouhých kroků (1mm), jelikož data počáteční série krátkých kroků (0.1mm) svou kvalitou neodpovídala požadavkům pro vyhodnocení. Nicméně na Graf 10 (str. 64) lze jednoznačně odečíst vzestupný lineární trend křivky naměřené silové odezvy této série. Hrubá data z trhačky obsahovala záznam síly a záznam vzdálenosti čelistí. Síla byla vyjádřena v tzv. arbitrary units (AU), která byla dále převedena na reálnou sílu v jednotkách Newtonů (N). Toho bylo dosaženo pomocí vzorce:

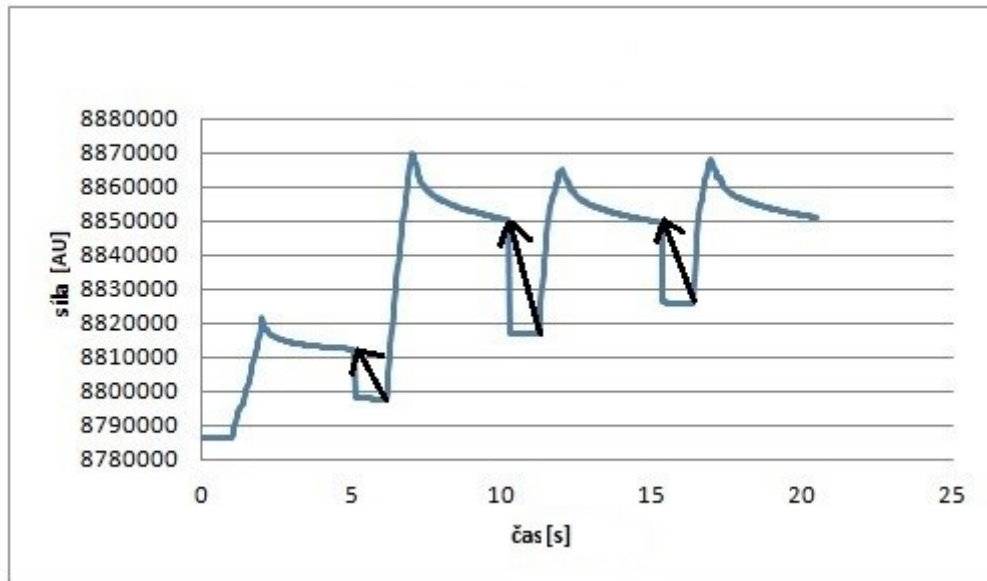
$$F=U_m \times C_i \quad (10)$$

Kdy U_m je elektrické napětí na můstku a C_i je tzv. Gauge faktor. AU jsou bitovým zápisem hodnot el. napětí, které byly převedeny na napětí vydělením 100 000. Gauge faktor má hodnotu 140 a je dán výrobními specifiky tenzometru. Síla [N] pro každý datový zápis je vypočítána z rozdílu napětí mezi dosaženým a stanoveným počátečním napětím.

Zaznamenaná síla obsahovala artefakty dané konstrukcí trhačky, při kterých síla náhle klesla dolu (Graf 3, vzorek 1b). Tyto artefakty bylo nutno odstranit a napojit neporušenou křivku na místě vystřihnutí artefaktu (obr. 26).



Graf 3 Záznam silové odezvy vzorku s artefakty



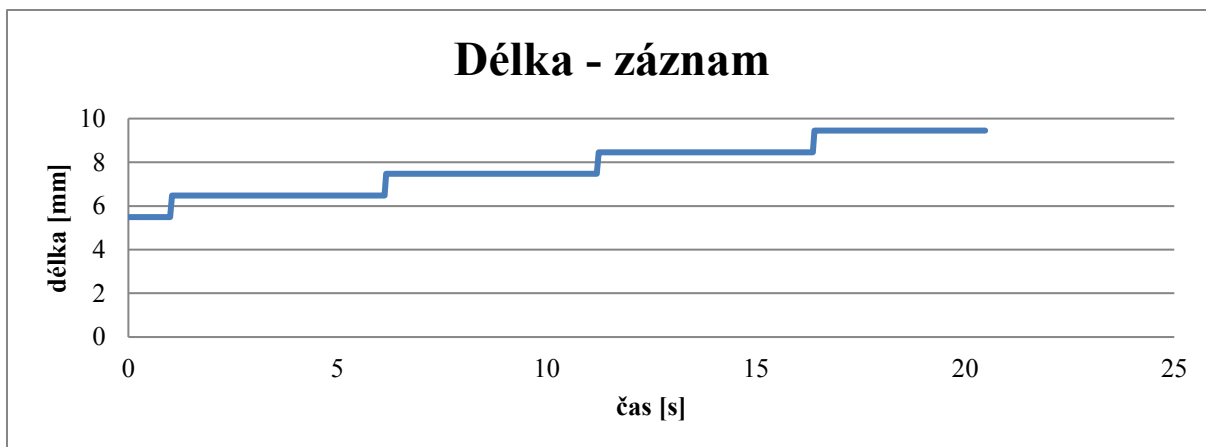
Obrázek 26 Demonstrace úpravy křivky

Po úpravě přepočtu síly v arbitrary units na newtony a vystřížení artefaktů vznikla křivka s reálnými hodnotami bez artefaktů, na níž jsou patrné jednotlivé kroky během testování (Graf 4).



Graf 4. Závislost síly na čase během čtyř kroků (1mm). Upravená křivka

Na Graf 5 je možno vidět záznam kroků trhačky vyjádřené změnou vzdálenosti čelistí (mm).



Graf 5 Záznam vzdálenosti čelistí (vzorku) v čase během čtyř kroků (1mm)

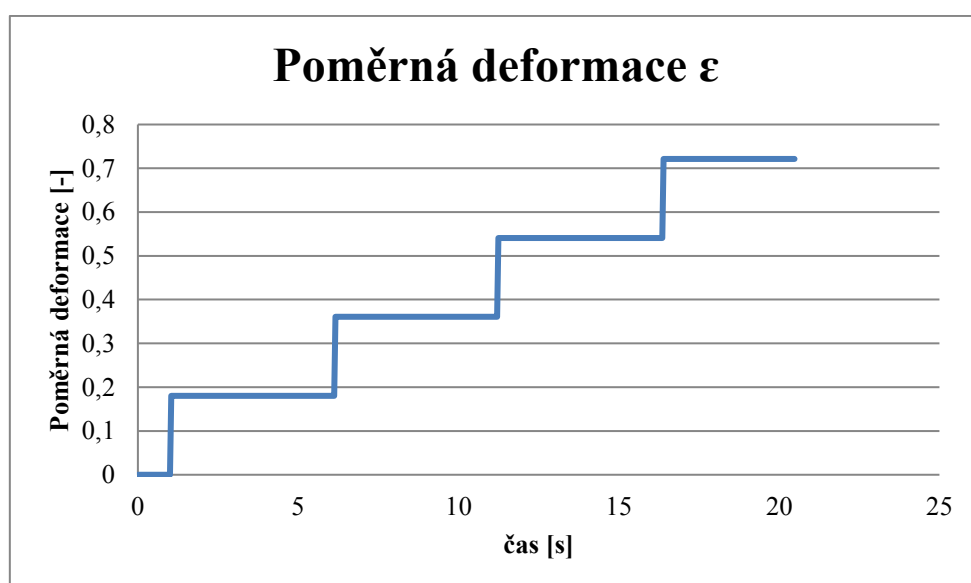
Délka vzorku byla převedena na poměrnou deformaci ε pomocí vzorce

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (11)$$

kdy Δl je rozdíl mezi původní a nově dosaženou délkou čelistí

$$\Delta l = l_1 - l_0 \quad (12)$$

A l_0 je původní délka vzorku. Pro účely výpočtu byla jako l_0 zvolena vzdálenost čelistí po první sérii krátkých kroků. Hodnota l_1 je nově dosažená vzdálenost čelistí.



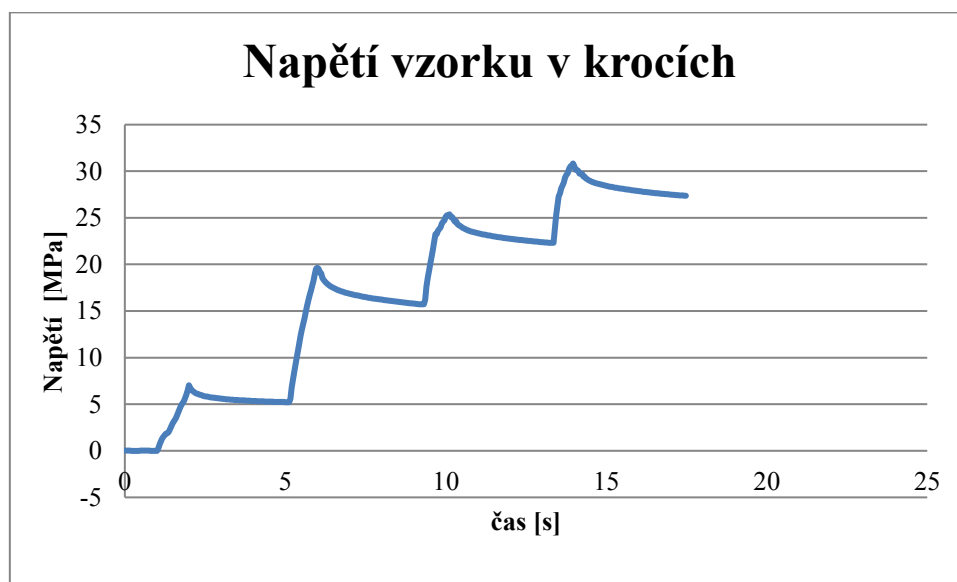
Graf 6 Křivka vypočtené poměrné deformace v závislosti na čase

Počátek křivky deformace byl posunut po svislé ose na bod (0), který reprezentuje počátek změny deformace. Deformace je bezrozměrnou jednotkou, ze které je možno znásobením ($\times 100$) vyjádřit procentuální hodnotu deformace vycházející z bodu l_0 .

Ze síly (F) a průřezu (A) vzorku, který byl stanoven dle metodiky popsané v úvodu této podkapitoly, bylo vypočteno napětí dle vztahu:

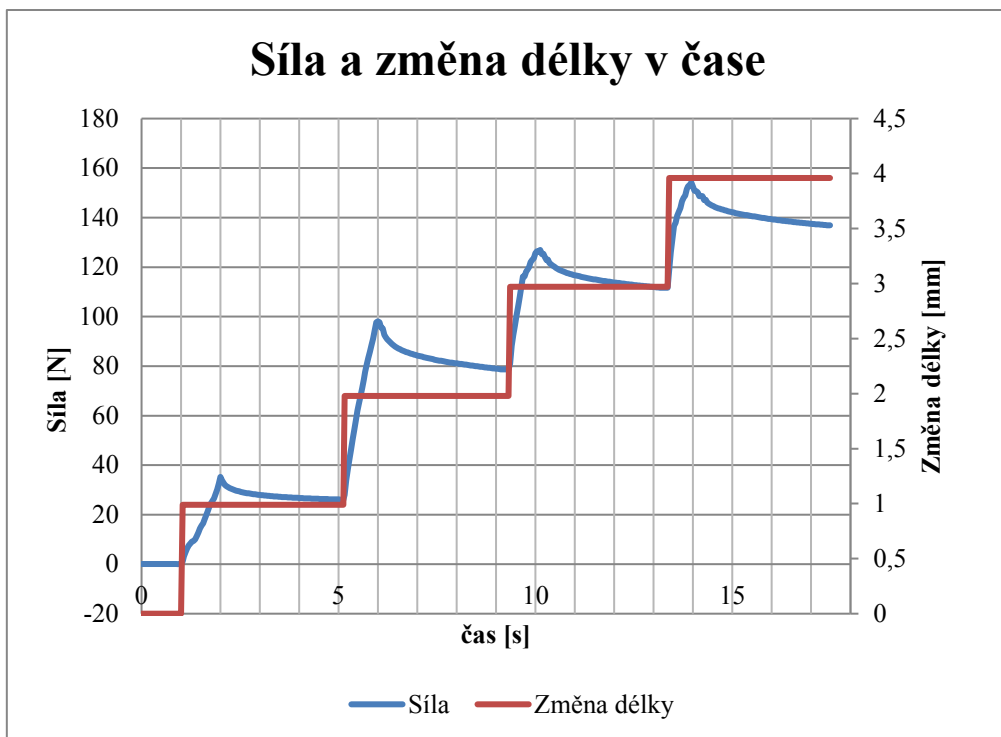
$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (13)$$

Jedná se tedy o smluvní napětí vypočítané z klidového průřezu vzorku. Výsledná křivka grafu závislosti napětí a času (Graf 7) se neliší od křivky grafu závislosti síly a času.

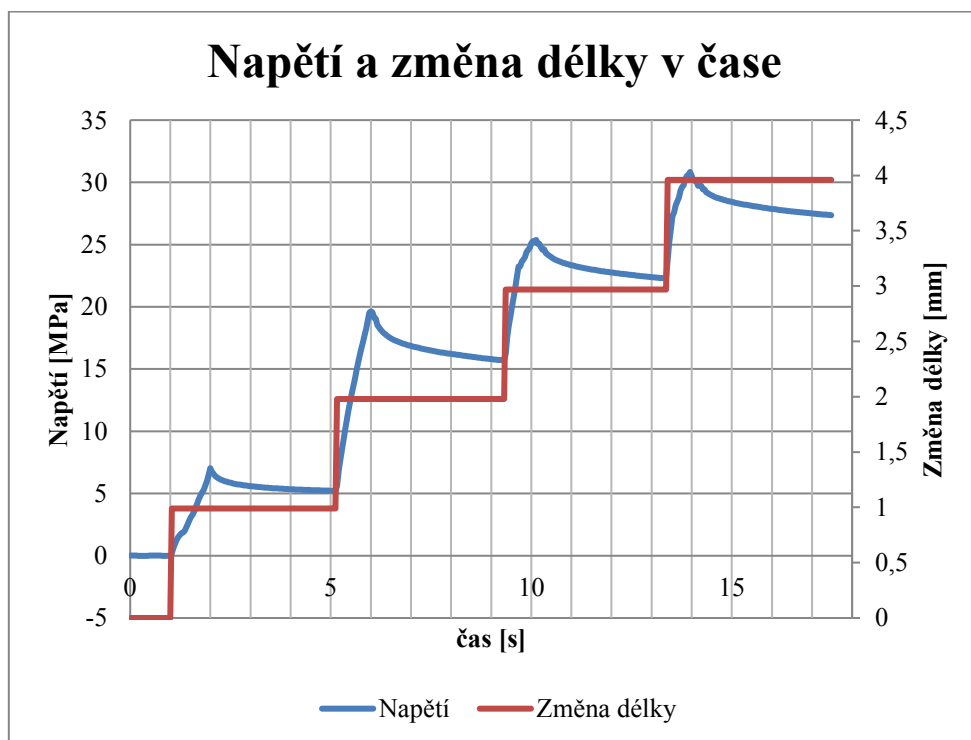


Graf 7 Křivka vypočteného napětí v závislosti na čase během čtyř kroků (1mm)

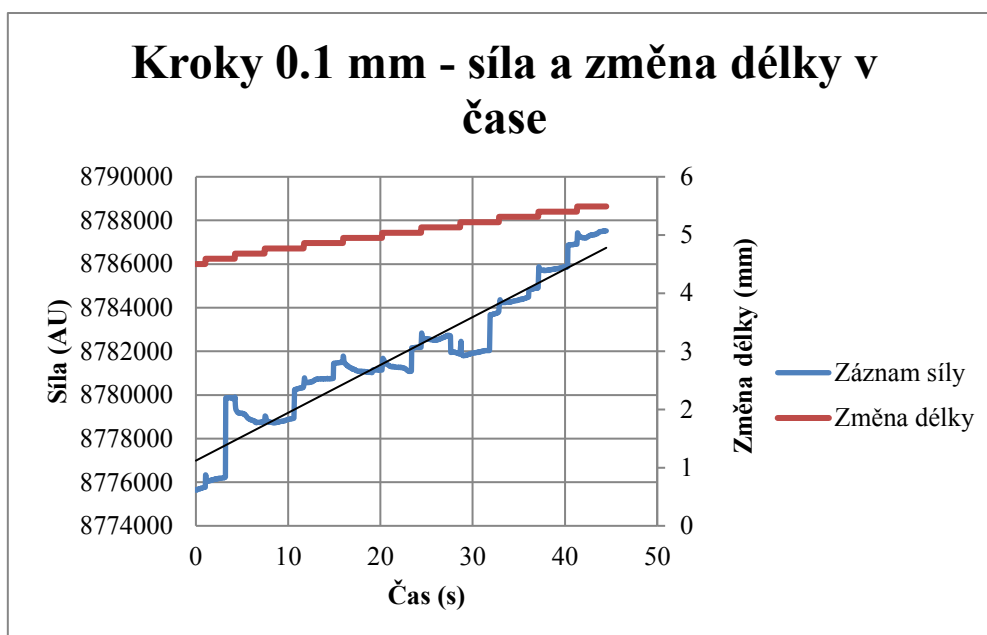
Na získané křivce je možno odečíst charakter čtyř po sobě jdoucích kroků. Vzestupná oblast kroku vyjadřuje růst napětí během zvyšující vzdálenosti čelistí. Po dosažení cílové deformace každého kroku následuje zpočátku strmý a posléze pozvolnější pokles napětí v čase. Jak je uvedeno v kapitole (3.2.2 a 3.3), vystavením vzorku deformaci a sledování odezvy napětí vzorku v čase můžeme sledovat tzv. relaxaci napětí. Pro srovnání uvádíme křivku síly F a napětí σ a změnu délky Δl v čase (Graf 8, Graf 9).



Graf 8 Křivka síly a změny délky v závislosti na čase

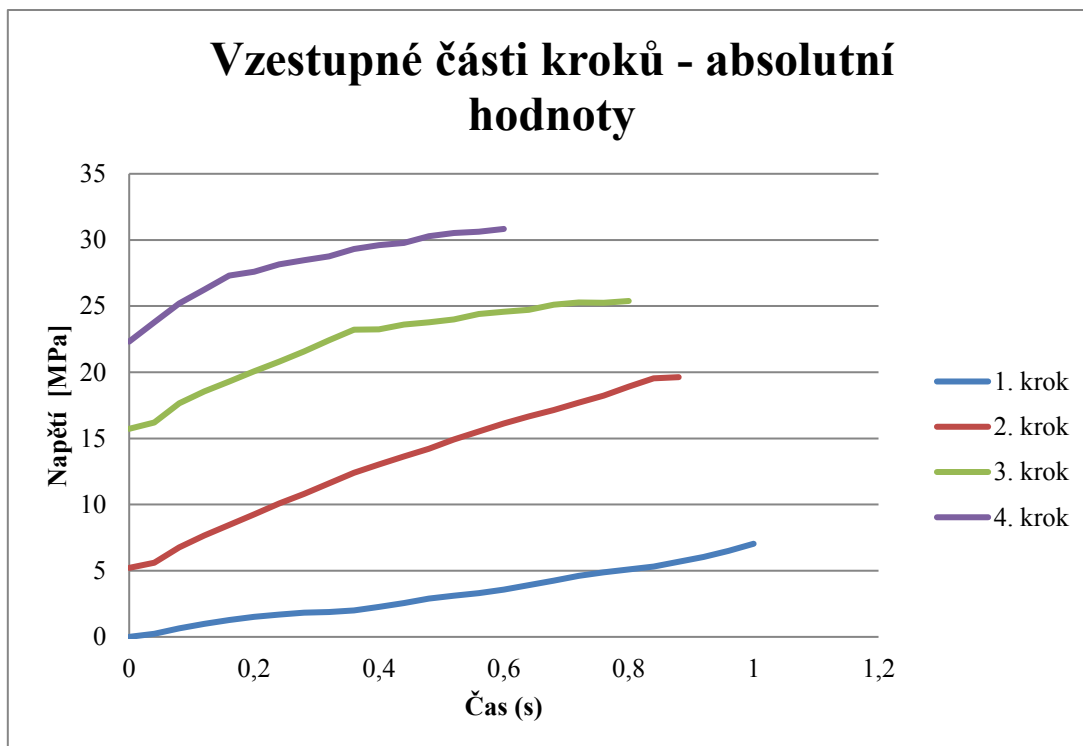


Graf 9 Křivka vypočteného napětí a změny délky v závislosti na čase



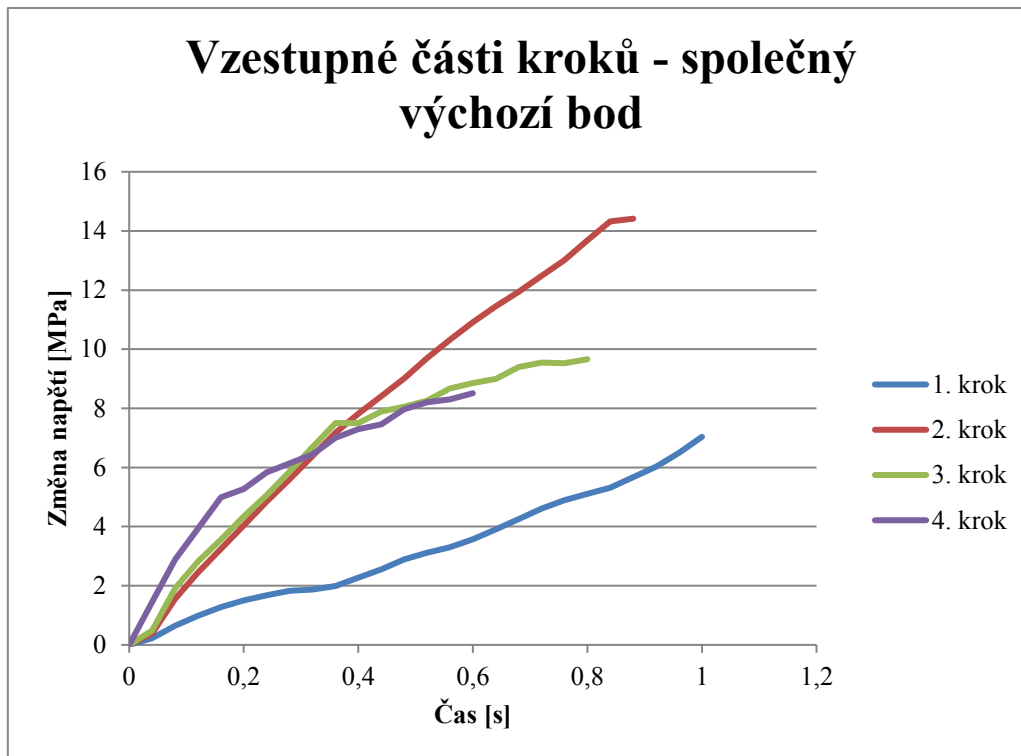
Graf 10 Křivka síly a délky vzorku v čase během krátkých kroků 0.1mm. Silová křivka je proložena lineární spojnicí trendu

Pokud na grafech pozorujeme silovou či napět'ovou reakci vzorku na změnu délky v čase, spatříme jeho opožděnou reakci. Z charakteru vzestupné části posledních tří kroků lze vidět strmý nárůst napětí. Jedná se o fázi zpevnění vzorku danou viskózním členem vzorku. Vliv viskozity se však zřejmě v určitém bodu vzestupné části křivky přestává uplatňovat a snižuje se strmost nárůstu napětí. Každý ze zobrazených kroků se však liší, pro přehlednost byla jejich vzestupná část zobrazena zvlášť (Graf 11).



Graf 11 Křivky vzestupných částí kroků

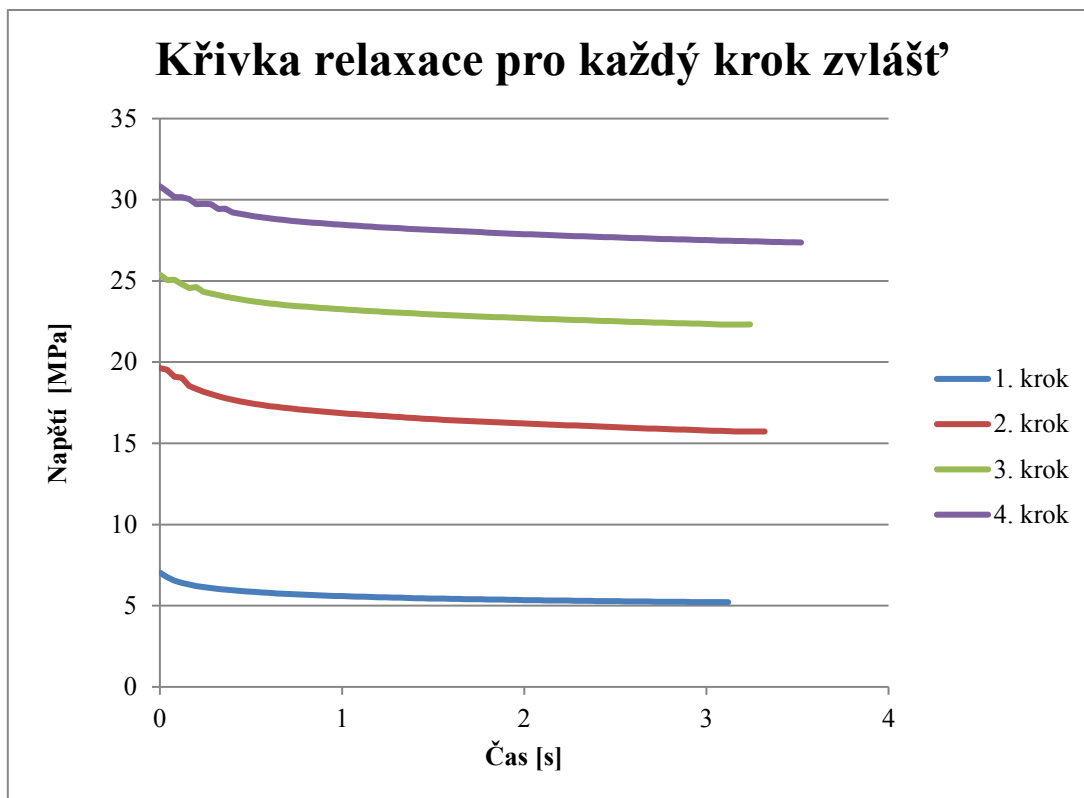
Konečný bod každé křivky v grafech značí nejvyšší dosažené napětí kroku. Z obou grafů je tedy patrné, že s rostoucím natažením vzorku klesal čas potřebný pro dosažení maxima. Pro sledování velikosti změny napětí kroků a jejich strmosti bylo vhodné přesunout počátek křivek na společný výchozí bod (Graf 12). Skoky napětí mezi kroky mají nelineární trend velikosti. V prvním kroku odpovídal vzorek nejnižší maximální napětíovou reakcí ze všech kroků a doba, kterou potřeboval pro dosažení maxima, byla naopak nejdelší. Ve druhém kroku vzorek odpověděl nejvyšší napětíovou reakcí ze všech tří kroků. Ve třetím a čtvrtém kroku již byla dosažená maxima nižší než ve druhém kroku.



Graf 12 Překrytí vzestupné části křivek po přesunutí jejich počátku na bod 0

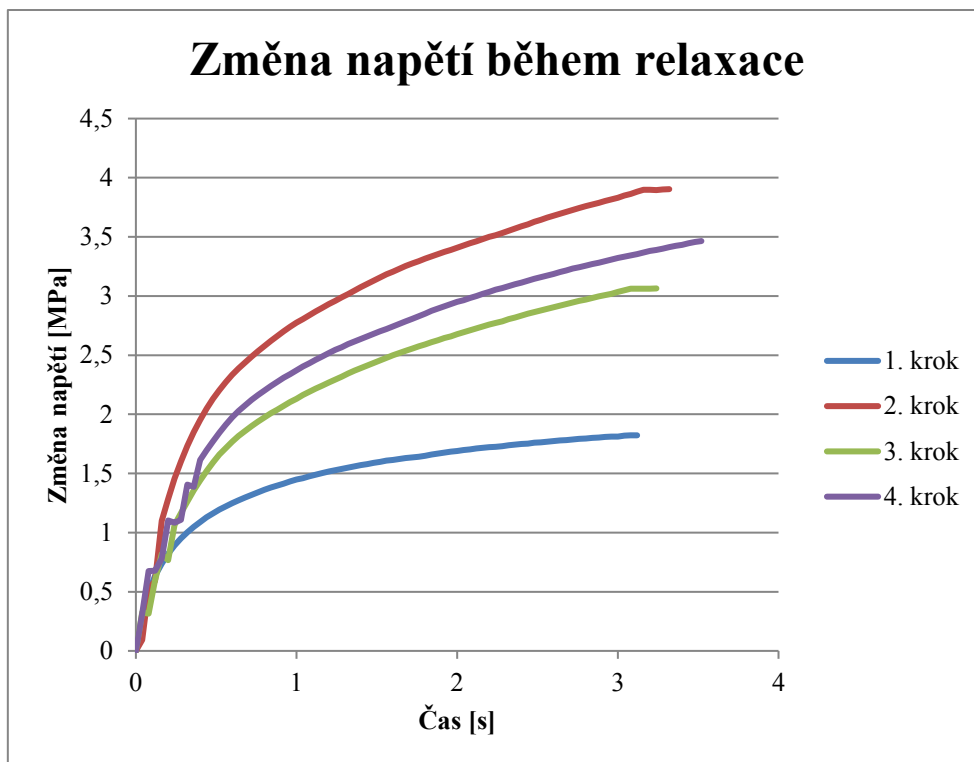
Vzhledem k odlišnosti charakteru křivek, velikosti maxima a doby potřebné pro jeho dosažení, lze uvažovat, že se vzrůstajícím prodloužením vzorku se mění vliv viskózního členu. Vzhledem k pozvolnému nárůstu napětí v prvním kroku se zřejmě uplatňuje nejméně. Naopak ve druhém kroku zřejmě nejvíce. Jak bylo uvedeno v předchozím textu, křivky se v určitém bodě lámou, přičemž na Graf 12 lze pozorovat, že se vzrůstajícím natažením vzorku přestává viskózní člen působit blíže počátku křivky. To je patrné zejména ve 3. a 4. kroku.

Jelikož se předpokládá, že za změnou charakteru křivek může především viskózní složka vzorku, bylo vhodné zhodnotit křivky relaxace. Na Graf 13 jsou zobrazeny relaxační křivky v absolutních hodnotách pro každý krok zvlášť. Konečná hodnota vzorku je minimální hodnota, na kterou mělo napětí možnost klesnout, než se objevil artefakt. Z grafu je patrné, že doba, po kterou mohla relaxace probíhat, se během kroků liší. Otázkou zůstává, na jaké úrovni napětí by se relaxační křivka vyrovnala do horizontály. Velikost napětí vzorku horizontálně probíhající křivky by odpovídala napětí definující převážně tuhost elastického členu.



Graf 13 Křivky relaxace každého kroku zvlášť

Z Graf 13 lze mimo odlišné zakončení křivky v čase zhodnotit také strmost počátečního úseku. Pro přehlednost byl průběh křivek invertován a jejich počátek byl posunut po svislé ose na bod 0 (Graf 14). Z průběhu křivek si lze všimnout, že skok poklesu napětí během relaxace se na jednotlivých úrovních natažení vzorku liší. První a druhý krok odpovídá prvnímu a druhému kroku vzestupné křivky ve smyslu nejvyšší a nejnižší skok v napětí. Nicméně skok u třetího kroku je nižší než u čtvrtého, což nekoresponduje s pořadím velikosti skoku ve vzestupné části kroku.

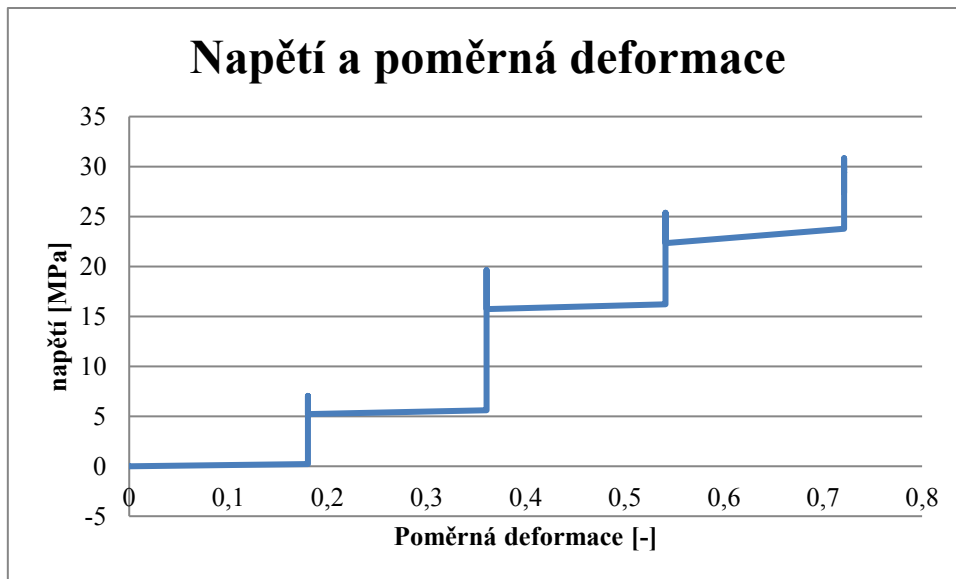


Graf 14 Invertovaná křivka napětí. Překrytí křivek je dosaženo posunutím jejich počátku na bod 0

Cílem tahové zkoušky byla snaha zjistit tuhost vzorku. Toho by bylo dosaženo vztahem pro výpočet Youngova modulu pružnosti:

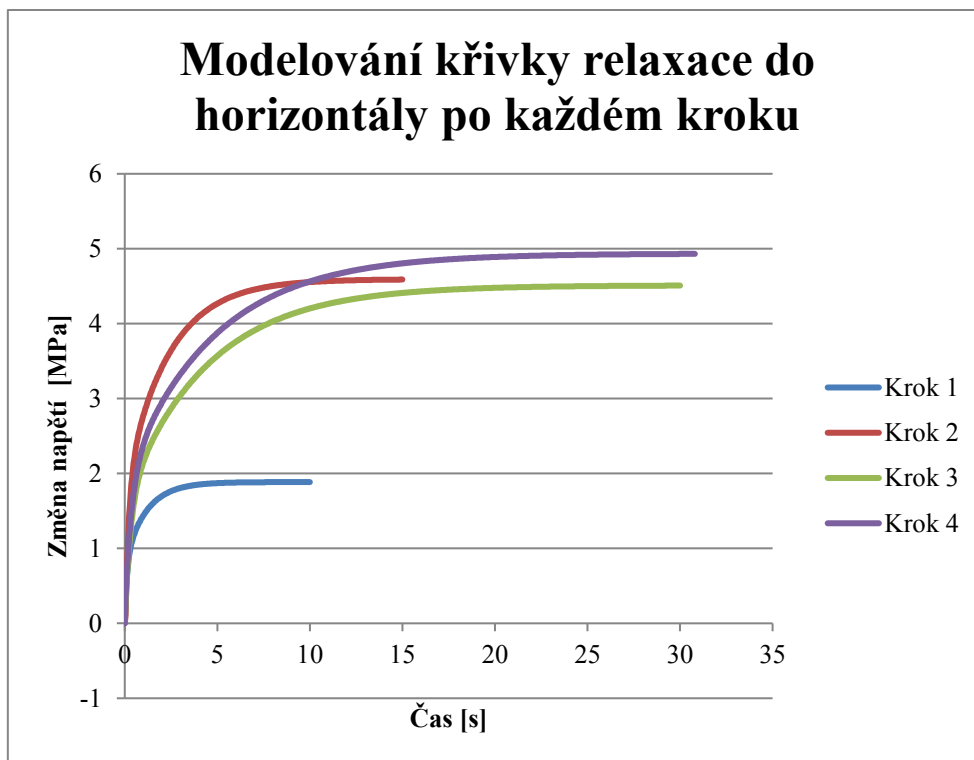
$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad [14]$$

Nicméně na Grafu 15 lze vidět skokový charakter křivky závislosti napětí a poměrné deformace. Tento charakter křivky je způsoben faktem, že údaje o vzdálenosti čelistí jsou softwarového původu, nikoliv zpětnovazebného. Skok o 1mm se tak uskutečnil mezi dvěma navazujícími datovými údaji. Při použití bodového grafu v MS Excell se veškerá změna napětí překrývá na jedné hodnotě poměrné formace. Posun křivky doprava odpovídá pouze dalšímu skoku poměrné deformace. Pro získání plynulé křivky poměrné deformace by bylo potřeba dopočítat plynulý nárůst vzdálenosti čelisti vztahený k rychlosti posunu čelistí. Tento způsob byl však po úvaze zavrhnut, jelikož výsledná tuhost viskoelastické tkáně by byla poplatná právě této rychlosti a nebrala by v úvahu jiné možné rychlosti zatížení.



Graf 15 Překrytí křivky napětí během skokové softwarové změny vzdálenosti čelistí na bodovém grafu

Jelikož nebyly známy hodnoty pozvolné poměrné deformace během vzestupné části křivek, nemohl být použit výpočet č. [14]. Pro zjištění tuhosti vzorků tak bylo využito vymodelování vystřiženého úseku křivek relaxace. Udržované napětí po vyprchání vlivu viskózního členu v ustálené části křivky by tak (jak bylo zmíněno výše) odpovídala tuhosti elastického členu. Modelování vystřižených úseků, bylo provedeno proložení každé z křivek exponenciálami. Modelované křivky relaxace pro každý krok jsou zobrazeny na Graf 16.



Graf 16 Výsledek modelování pomocí proložení křivek relaxace exponenciálami

Pro zjištění hodnot tuhosti, byl využit rozdíl mezi nejnižšími dosaženými hodnotami napětí během relaxace z vymodelovaných křivek. Nejnižší hodnota byla zvolena v místě, ve kterém nebyl pokles napětí téměř patrný.

Po vymodelování každé z křivek na Graf 16, jsme tyto data křivek invertovali na sestupný charakter a zrušili jejich společný počátek. Tato úprava byla nutná pro práci s absolutními hodnotami. Velikost napětí dvou sousedních kroků z horizontálních oblastí byla od sebe odečtena a tím jsme získaly skok napětí elastického členu mezi dvěma kroky.

Vzniklý rozdíl $\Delta\sigma$ byl vydělen změnou poměrné deformace $\Delta\varepsilon$ jednoho skoku. Tato matematická operace tedy využívá vztahu pro výpočet Youngova modulu:

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon}$$

Získané hodnoty jednotlivých vzorků jsou uvedeny v kapitole 7.2

7 Výsledky

7.1 Porovnání vzorků odlišné anatomické lokalizace u PEC na SHG snímcích

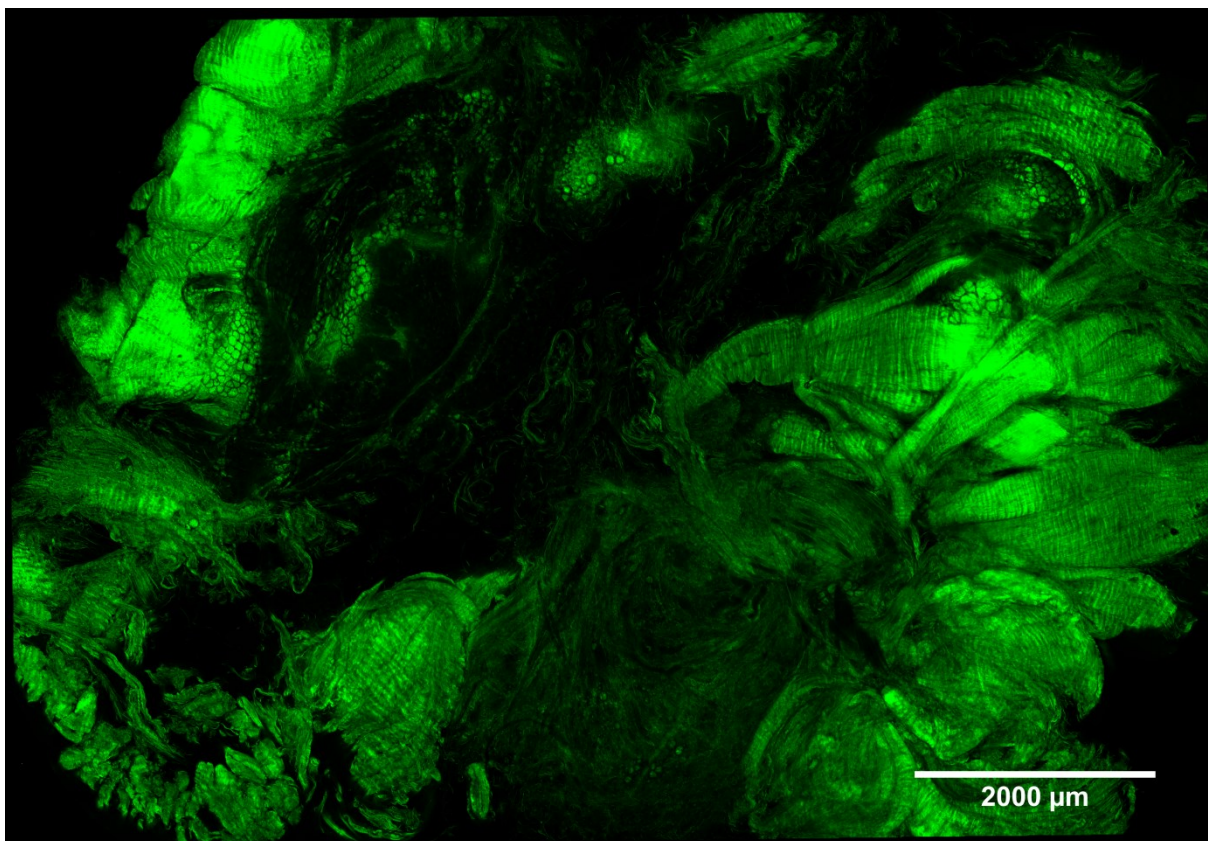
7.1.1 Klidový stav

Na obr. 27 a 28 je zobrazen vzorek 1 vcelku ze dvou stran před zmrazením. Na snímcích je možno vidět okrsky vlnitého vzoru kolagenní struktury, tukovou tkáň a vláknité struktury, které na některých místech vyčnívají do prostoru.

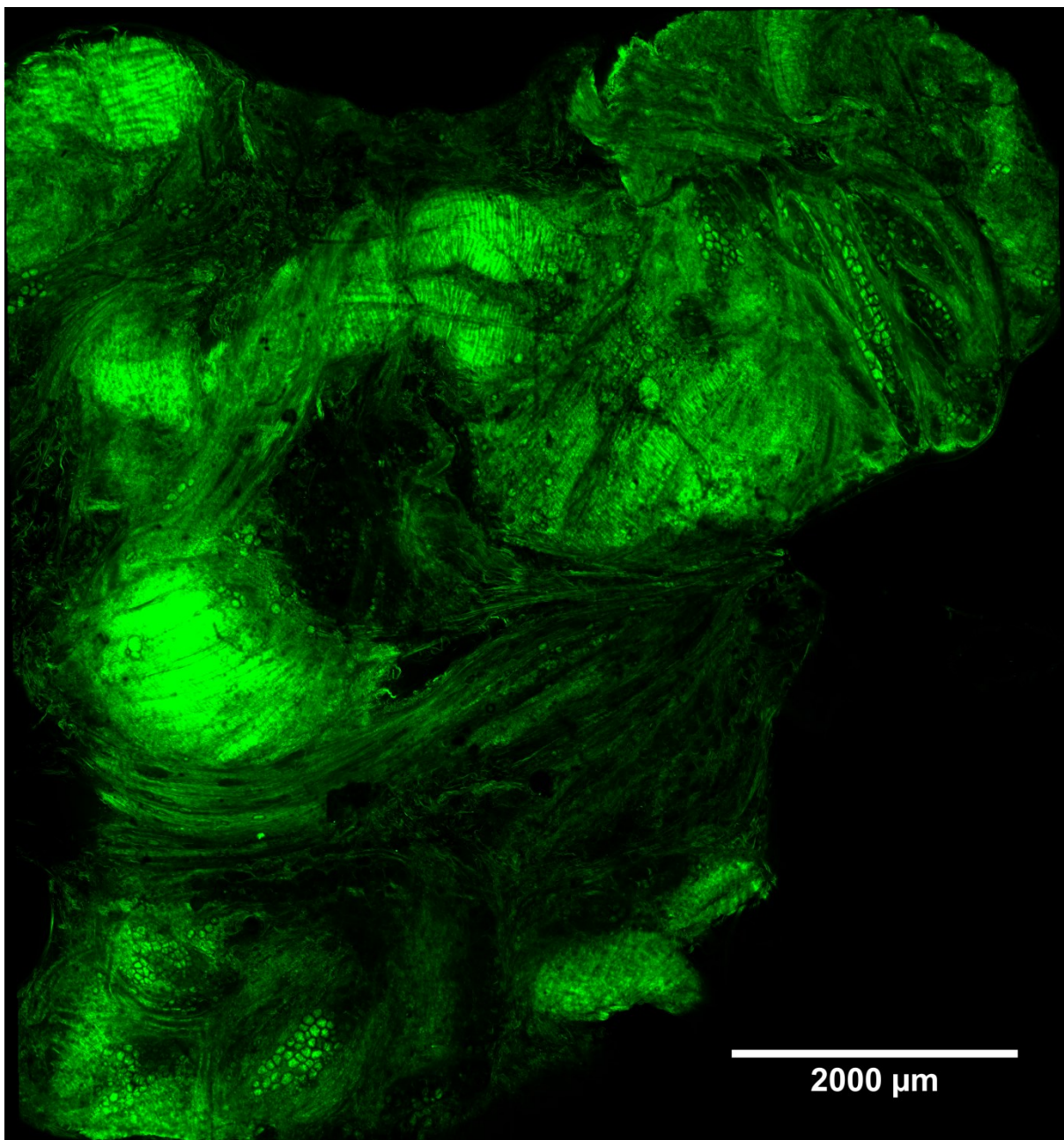
Na obr. 29 je pro porovnání zobrazen vzorek 3 vcelku také ze dvou stran a před zmrazením. Na snímku jsou přítomny okrsky vlnitého vzorku kolagenní struktury, vláknité vyčnívající i nevyčnívající struktury. Tuková tkáň není téměř patrna.

Oba vzorky jsou na rozdíl od dalších snímků pootočeny o 90° vlevo vzhledem k podélné ose končetiny.

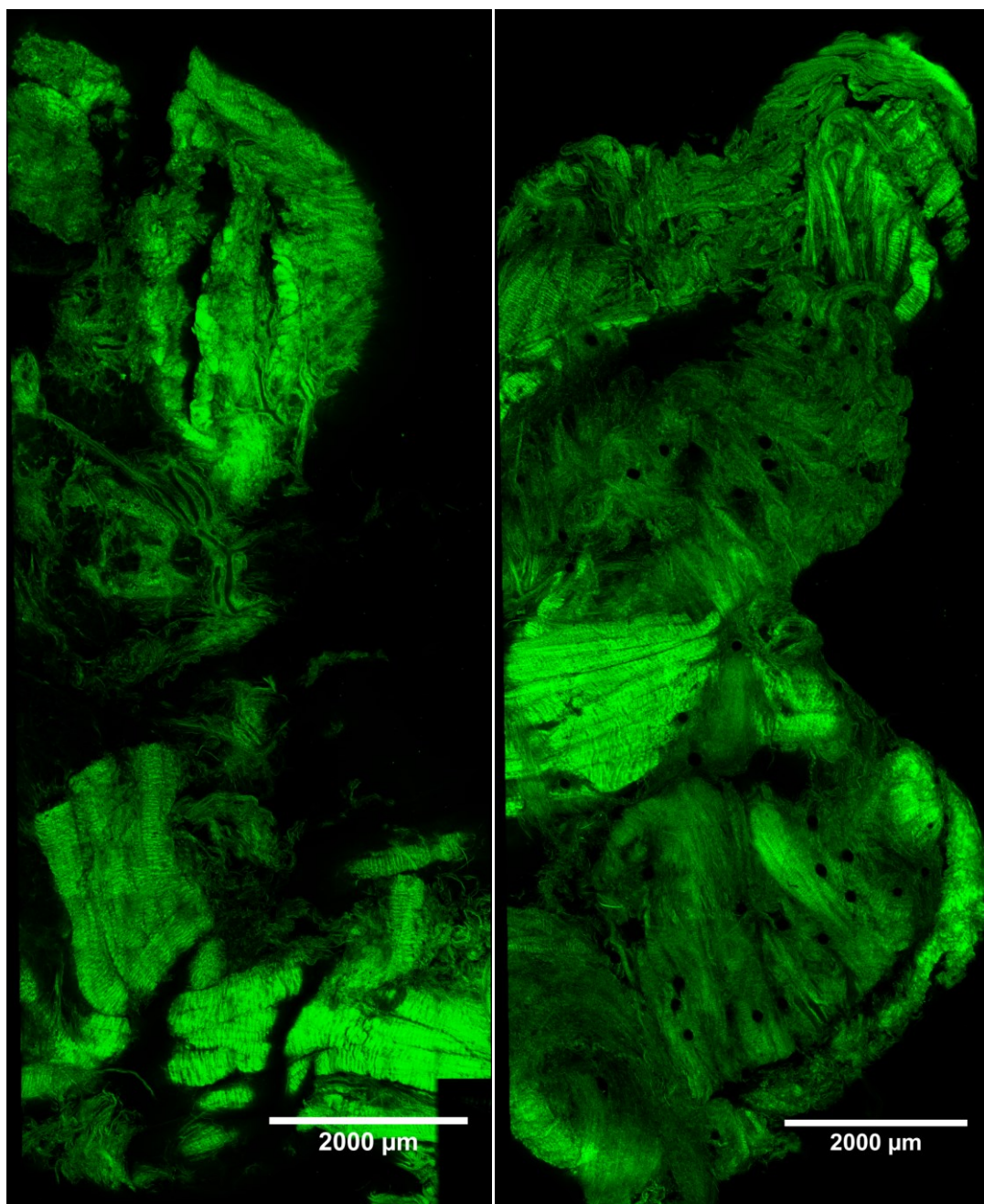
Makroskopické snímky vzorků 1 a 3 po rozmrazení jsou zobrazeny na obr. 30A,B.



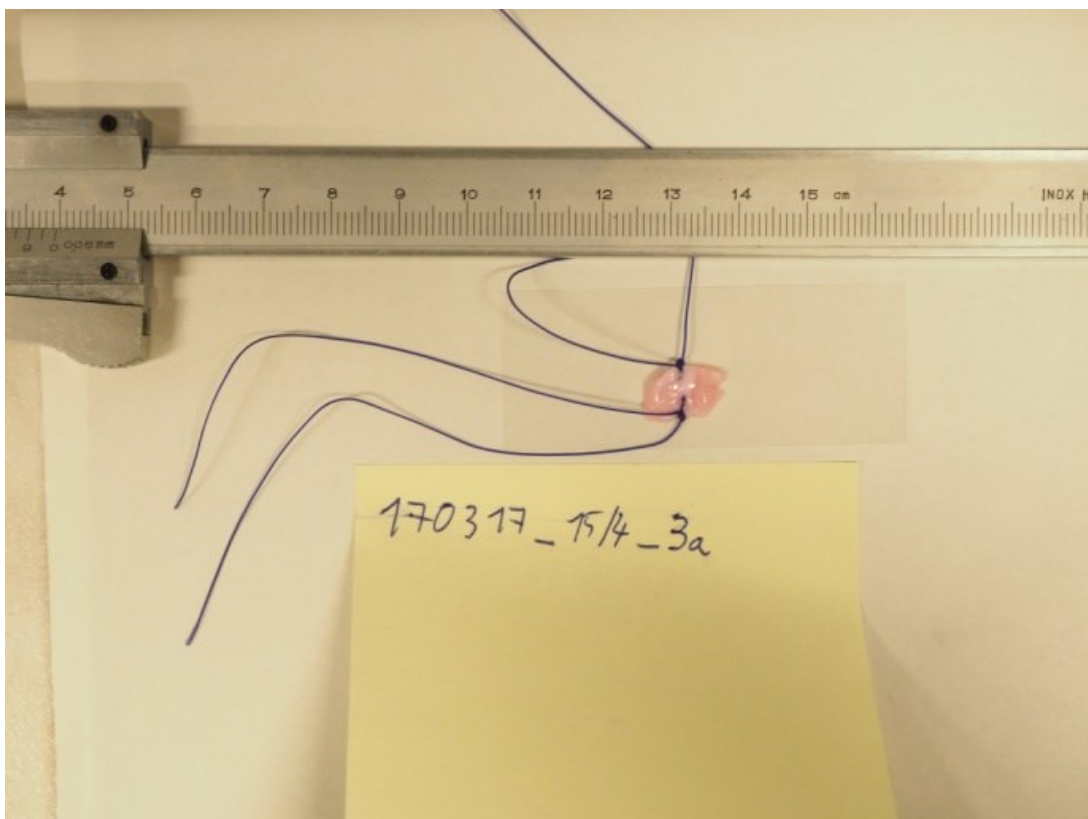
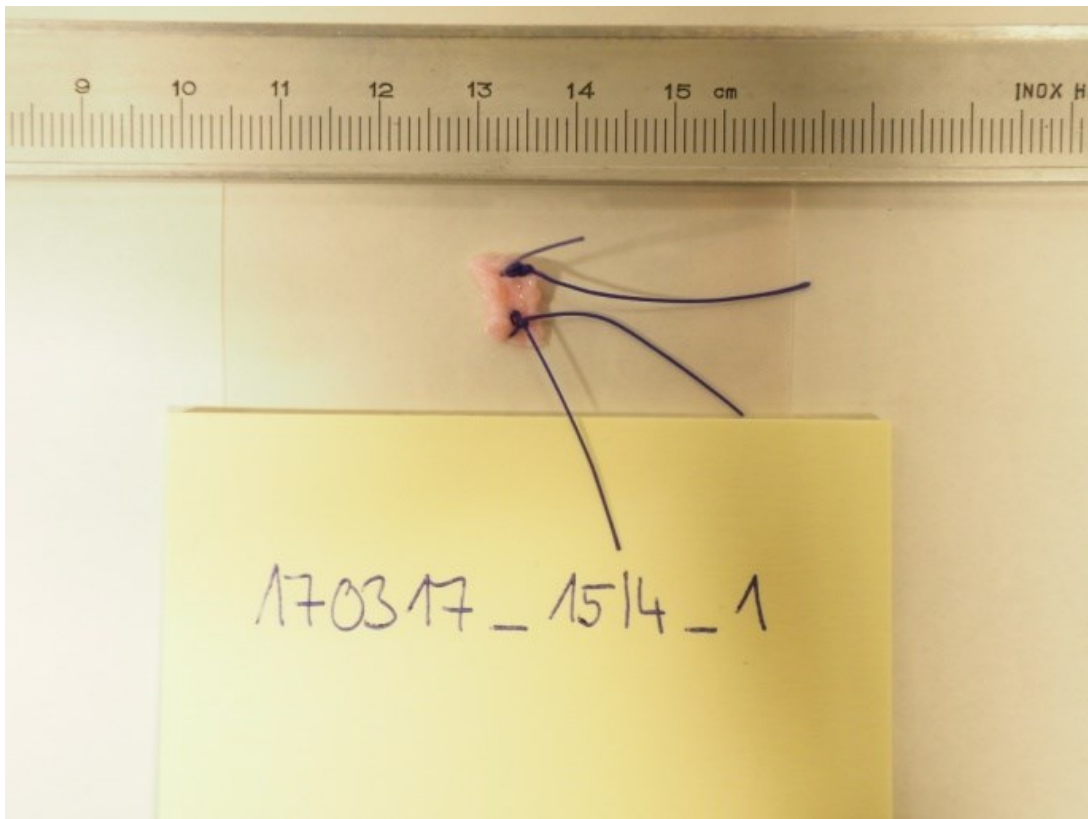
Obrázek 27 Vzorek 1 vcelku před zmrazením



Obrázek 28 Vzorek 1 vcelku před zmrazením - odvrácená strana



Obrázek 29 Vzorek 3 vcelku ze dvou odvrácených stran před zmrazením



Obrázek 30 A) nahoře: fotografie vzorku 1 vcelku B) dole: fotografie vzorku 3 vcelku (označení 3a na snímku je připraveno pro první polovinu tohoto vzorku)

7.1.2 Reakce na tah

V této kapitole jsou demonstrovány reakce vzorků na jednoosé zatížení v tahu. Snímky série krátkých a dlouhých kroků jsou popisovány slovně. Na sérii dlouhých kroků byla navíc z metodických účelů provedena ruční měření vybraných parametrů. Jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulkách.

Na obr. 31 jsou zobrazeny snímky vzorků ve třech stupních deformace během série krátkých kroků zátěže. První snímek (vlevo) vždy reprezentuje výchozí stav, druhý snímek polovinu série a třetí snímek reprezentuje stav na konci série. Řazení vzorků 1a, 1b, 3a, 3b je od shora dolů. V levém horním rohu je uvedena skutečná vzdálenost čelistí testeru v mm a prodloužení této vzdálenosti v %. Pro přehlednost jsou snímky všech vzorků zobrazeny na další straně společně.

Číselné hodnoty na snímcích značí vzdálenost čelistí v mm. Procentuální hodnota potom změnu od původní vzdálenosti.

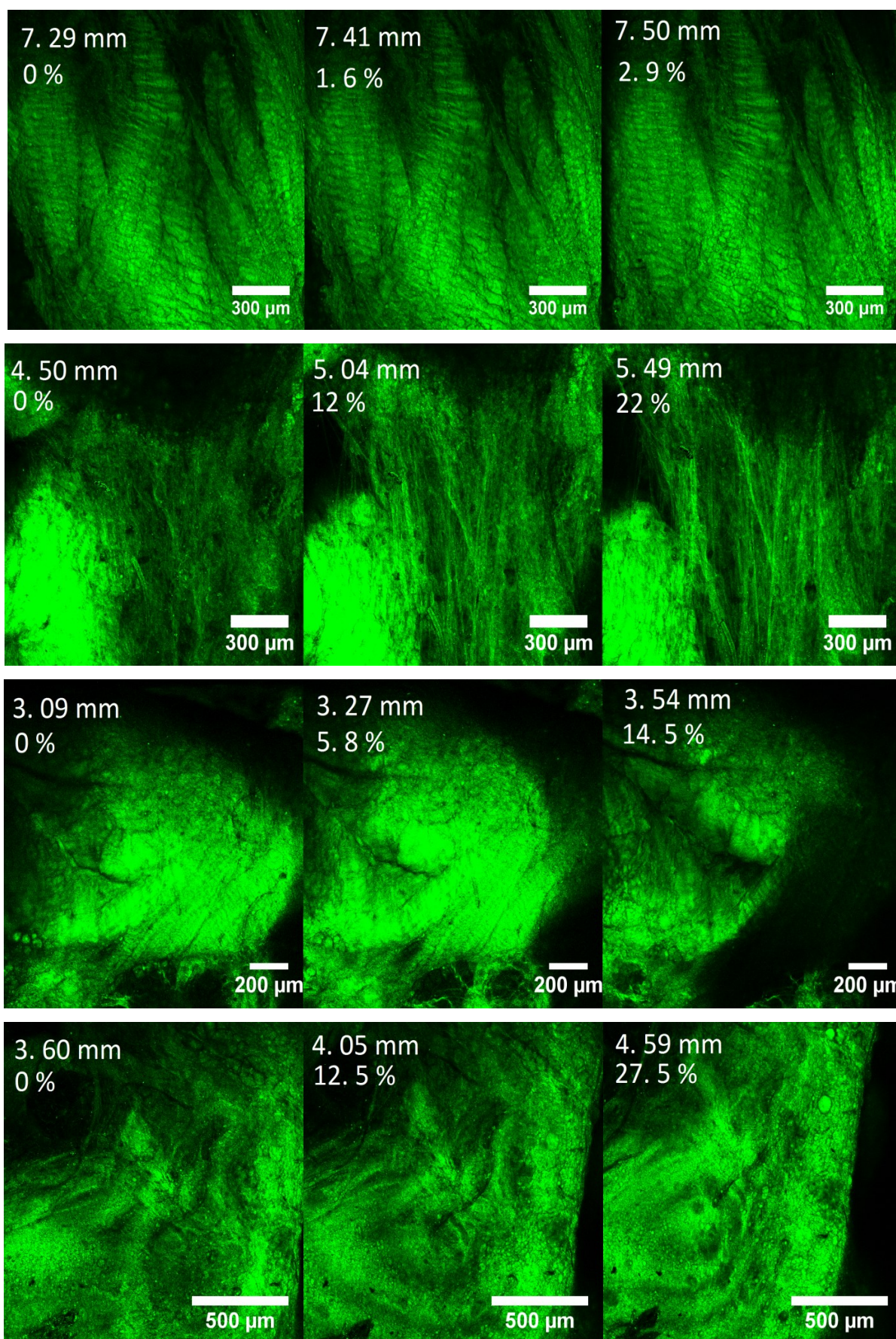
Komentář k sérii krátkých kroků:

Vzorek 1a: Na snímcích lze spatřit čitelný vlnitý vzor kolagenní tkáně. V průběhu prodloužení o 2.9 % si tkáň zachovává charakter.

Vzorek 1b: Na snímcích je patrna vlnitá kolagenní struktura v přesvětlené oblasti. Během 22% prodloužení se uprostřed struktury snímku objevují napínající se kolagenní struktury.

Vzorek 3a: V průběhu 14.5 % prodloužení se mění především čitelnost jednotlivých okrsků. Tmavé zářezy na snímku reprezentují cévní zásobení vzorku (viz. dále).

Vzorek 3b: Na snímcích lze pozorovat vzdalování vzorku od pravého okraje snímku. Zvyšuje se výraznost některých struktur. Směr pohybu čitelných struktur vzorku během deformace směřuje k hornímu okraji snímku.



Obrázek 31 Reakce vzorků na deformaci v sérii krátkých kroků (0.1mm). Od shora vzorky 1a, 1b, 3a, 3b. První snímek reprezentuje stav po upnutí do čelistí, druhý stav v polovině série a třetí stav na konci série

Komentář k sérii dlouhých kroků (obrázek 32 a 33):

Vzorek **1a**: Tkáň si zachovává v průběhu deformace svůj původní charakter. Lze spatřit příčnou deformaci vzorku. Tmavá oblast v horním okraji snímku je čelist testeru.

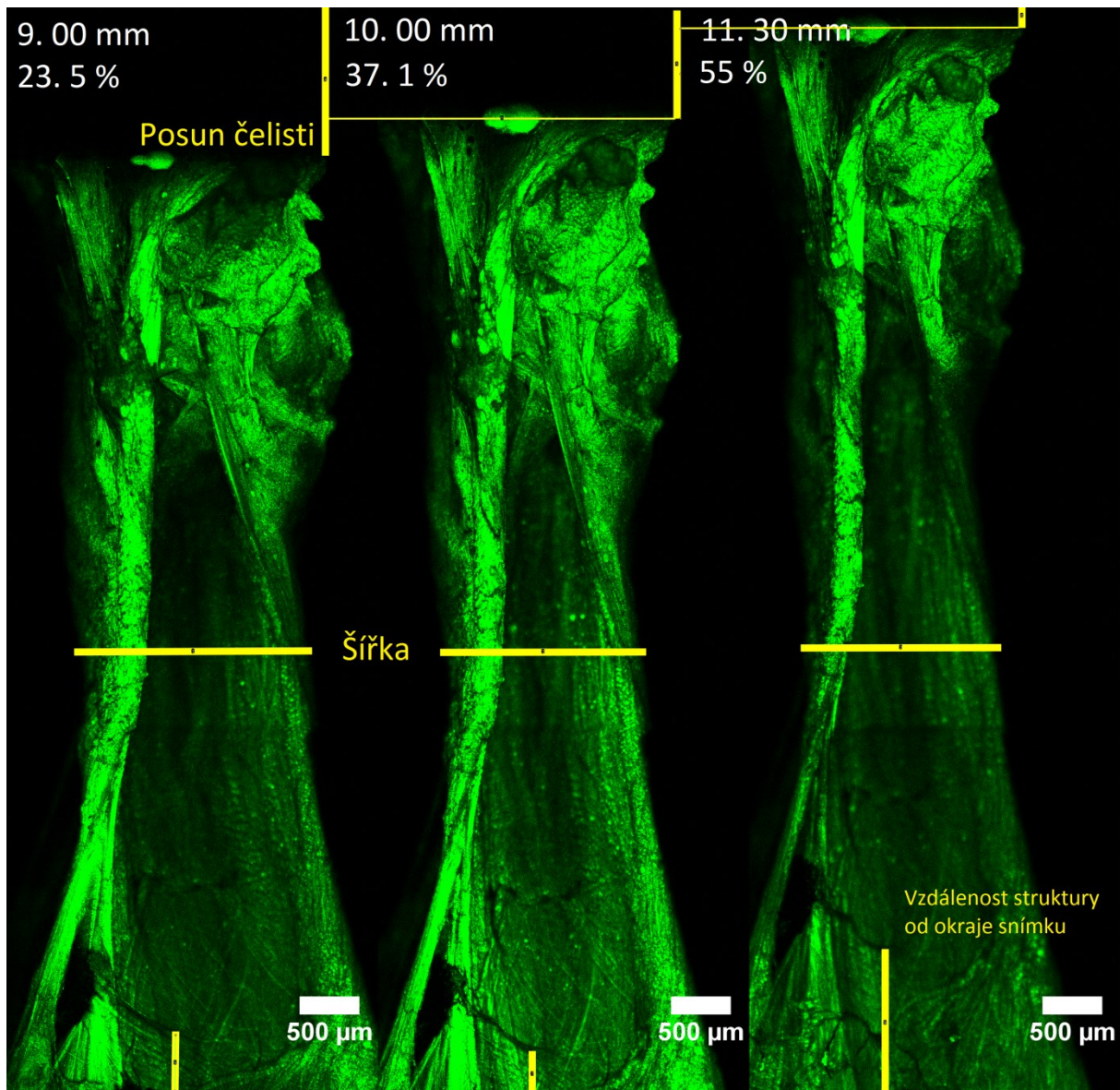
Vzorek **1b**: Během deformace lze spatřit napínající se vláknitou strukturu ve střední třetině vzorku. Příčná deformace struktury probíhá rovnoměrně podél celého vzorku. Tkáň si v průběhu deformace zachovává původní charakter.

Vzorek **3a**: Reakce vzorku na deformaci je charakterizována napnutím části vzorku, která v průběhu deformace získá vláknitý vzhled. Vlákenný charakter tkáně se stává v průběhu deformace výraznějším. Od počátečního stavu tak vzorek výrazně mění charakter.

Vzorek **3b**: Na snímku je patrna tkáň s výraznými útvary. Tyto útvary v průběhu deformace mění směr, tloušťku a polohu. Tkáň si během deformace udržuje původní charakter. V horním okraji snímku lze pozorovat čelist.

Žluté značení na snímcích symbolizuje místa ručního měření vybraných oblastí zájmu v programu Fiji. Řazení vzorků 1a, 1b, 3a a 3b je stejné jako u předchozí série. Snímky vzorku 1a jsou z důvodu jejich velikosti zobrazeny zvlášť na další straně. Potom následují naměřená data vzorku 1a a po nich jsou zobrazeny snímky vzorků 1b, 3a a 3b společně.

Na obrázku 15 je zobrazen vzorek č. 1a ve třech úrovních deformace. První snímek na úrovni natažení 23.5 % původní vzdálenosti čelistí. Změna délky čelistí mezi snímky je celkem 31.5 %.



Obrázek 32 Reakce vzorku 1a na deformaci v sérii dlouhých kroků (1mm). Vlevo stav po ukončení série krátkých kroků, uprostřed stav v polovině série dlouhých kroků a vpravo stav na konci série dlouhých kroků

V Tabulce č. 1 jsou uvedeny naměřené délkové hodnoty vzorku 1a v mm (zaokrouhлено na setiny). Šíře vzorku je v tomto případě měřena na přibližně stejných souřadnicích snímku. Další měřené hodnoty u vzorku 1a jsou: vzdálenost čelistí od horního okraje snímku, vzdálenost čelistí sousedních snímků po na vertikální ose, vzdálenost vybrané struktury od spodního okraje snímku. Čísla snímků v tabulce (1, 2, 3) jsou počítány z levé strany.

Tabulka 1 Naměřené délkové hodnoty vzorku 1a

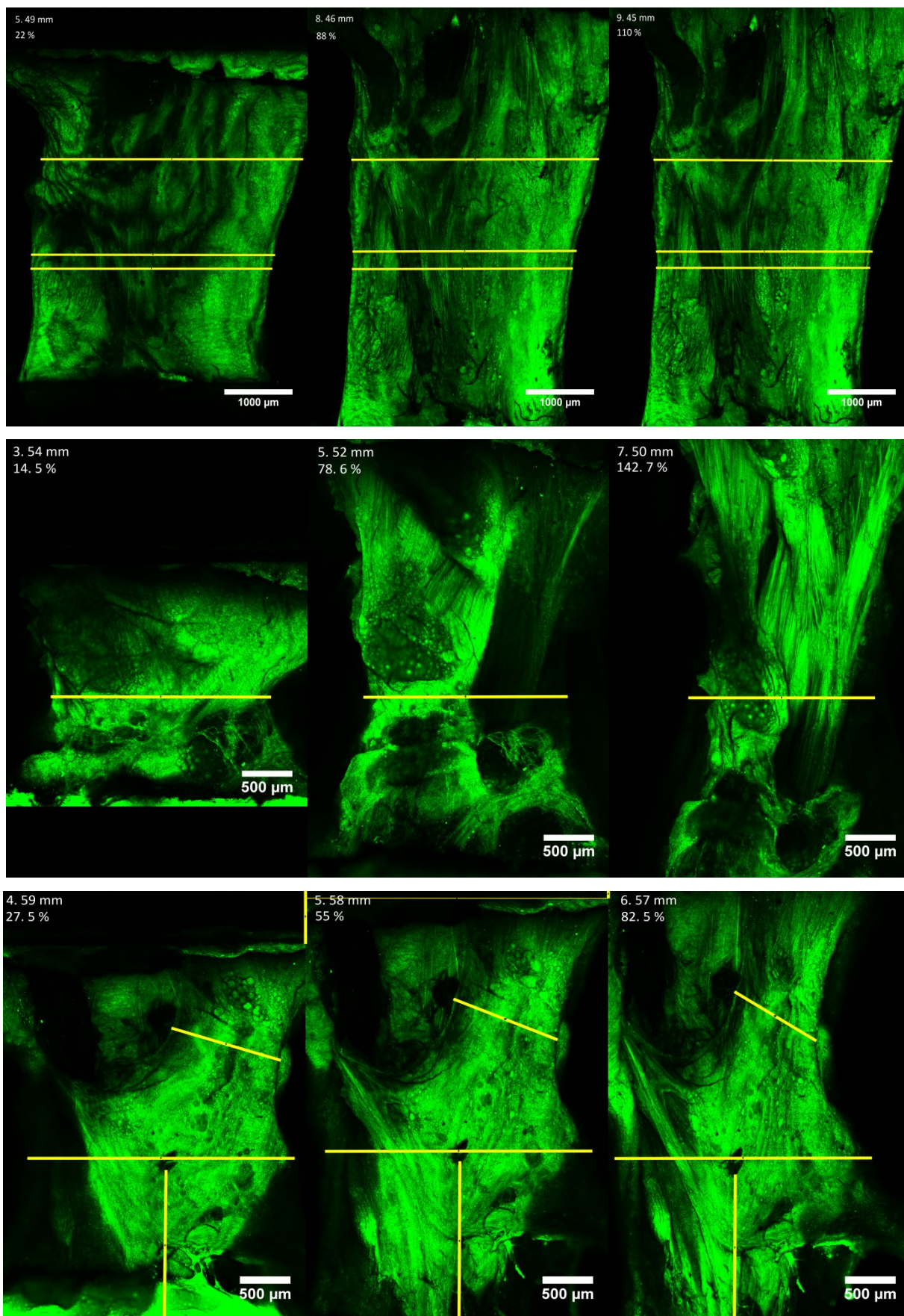
Snímek č.	Šíře vzorku [mm]	Vzdálenost čelisti od okraje snímku [mm]	Posun čelisti mezi snímky [mm]	Vzdálenost struktury od okraje snímku [mm]
1	1,92	1,2	x	0,47
2	1,66	0,84	0,3	0,33
3	1,61	0,14	0,74	1,17

Změny měřených vzdáleností a změny skutečné vzdálenosti čelistí (datového původu) jsou uvedeny v Tabulce č. 2. Rozdíl měřených hodnot byl vždy vynásoben dvěma, jelikož změny délky čelistí testeru je dosaženo pohybem obou čelistí. Délka kroku je tedy součtem ušlé vzdálenosti obou čelistí.

Tabulka 2 Skutečný a měřený posun čelistí a pohyb struktury vzorek 1a

Snímek č.	Rozdíl datové vzdálenosti čelistí [mm]	Rozdíl vzdálenosti čelisti k okraji snímku [mm] (x2)	Posun čelisti mezi snímky [mm] (x 2)	Rozdíl vzdálenosti struktury k okraji snímku [mm] (x2)
1	x	x	x	x
2	1	0,73	0,6	0,28
3	1,3	1,4	1,48	(změna směru) 1,68

Na obr. 34 jsou zobrazeny reakce vzorků na větší deformace. Levé snímky jsou vždy prvním snímkem ze série skenování, který umožnil porovnání stejné oblasti vzorku v různých stupních deformace. V tomto případě se vždy jedná o snímek před sérií dlouhých kroků. Druhý snímek reprezentuje střed série, a poslední snímek konečný stav. Vzorek č. 3b jako jediný obsahuje snímky tři po sobě jdoucích kroků o změně délky čelistí 1mm. Řazení vzorků je stejné jako u obr. 32 od shora dolů.



Obrázek 33 Reakce vzorků na deformaci v sérii dlouhých kroků (1mm). Od shora vzorky 1b, 3a, 3b. První snímek reprezentuje stav po upnutí do čelistí, druhý stav v polovině série a třetí stav na konci série

U vzorku 3b byla rovněž jako u vzorku 1a změřena vzdálenost čelistí od okraje snímku a vzdálenost čelistí mezi snímky. Vertikální linie reprezentuje vzdálenost vybrané struktury od spodního okraje snímku. Navíc byla změřena vzdálenost dvou struktur vzorku, jejichž spojnice protíná malý svazek napínající se tkáň. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3 Naměřené hodnoty u vzorku 3b

Snímek č.	Šíře vzorku [mm]	Vzdálenost čelistí od okraje snímku [mm]	Posun čelistí mezi snímky [mm]	Vzdálenost struktury od okraje snímku [mm]	Šířka svazku [mm]
1	2,61	0,53	x	1,53	1,1
2	2,61	0,06	0,46	1,62	1,08
3	2,51	x	x	1,48	0,92

Stejně jako u vzorku 1a jsou u vzorku 3b změny měřených vzdáleností a změny skutečné délky čelistí uvedeny v Tabulce č. 4.

Tabulka 4 Skutečný a měřený posun čelistí a pohyb struktury vzorek 3b

Snímek č.	Rozdíl datové vzdálenosti čelistí [mm]	Rozdíl vzdálenosti čelistí k okraji snímku [mm] (x2)	Posun čelistí mezi snímky [mm] (x 2)	Rozdíl vzdálenosti struktury k okraji snímku [mm] (x2)
1	0,99	X	x	x
2	0,99	0,94	0,92	0,02
3	0,99	X	x	0,16

V tabulce č. 5 je demonstrována procentuální změna šíře celého vzorku 3b a šíře vybraného svazku tkáň.

Tabulka 5 Porovnání procentuální změny šíře vzorku a vybrané struktury

Šíře	Změna šíře mezi snímky 1 a 3 [%]
Celková	3,9
Svazku	19,5

U vzorku 1b a 3a byla napříč snímky měřena pouze šíře. U vzorku 3a byla měřena na třech místech. První míra byla změřena mimo střed snímku a dvě míry poblíž středu snímku. V Tabulce č. 6 jsou uvedeny procentuální změny šíře vzhledem k hodnotě na snímku č. 1. Hodnoty naměřených šířek vzorků 1b a 3a jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.

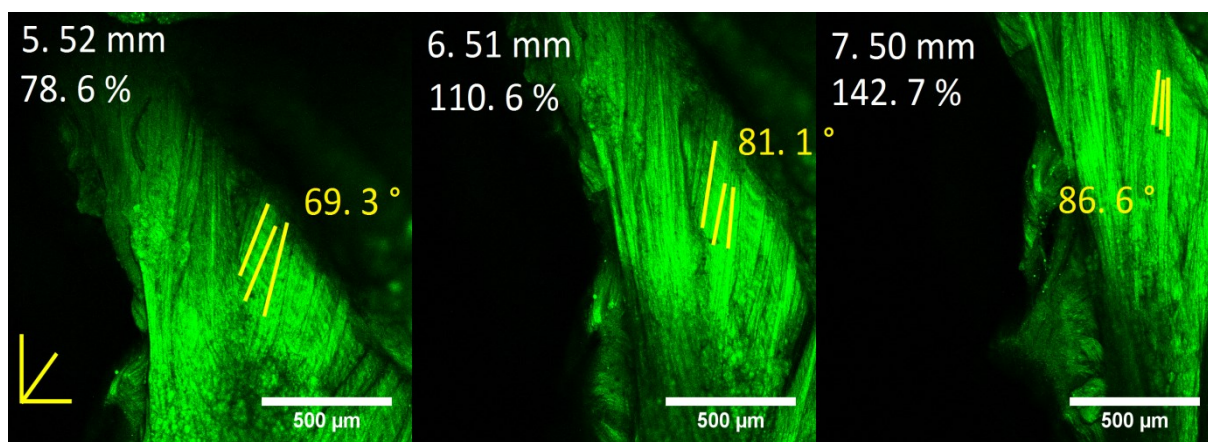
Tabulka 6 Naměřené šířkové rozměry vzorku 3a

Snímek č.	Šíře vzorku [mm]
1	2,61
2	1,99
3	1,81

Tabulka 7 Naměřené šířkové rozměry a jejich změna v průběhu deformace u vzorku 1b

Snímek č.	Horní šířka vzorku [mm]	Změna šířky od původní hodnoty [%]
1	3,51	x
2	3,2	9,6
3	3,11	12,8
Snímek č.	Střední šířka vzorku horní [mm]	
1	3,55	x
2	3,25	9,2
3	3,15	12,6
Snímek č.	Střední šířka vzorku dolní [mm]	
1	3,82	x
2	3,5	9,1
3	3,47	10

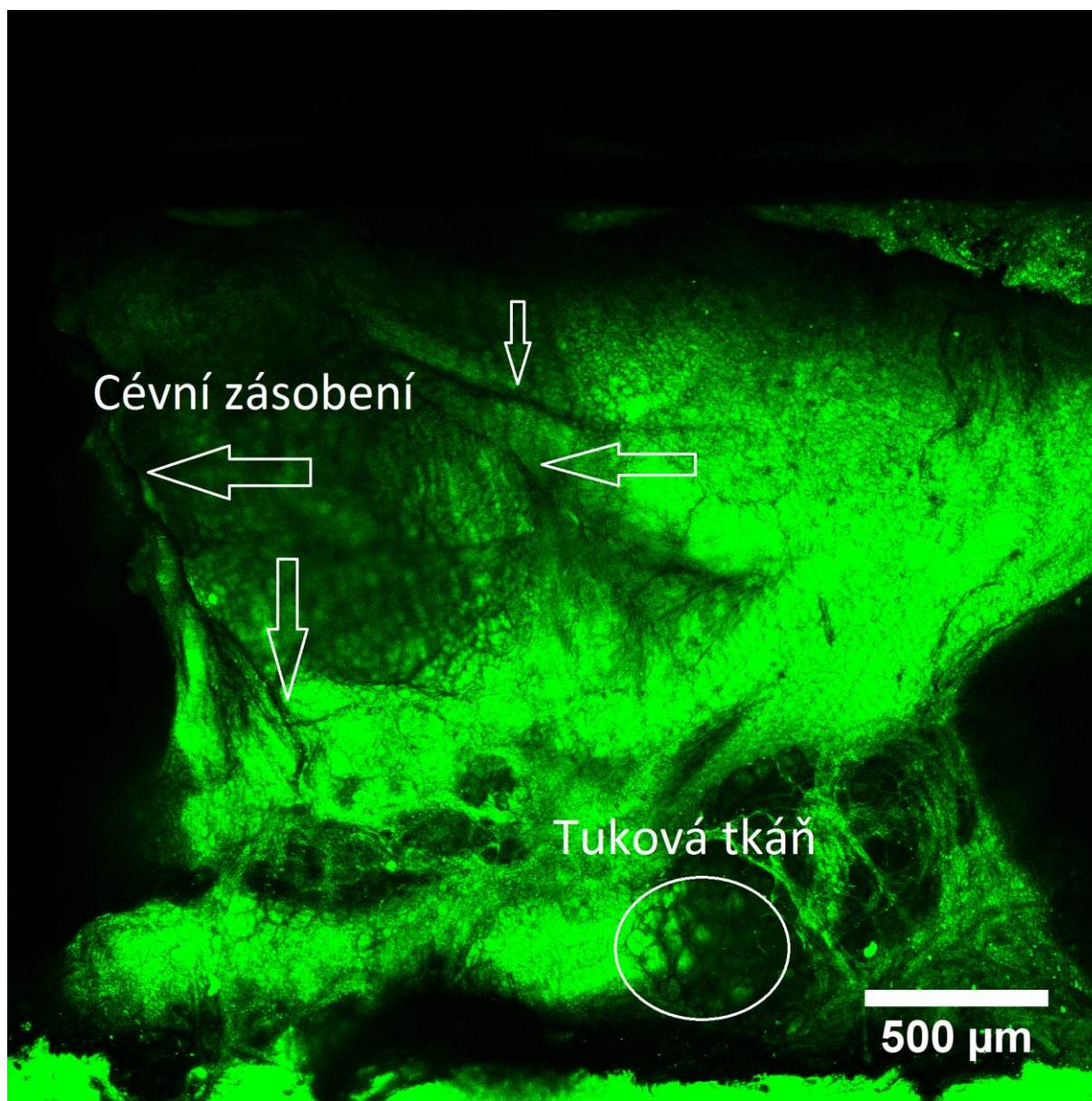
Ruční měření úhlové orientace vybrané vláknité struktury tkáně v různých stupních prodloužení, bylo provedeno na vzorku 3a. Na obr. 34 jsou zvýrazněny vždy tři linie, které byly na původních snímcích jasně patrné. Uvedená hodnota na snímku je průměrnou hodnotou úhlu všech tří přímků ve stupních.



Obrázek 34 Vzorek 3a. Změna orientace vláken vzorku ve třech úrovních natažení. Stupně jsou průměrnou hodnotou ze třech přímků. Úhel je počítán od horizontály proti směru hodinových ručiček

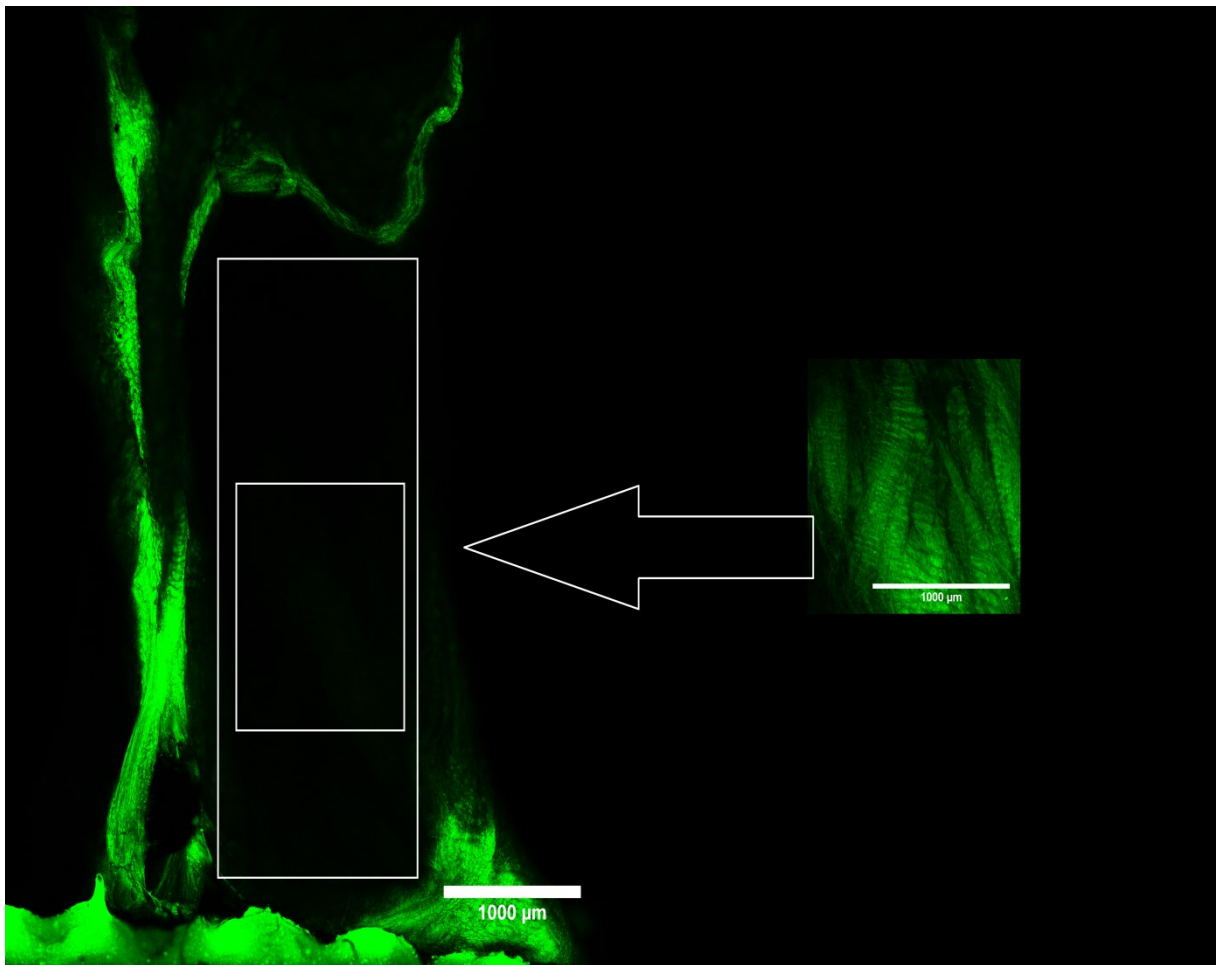
7.1.3 Vybrané snímky pro účely diskuze

Na obr. 36 lze vidět cévní zásobení tkáně a tukovou tkáň.

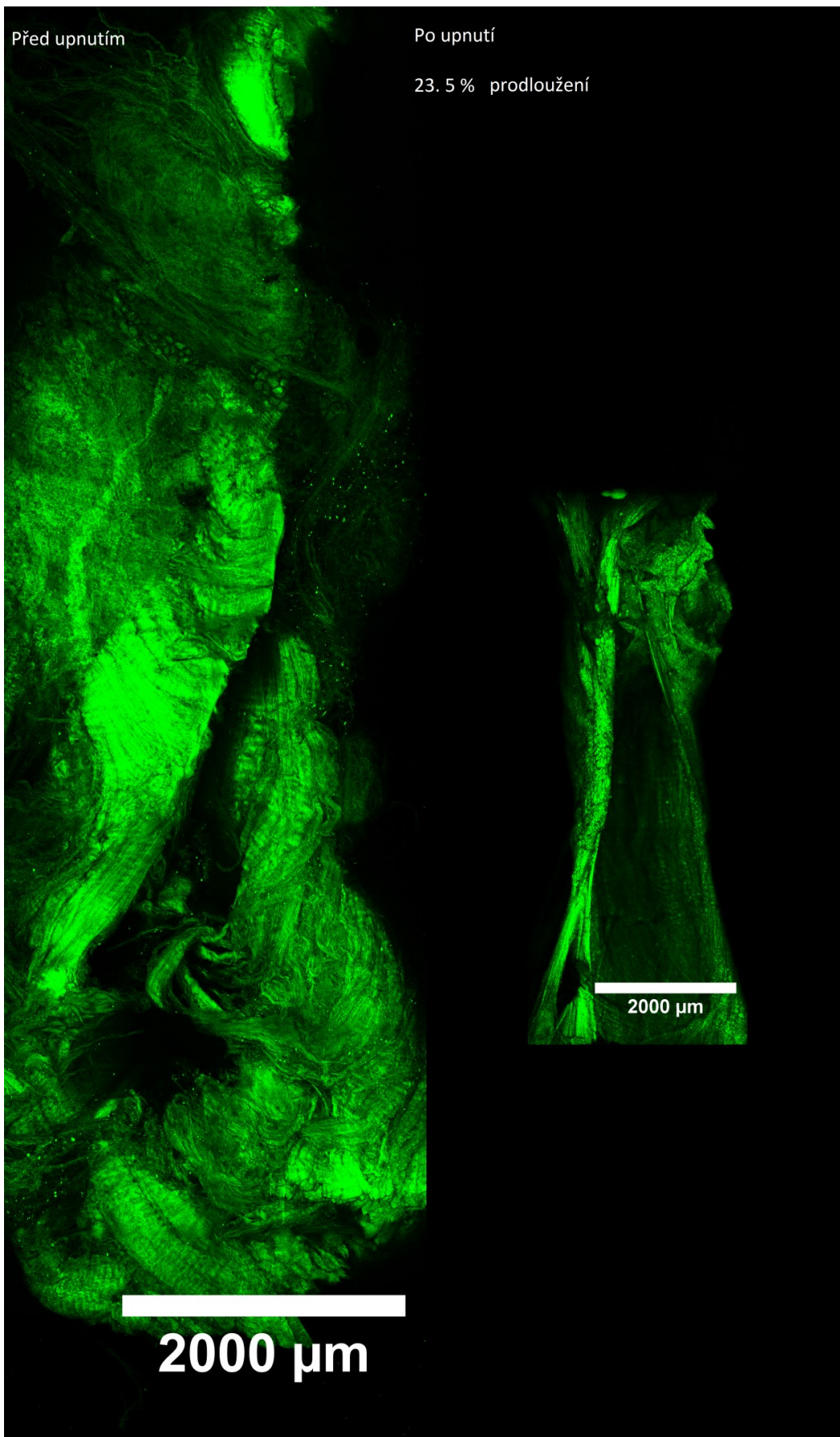


Obrázek 35 Tuková tkáň a cévní zásobení tkáně

Na obr. 37A,B je zobrazeno prověšení vzorku 1a těsně po upnutí do čelistí. Menší pravý obrázek reprezentuje snímek z centra, který byl ručně doostřen. Snímání této oblasti probíhalo u tohoto vzorku po celou sérii krátkých kroků. Pro srovnání vzhledu vzorku 1a před upnutím a po upnutí, byl vybrán snímek vzorku v klidovém stavu na sklíčku po rozříznutí a celkový pohled na vzorek v prodloužení o 23.5 % (obr. 38A,B).



Obrázek 36 A) vlevo: prověšení vzorku v čelistech. Střed vzorku mimo rovinu zaostření. B) vpravo: doostření středu vzorku

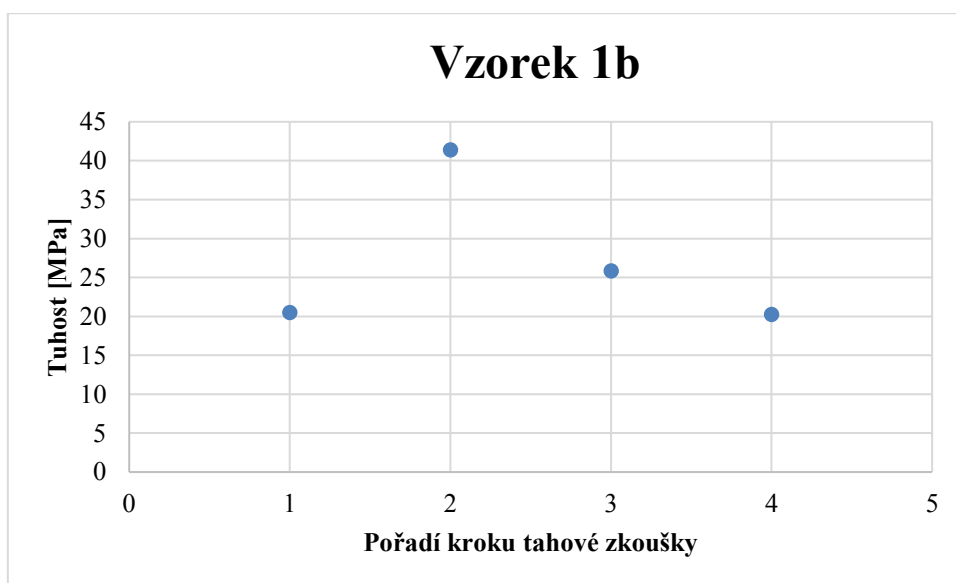


Obrázek 37 A) vlevo: Snímek vzorku 1a před upnutím. B) vpravo: snímek vzorku 1a po natažení o 23.5 %

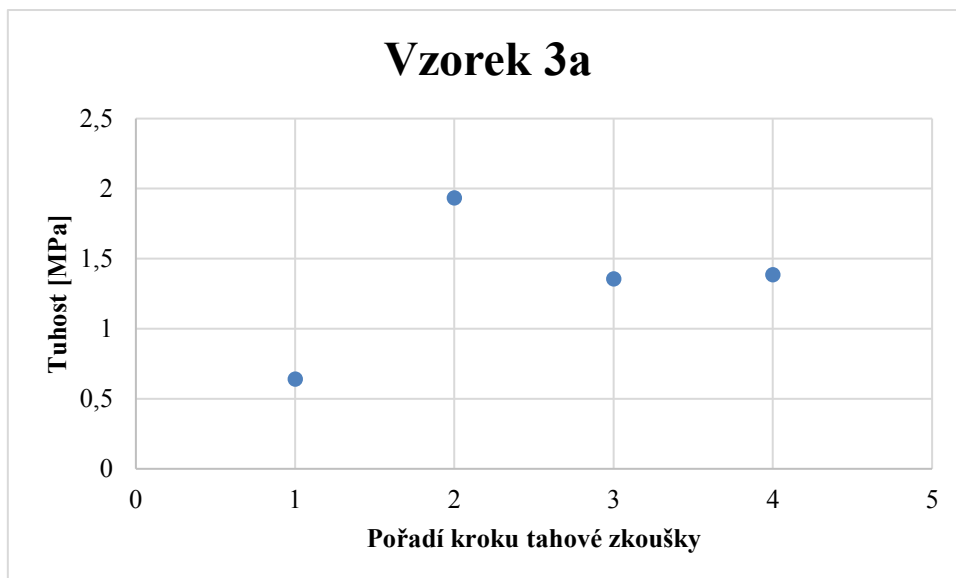
7.2 Porovnání vzorků z dat tahové zkoušky

V této kapitole jsou prezentovány zjištěné hodnoty tuhosti vzorků během tahových zkoušek na grafech. Vyhodnocení proběhlo na vzorcích 1a, 3a a 3b dle metodiky popsané v kapitole 6.2. Hodnoty jsou nejprve prezentovány v Grafech 17, 18 a 19 pro každý vzorek zvlášť. Následuje Graf 20 porovnávající absolutní hodnoty vzorků 3a a 3b. Na konci této kapitoly je uveden Graf 21 porovnávající zjištěné hodnoty mezi vzorkem 1b a 3b v absolutních hodnotách. Následuje stručná popis chování vzorků:

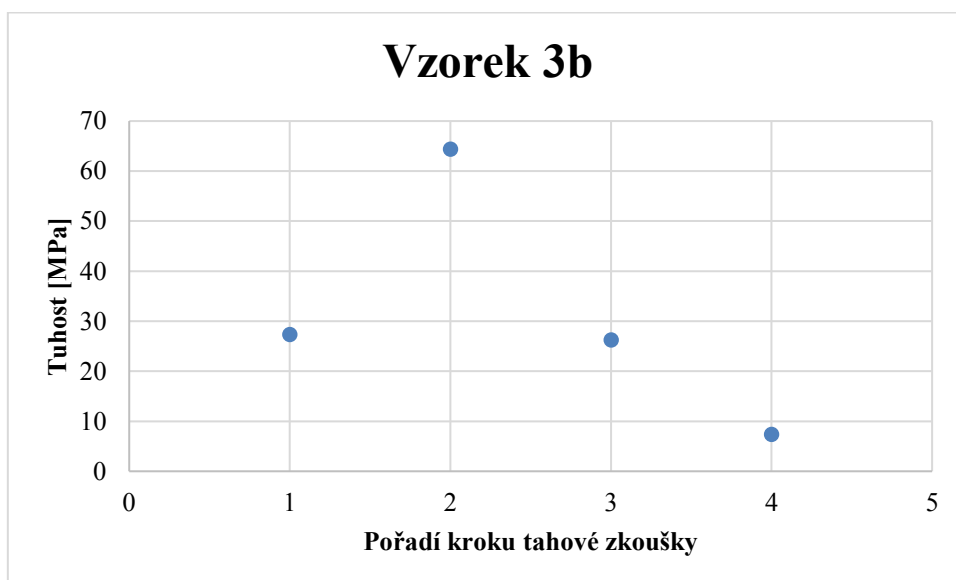
U všech vzorků lze vidět vzestup tuhosti ve druhém kroku zatížení, ve třetím kroku následuje pokles a čtvrtý krok se mezi vzorky liší. U vzorku 3a se tuhost ve čtvrtém kroku zvyšuje. U vzorku 1b a 3b se snižuje. Porovnání tohoto snížení v absolutních hodnotách je zobrazeno na Grafu 21. Prezentované výsledky jsou dále diskutovány v kapitole 6.



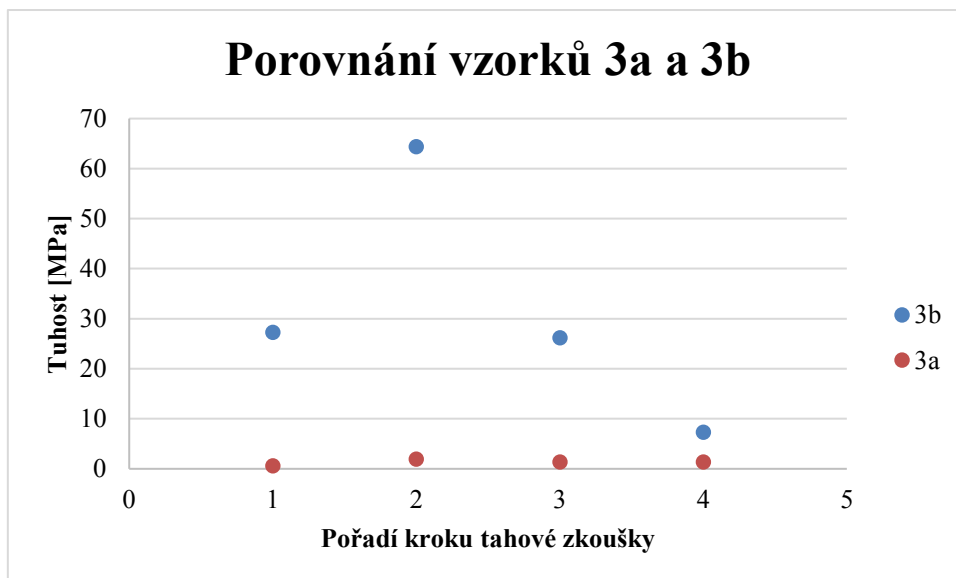
Graf 17 Tuhost vzorku 1b v jednotlivých krocích tahové zkoušky



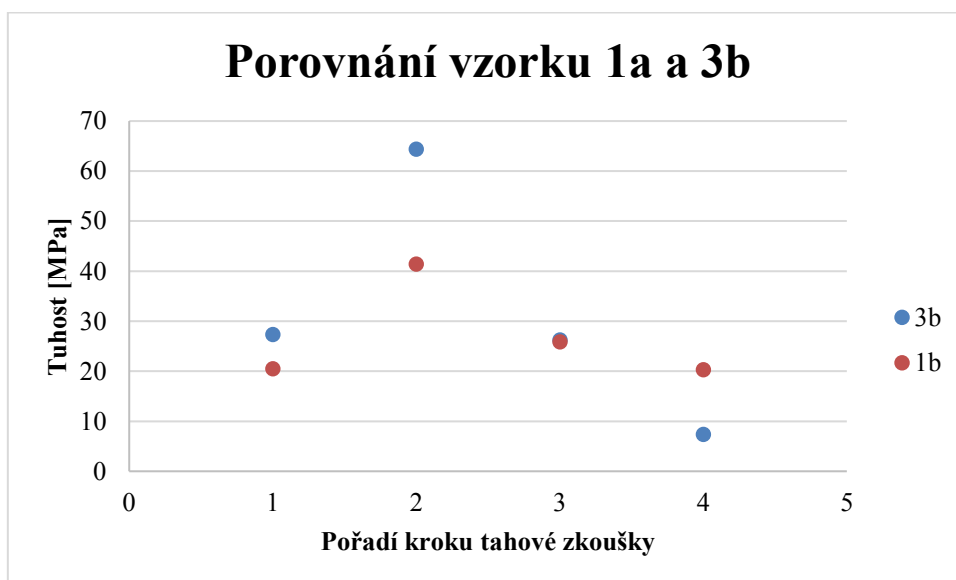
Graf 18 Tuhost vzorku 3a v jednotlivých krocích tahové zkoušky



Graf 19 Tuhost vzorku 3b v jednotlivých krocích tahové zkoušky



Graf 20 Porovnání absolutních hodnot tuhostí a chování vzorků 3a a 3b napříč kroky tahové zkoušky



Graf 21 Porovnání absolutních hodnot tuhostí a chování vzorků 1a a 3b napříč kroky tahové zkoušky

8 Diskuze

Jedním z cílů této práce bylo vytvoření testovacího protokolu, který by dokázal získat data o struktuře zkrácené vazivové tkáně u dětí s PEC a data o její mechanické a strukturální odezvě na zatížení deformací zároveň. Výstupní data experimentu a popis metodiky by tak mohly sloužit jako podklad pro optimalizaci šetření těchto obtížně dostupných vzorků tkání. V experimentu byla použita kombinace jednoosé tahové zkoušky pomocí speciálního (mikro)

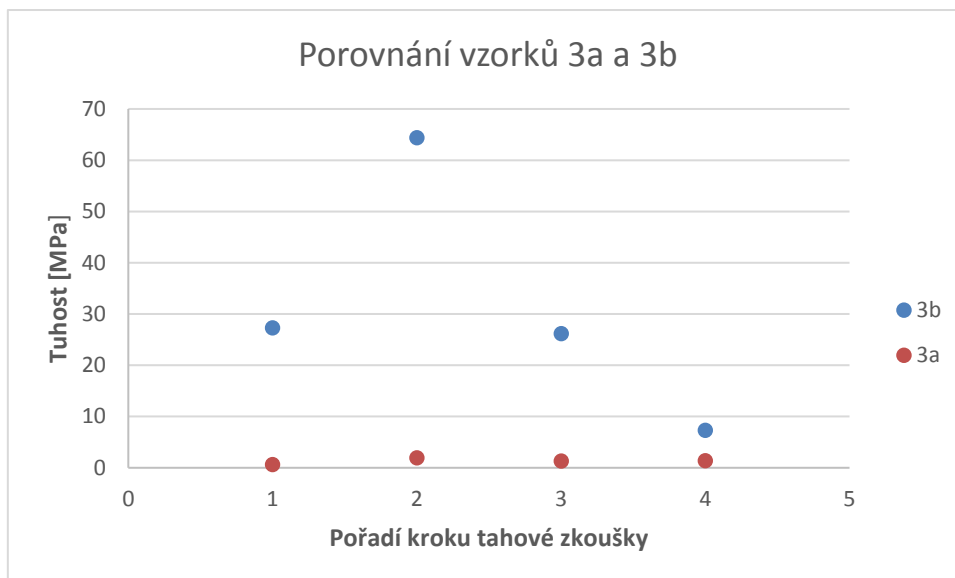
testeru a skenovací SHG mikroskopie. Jelikož skenování vzorku vyžaduje určitý čas, byla tahová zkouška prováděna v krocích, během kterých byl vzorek postupně natahován.

Tato kombinace však s sebou přináší delší dobu testování. Zejména při použití detailnějšího skenování, se tato doba prodlužuje v řádech minut. To může ovlivnit mechanickou reakci vzorku a to konkrétně její viskózní složku. Ačkoliv byly vzorky během testování průběžně hydratovány, je možné, že získaná data z testeru byla ovlivněna vysycháním vzorků. Na Graf 12 (kap. 6.2, str. 66) je patrné, že se vrůstající deformací vzorku mezi kroky, a tedy i dobou testování, se mění charakter vzestupné části křivky. Změna má charakter zlomu, během kterého se zpomalí nárůst napětí v čase. To může být způsobeno snížením působení viskózního členu vzorku (viz. kap. 3.3). Na druhou stranu, se zvyšujícím se počtem kroků, růstem napětí a tedy i dobou testování, se zvyšovala doba potřebná pro ustálení relaxační křivky v horizontále (Graf 16, kap. 6.2, str. 70). To by naopak odpovídalo zvyšujícímu se působení viskózního členu. Výsledky se tak ztotožňují s měřením Millesi a další (1997), kteří testovaly vzorky tkáně u Dupuytrenovy kontraktury během 2.5, 5 a 10 % prodloužení. Stejně tak Melling a další (2000) uvádějí, že doba potřebná pro relaxaci napětí roste se zastoupením viskózního členu tkáně. Jak popisují Duenwald a další (2009), pokles rychlosti relaxace je typickým chováním vazů (ligament).

Určení mechanických a strukturálních charakteristik vazivové tkáně u PEC, by mělo posloužit k porovnání klinicky postižené a klinicky nepostižené tkáně, stejně jako u studií (Rodriguez a další, 2014; Melling a další 2000; Millesi a další, 1997) provedených u pacientů s DK. Jak je uvedeno v rešeršní části této práce, kontraktury vazivové tkáně jsou popisovány především na mediální straně postižené nohy. Jelikož získat kontrolní vzorek zdravé tkáně prakticky nelze, byly v tomto experimentu použity vazivové tkáně mediální a laterální části nohy, jejichž výběr byl zvolen dle popisu Poon a další (2009). Ve výsledkové části této práce jsou pak pro srovnání prezentovány SHG snímky vzorků v klidu na sklíčku s označením 1 a 3 (Obrázek 28 a Obrázek 29, kap. 7.1.1, str. 72-74). Autoři experimentu neměli informaci o tom, která z tkání byla odebrána z mediální části nohy. Ačkoliv se od sebe vzorky evidentně liší, určit specifické odlišné rysy v tuto chvíli nelze. Pro sledování případného trendu rozdílných charakteristik by bylo potřeba nasnímat vyšší množství vzorků a následně porovnat.

Představou autorů experimentu byla jasně odlišitelná dysorganizovaná struktura vzorku, tak jak je například demonstrováno na Obrázek 15 (kap. 3.5.4, str. 40) v teoretické části práce. Námi pořízené SHG snímky **obou vzorků** v klidovém stavu vykazují oblasti s patrným vlnitým vzorem kolagenní tkáně a oblasti s místy roztřepenou vláknitou strukturou. Tato roztřepená

struktura může být například důsledek operačního vyjmutí vzorku. Dále bylo zjištěno, že každý ze vzorků není čistou vazivovou tkání. Na Obrázek 35 (kap. 7.1.3, str. 84) je patrna parazitní tkáň. V tomto případě se jedná o tukovou tkáň a cévní zásobení (zjištěno a identifikováno patologem a potvrzeno histologickým rozbohem). Právě tuková tkáň byla přítomna na velkém množství pořízených snímků. Očistit vzorek od případné parazitní tkáně se jeví jako nereálné, zejména kvůli minimálním rozměrům vzorku. Na fotografiích se také vzorky jeví jako homogenní tkáň světle růžové barvy, na které lze těžko odečíst parazitní tkáň. Navíc není jasné, jaké makroskopické charakteristiky by kontrahovaná tkáň měla mít. Srovnání vzorku 1 a 3 před rozříznutím je demonstrováno na Obrázek 30 (kap. 7.1.1, str. 75) ve výsledkové části práce. Tkáňové vzorky od pacientů s DK, mají v tomto ohledu jasnou výhodu. Klinická manifestace onemocnění formou vazivových svazků jasně definuje tkáň pro vyjmutí. Co se týče velikosti vzorků, Millesi a další (1997) uvádějí k rozměrům vzorků pouze průměr napříč vzorkem (1-5mm), nicméně lze uvažovat, že získaný kontrahovaný svazek tkáně z dospělého jedince bude mít výhodnější poměr šířky a délky pro testování. Průměr napříč vzorkem byl u našich vzorků až 11 mm, avšak rozměry šířky a délky se příliš nelišily. Nevýhoda tedy pramení z nehomogenní distribuce napětí uvnitř vzorku během jednoosého zatížení. Pro tyto účely byly vzorky podélně rozříznuty (Obrázek 25, kap. 6.2, str. 58). Podle výsledků tahové zkoušky se však ukazuje, že rozříznutí vzorku může výrazně ovlivnit jeho mechanické vlastnosti. Na obr. 38 (na další straně) je zobrazen Graf 20 z výsledkové části, porovnávající absolutní hodnoty tuhosti a chování vzorků napříč kroky mechanické zkoušky. Z grafu je patrné, že ačkoli by se mělo jednat o téměř totožnou tkáň, vzorky se pohybují v diametrálně odlišné hladině tuhosti. Bohužel, stejné srovnání u vzorků 1a a 1b mezi sebou nelze, jelikož při průběhu tahové zkoušky došlo ke ztrátě dat přemazáním souborů stejného názvu. Proto nelze tento závěr zobecnit.



Obrázek 38 Obrázek Grafu 20 ze str. 89

Výsledky protokolu mechanické zkoušky umožňují porovnání tkáně na mediální a laterální straně nohy. Na Graf 21 (kap. 7.2, str. 89) lze porovnat tuhostní charakteristiky vzorků 1b a 3b. Vzorek 3b se pohybuje ve vyšších hodnotách tuhosti. To je patrné na prvním a druhém kroku. Chování hodnot se ve druhém kroku podobá. Nicméně, ve třetím kroku klesne prudce hodnota tuhosti vzorku 3b na hladinu vzorku 1b. Ve čtvrtém kroku tento prudký pokles pokračuje. Naopak, u vzorku 1b není pokles ve třetím a čtvrtém kroku natolik markantní. Výsledky tak poukazují na to, že vzorek 1b je méně tuhý a pevnější. Zatímco prudký vzestup tuhosti následovaný jejím prudkým poklesem u vzorku 3b svědčí o jeho vyšší křehkosti a vyšší tuhosti.

Pomocí aplikovaného testovacího protokolu se podařilo získat snímky vzorků během zvyšující se deformace, čímž se podařilo splnit jeden z cílů experimentu. Na prezentovaných snímcích je patrna deformace vzorku pod vlivem tahového zatížení. V sérii krátkých kroků (Obrázek 31, kap. 7.1.2, str. 77) jsou změny méně výrazné. Naopak ze snímků vzorků v sérii dlouhých kroků je již deformace snadno čitelná. Při porovnání reakce vzorků na deformaci v sérii dlouhých kroků si lze povšimnout odlišností mezi vzorky (Obrázek 32, Obrázek 33, kap. 7.1.2, str. 79 a 81). Nutno podotknout, že na rozdíl od snímků vzorků v klidu, jsou po upnutí rozdíly mezi vzorky markantnější. Rozdíl v reakcích vzorků na deformaci lze spatřit v napínání útvarů vzorků. Vzorky 3a a 3b se tak pomocí těchto struktur napínají nerovnoměrně.

Jak již bylo diskutováno, vzorky byly pro účely výhodnější distribuce napětí podélně rozříznuty. Avšak u těchto drobných vzorků může distribuci napětí ovlivnit také jejich upnutí do čelistí. Ze série snímků vzorku 3b si lze všimnout, že se vzorek nedeformuje homogenně.

Svazek tkáně v horní části vzorku se během deformace zjevně zužuje více než jeho středová část. Měření šíře těchto oblastí potvrdilo tento jev (Tabulka 5 Tabulka 5 Porovnání procentuální změny šíře vzorku a vybrané struktury, kap. 7.1.2, str. 82). Zatímco se středová část vzorku zúžila jen o 3.9 %, svazek se naopak zúžil o 19.5 %. Tato nerovnoměrná deformace mohla být způsobena přednostním přenosem napětí skrz tento svazek. Není jasné, zda za takto nerovnoměrným zatížením vzorku mohla jeho struktura, nebo nerovnoměrné upnutí vzorku do čelistí. Nerovnoměrný tah za jednotlivé struktury vzorku může být u takto drobných vzorků významný. Je důležité podotknout, že v sérii dlouhých kroků byla získávána čitelná data silové reakce vzorku. Naměřená mechanická odpověď tak nemusí odpovídat celému průřezu vzorku. Je, který by odpovídal nerovnoměrnému zatížení vzorku během deformace je také patrný na snímcích vzorku 3a (Obrázek 33, kap. 7.1.2, str. 81).

U všech vzorků je patrna příčná deformace (viz naměřené hodnoty ve výsledkové části, kap. 7.1.2). Ze snímků je také zřejmé, že se deformace odehrává podél celého vzorku. Měření šíře na více místech bylo provedeno u vzorku 1b. Procentuální změna třech měřených šířek se mezi prvním a posledním snímkem téměř neliší (Tabulka 7, kap. 7.1.2, str. 83). Určení vhodných výchozích bodů na vzorku pro účely měření však může být problematické, jelikož se tvar jednotlivých struktur protahuje do podélného směru, popřípadě se mění jejich výraznost na snímku. Podstatou této změny výraznosti může být fakt, že obraz je výpočtem z dat získaných z detektoru mikroskopu zachycujícího SHG signál. Nejedná se tedy o skutečný obraz. Síla signálu je závislá na šroubovitěm charakteru struktury, jakými jsou kolagenní proteiny. Pokud dojde během natažení ke změně natočení těchto struktur, změna signálu tak nemusí odpovídat změně jejich polohy vůči ohniskové rovině.

Změna polohy vzorku vůči objektivu může být patrna zejména u počátečních deformací. Na Obrázek 36, kap. 7.1.3, str. 85) je zobrazen snímek prověšeného vzorku 1a po upnutí v čelistech, jehož středová oblast je zcela mimo rovinu snímání. Střed vzorku tak musel být doostřen ručně. Z tohoto důvodu také nebyly vzorky nasnímány vcelku těsně po upnutí do čelistí, ale byl sledován pouze určitý doostřený okrsek tkáně. Na obr. 37 (str. 86) je pro demonstraci zobrazen stav vzorku 1a před upnutím a po natažení při kterém byl jako první získán celkový obraz vzorku.

Dalším jevem, který reprezentuje reakci vzorku na tah, je změna orientace struktur v prostoru. Ze snímků je patrné, že s rostoucí deformací se mění i směr některých struktur. Na vzorku 3a bylo provedeno měření orientace vláken vybrané oblasti vzorku (Obrázek 34, kap. 7.1.2, str.

83). Během prodloužení vzorku o 35.8 % z prvního snímku došlo ke změně orientace vláken do podélného směru zatížení o 17.3° , to činí přibližně 2° na jedno procento prodloužení.

Vzorky byly vystaveny tahu v podélné ose zátěže, čemuž odpovídalo jejich prodloužení. Na sérii snímků vzorků 1a a 3b lze spatřit na horním okraji snímku tmavou oblast vzorky (Obrázek 32, Obrázek 33, kap. 7.1.2, str. 79 a 81). Touto tmavou oblastí je čelist testeru, která neemituje SHG signál. U vzorků 1a a 3b byla pro demonstraci možností obrazové analýzy provedena měření natažení vzorku, aby mohla být porovnána s datovými údaji pohybu čelistí testeru. Pro měření byly využity dva způsoby. Prvním způsobem bylo měření ušlé vzdálenosti čelistí mezi snímky (podmínkou měření je totožný rozměr snímku a měřítko). Druhým způsobem bylo měření vzdálenosti čelisti od okraje snímku, kdy výsledný rozdíl mezi snímky reprezentuje ušlou vzdálenost jedné čelisti. Porovnání vzdálenosti čelistí získané z dat z testeru a těchto dvou metod jsou uvedeny na Tabulkách 2 a 4 (kap. 7.1.2, str. 80 a 82). Rozdíl měřených a skutečných délek kroků se pohyboval od několika setin po jednu desetinu milimetru.

Metoda měření vzdálenosti mezi určitým bodem na snímku a okrajem snímku během deformace, byla použita i u vybrané tkáňové struktury. U vzorku 1a (obr. 32, kap. 7.1.2, str. 79) bylo zjištěno, že struktura poblíž spodního okraje snímku se po oddálení čelistí přiblíží k tomuto okraji na 0.33 mm (Tabulka 1, kap. 7.1.2, str. 80). Avšak na třetím snímku se tato vzdálenost výrazně zvýší na 1.17 mm. Předpokladem změny směru pohybu této struktury může být částečný výkluz vzorku ze spodní čelisti, popřípadě tvorba trhliny mimo oblast snímání.

Mechanická jednoosá tahová zkouška v našem experimentu byla provedena ve dvou sériích kroků, tak jak je popisováno v kapitole 5.6. Velikost natahování vzorků, nebyla řízena konkrétním protokolem vztahenému k původním rozměrům vzorků. Jednotlivé kroky byly aplikovány na všechny vzorky v přibližně stejné velikosti. Testovací protokoly nebyly u všech vzorků stejné. Vzorek 1a byl například natahován do 55% po krocích nepřevyšujících 0.2. A počáteční série probíhala v krocích o délce 0.03 mm. Vzorek 3a byl naopak vystaven v první sérii pouze pěti krokům.

Při testování mechanických vlastností tkání u DK, byla použita natažení vzorků od 2.5 do 10 % (Melling a další, 2000; Millesi a další, 1997). Bohužel, v našem případě jsme při takovýchto úrovních deformace nemohli vyhodnocovat data kvůli nejednoznačnosti zaznamenávaného signálu reakční síly. Důvodů zde přichází v úvahu více, od vlivu elektromagnetického šumu po faktickou nejednoznačnost vyplývající ze struktury testovaného vzorku. Stejně tak může tato nejednoznačnost pramenit ze skluzu kolagenních vláken ve vazivových obalech před dosažením určité hodnoty napnutí vzorku. Vyhodnocení dat mechanické zkoušky tak u vzorku

například u vzorku 1b probíhalo v intervalu 22-110% prodloužení. Uvedené hodnoty je třeba chápat jako smluvní míru, protože byly získány odečtem vzájemné polohy čelistí, nikoli skutečné deformace vzorku.

Millesi a další (2000) cituje nálezy Vidiika a uvádí, že pokud je struktura s paralelními vlákny natažena do 3%, její vlnitý vzor se vyhladí. Na tomto předpokladu byla také vytvořena kombinace tahové zkoušky a SHG mikroskopie. Tento jev se podařilo nasnímat v předexperimentu na Achillových šlachách králíka (Obrázek 22, kap. 5.5, str. 52). Bohužel, vzorky tkání u PEC takovouto vlnitou strukturu obsahovaly pouze v některých okrscích (viz. obr. 27, kap. 7.1.1, str.72). Vlnitý vzor v průběhu deformace byl nasnímán pouze u vzorku 1a v sérii krátkých kroků. Tento vzor však při prodloužení o 2.9 % zůstává patrný.

Otázkou zůstává, zda by stálo za to vytvořit automatizované prostředky obrazové analýzy a kvantifikovat tak reakce vzorků na zatížení. Jako příklad lze uvést diplomovou práci Morávka (2016), ve které používá pro analýzu určení směrovosti vláken scaffoldu během zatížení metodu lokálního gradientu. V tomto případě však zřejmě bude záviset na vybraném okrsku vlnité tkáně. Na rozdíl od šlasy, tyto okrsky nejsou jednoznačně organizovány do podélného směru tkáně (Obrázek 27, Obrázek 28, Obrázek 29, kap. 7.1.1, str. 72-74), případná reakce okrsků se pak nemusí chovat jako šlasy. Měřené parametry na snímcích, které již byly diskutovány, vykazují jednoznačný trend změn napříč deformací vzorku. Tím je demonstrována možnost měření strukturálních změn během deformace. Příkladem může být právě zúžení vzorku nebo jeho částí a změna úhlové orientace vláken. Po výběru vhodných parametrů by tak bylo možné na vyšším počtu vzorků kvantifikovat a porovnat reakce struktury vzorků na zatížení. Vzhledem k nehomogenitě tkáně by bylo vhodné sledovat více parametrů najednou. Aby bylo takovými požadavkům vyhověno, bylo by potřeba ujednotit protokol SHG snímání napříč celým protokolem. Pro měření zúžení vzorku, jeho částí, popřípadě jejich orientace v prostoru zároveň, je potřeba zobrazení celého vzorku. Naopak zobrazení vláknité struktury vyžaduje detail této oblasti. Toho lze docílit detailnějším skenováním, avšak na úkor celkově delšího procesu.

Metodika pro vyhodnocení dat tahové zkoušky je uvedena a částečně diskutována v kapitole 6.2. Pokud by se v budoucím šetření upřednostnila kvalita dat tahové zkoušky, se snížením případného vlivu vysychání, bylo by vhodné měřit plynulým souvislým tahem bez kroků do určité úrovně natažení. Po zastavení provést dostatečně dlouhý relaxační test a pro ujednocení protokolů vztáhnout cílovou úroveň natažení k rozměrům vzorku. Data by tak nemusela být modelována. Snímky pomocí SHG potom provést na vzorku v klidovém stavu, těsně po upnutí

a po zastavení čelistí. Ze snímků by se pak daly zjistit základní strukturální charakteristiky vzorků. Ty by však mohly postačit pro popis základních rozdílů mezi vzorky. Jak je diskutováno výše, struktura vzorků se po natažení lišila výrazněji, než u vzorků v klidovém stavu. Tímto protokolem by tak mohly být zaznamenány patřičné rozdíly mezi tkáněmi po mechanické a strukturální stránce. Za úvahu také stojí vývoj metody pro zpětnovazebné hodnocení deformace vzorku. V experimentu tak musel být tento nedostatek obejit způsobem popsaném v kap. 6.2.

9 Závěr

Cíle práce se podařilo splnit. Provedení vlastního experimentu přineslo řadu informací důležitých pro nastavení dalších navazujících měření a přes pochopitelně velmi omezený soubor získaných dat je možné zaujmout jednoznačná stanoviska k vysloveným hypotézám:

Před uvedením závěrů je nutno podotknout, že po vyhodnocení všech výsledků byla zpřístupněna informace o skutečném anatomickém původu vzorků. Vzorek č. 1 pocházel z laterální strany. Vzorek č. 3 pocházel ze strany mediální.

Hypotéza 1: Struktura vazivové tkáně na mediální straně nohy u PEC bude zjevně dysorganizovaná, v porovnání z vazivovou tkání na laterální straně nohy. To bude reprezentováno nehomogenní orientací vláknité složky tkáně.

Tato hypotéza **nebyla potvrzena**, jelikož tkáňové vzorky na SHG snímcích nevykazovaly strukturální charakteristiky ani trend vhodný pro vyhodnocení. Pro budoucí šetření je však nutno uvést zjištění, že po natažení jsou strukturální rozdíly mezi vzorky výraznější než při pozorování vzorků v klidu. Při testování vyššího počtu vzorků, by tak bylo možné tento trend zachytit právě u takto natažených vzorků.

Hypotéza 2: Vláknité struktury vzorků na laterální straně nohy u PEC se budou markantněji organizovat do směru působícího zatížení.

Tato hypotéza nemohla být v návaznosti na předchozí hypotézu vyhodnocena a tak je hodnocena **jako nepotvrzená**.

Hypotéza 3: Vazivové tkáně na mediální straně nohy u PEC budou vykazovat vyšší tuhost než tkáně na laterální straně.

Výsledky tahové zkoušky **potvrzují** stanovenou hypotézu. V navazujícím šetření je však potřeba zvážit průběh testovacího protokolu. Případné návrhy jsou diskutovány v předchozí kapitole.

Uvedené závěry nemohou být zobecněny. Práce slouží jako vstupní pilotní a případová studie do rozsáhlého výzkumu v dané oblasti, který je součástí záměru podporovaného grantem s názvem: „Korelativní přístup k poruchám mezibuněčné hmoty“ od proteinů k uspořádání tkáně u idiopatického onemocnění pes equinovarus.

Seznam literatury

BABAEI, B.; A. DAVARIAN; S. L. LEE; K. M. PRYSE; W. B. MCCONNAUGHEY; E. L. ELSON a G. M. GENIN. Remodeling by fibroblasts alters the rate-dependent mechanical properties of collagen. *Acta Biomaterialia* [online]. OXON: ELSEVIER SCI, 2016, **37**, 28-37 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.03.034. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706116301301>.

BAYAN, C.; J. M. LEVITT; E. MILLER; D. KAPLAN; et al. Fully automated, quantitative, noninvasive assessment of collagen fiber content and organization in thick collagen gels. *Journal of applied physics*, 2009, 105(10), 102042.

BENJAMIN, M a RALPHS, J. M. Tendons and ligaments--an overview. *Histology and histopathology* [online]. MURCIA: F. HERNANDEZ, 1997, **12**(4), 1135-1144 [cit. 2016-11-27]. ISSN 0213-3911. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/13918166_Tendon_and_ligaments-An_overview.

BENJAMIN, M.; T. KUMAI; S. MILZ; B. M. BOSZCZYK; A. A BOSZCZYK; a J. R. RALPHS. The skeletal attachment of tendons—tendon ‘entheses’. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular* [online]. NEW YORK: ELSEVIER SCIENCE INC, 2002, **133**(4), 931-945 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/S1095-6433(02)00138-1. ISSN 10956433. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643302001381>.

BIRCH, H. L. Specialisation of extracellular matrix for function in tendons and ligaments. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* [online]. ŘÍM: CIC EDIZIONI INTERMAZIONALI, 2013, **3**(1), 12–22 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.11138/mltj/2013.3.1.012. ISSN 2240-4554. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676159/>.

BÖL, M.; A. E. EHRET; K. LEICHSENRING a M. ERNST. Tissue-scale anisotropy and compressibility of tendon in semi-confined compression tests. *Journal of Biomechanics* [online]. OXON: ELSEVIER SCI, 2015, **48**(6), 1092-1098 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2015.01.024. ISSN 0021-9290. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929015000408>.

CHEN, X.; O. NADIARYNKH; S. PLOTNIKOV a P. J. CAMPAGNOLA. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nature Protocols* [online]. LONDON: NATURE PUBLISHING GROUP, 2012-3-8, **7**(4), 654-669 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1038/nprot.2012.009. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2012.009>.

CONNIZZO, B. K.; S. M. YANNASCOLI a L. J. SOSLOWSKY. Structure–function relationships of postnatal tendon development: A parallel to healing. *Matrix Biology* [online]. AMSTERDAM: ELSEVIER SCIENCE BV, 2013, **32**(2), 106-116 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.matbio.2013.01.007. ISSN 0945053x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X13000085>.

COOKE, S. J.; B. BALAIN, C. Ch. KERIN a N. T. KIELY. Clubfoot. *Current Orthopaedics* [online]. AMSTERDAM: ELSIEVER, 2008, **22**(2), 139-149 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/j.cuor.2008.04.002. ISSN 0268-0890. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268089008000558>.

COURTNEY, T.; M. S. SACKS; J. STANKUS; J. GUAN; et al. Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy. *Biomaterials*, OXFORD: ELSEVIER SCI LTD, 2006, 27(19), 3631-3638. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206001645>.

ČIHÁK, R.. *Anatomie I*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-3817-8.

DAHNER, L. E. Growth and Development of Tendons. *Tendon Injuries* [online]. LONDON: SPRINGER-VERLAG, 2005, 22-24 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1007/1-84628-050-8_3. ISBN 1-85233-503-3. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/1-84628-050-8_3.

DIETZ, F. R.; I. V. PONSETI a J. A. BUCKWALTER. Morphometric Study of Clubfoot Tendon Sheaths. *Journal of Pediatric Orthopaedics - B* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT-RAVEN PUBLISHERS., 1983, **3**(3), 311-318 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1097/01241398-198307000-00008. ISSN 0271-6798..

DOBBS, M. B. a CH. A. GURNETT. Genetics of clubfoot. *Journal of Pediatric Orthopaedics B* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2012, **21**(1), 7-9 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1097/BPB.0b013e328349927c. ISSN 1060-152x. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3229717/>.

DUCE, S. L.; M.; D'ALESSANDRO; Y. DU, et al. 3D MRI Analysis of the Lower Legs of Treated Idiopathic Congenital Talipes Equinovarus (Clubfoot). *PLoS ONE* [online]. SAN FRANCISCO: PUBLIC LIBRARY SCIENCE, 2013, **8**(1), e54100- [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1371/journal.pone.0054100. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0054100>.

DUENWALD, S. E.; R. VANDERBY a R. S. LAKES. Viscoelastic Relaxation and Recovery of Tendon. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. NEW YORK: SPRINGER, 2009, **37**(6), 1131-1140 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1007/s10439-009-9687-0. ISSN 0090-6964. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10439-009-9687-0>.

FORSMAN, M.; L. KALLIOINEN; M. KALLIOINEN a J. RYHÄNEN. Dupuytren'S Contracture; Increased Cellularity — Proliferation, is There Equality? *Scandinavian Journal of Surgery* [online]. LONDON: SAGE PUBLICATIONS, 2005, **94**(1), 71-75 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1177/145749690509400117. ISSN 1457-4969. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/145749690509400117>.

FOSTER, A. a N. DAVIS. Congenital talipes equinovarus (clubfoot). *Surgery (Oxford): Orthopaedic IV: degenerative/paediatric disorders* [online]. OXFORD: MEDICINE PUBLISHING, 2007, **25**(4), 171-175 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/j.mpsur.2007.04.001. ISSN 02639319. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931907000348> .

FRANCHI, M.; A. TRIRÈ; M. QUARANTA; E. ORSINI a V. OTTANI. Collagen Structure of Tendon Relates to Function. *The Scientific World JOURNAL* [online]. NEWBURY: THE SCIENTIFIC WORLD LTD, 2007, **7**, 404-420 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1100/tsw.2007.92. ISSN 1537-744x. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2007/132725/abs/>.

FRANCHI, M.; M. FINI; M. QUARANTA; V. DE PASQUALE; M. RASPANTI; G. GIAVARESI; V. OTTANI a A. RUGGERI. Crimp morphology in relaxed and stretched rat Achilles tendon. *Journal of Anatomy* [online]. OXON: BLACKWELL PUBLISHING, 2007, **210**(1), 1-7 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2006.00666.x. ISSN 0021-8782. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7580.2006.00666.x>.

FUKUHARA, K.; G. SCHOLLMEIER a H. K. UHTHOFF. The pathogenesis of club foot: A histomorphometric and immunohistochemical study of fetuses. *Bone and Joint Journal* [online]. BRITISH EDITORIAL SOCIETY OF BONE AND SURGERY, 1994, **76**(3), 450-457 [cit. 2016-11-27]. DOI: PubMed 8175852. ISSN 2049-4408. Dostupné z: <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/jbjsbr/76-B/3/450.full.pdf>.

GATT, R.; M. V. WOOD; A. GATT; et al. Negative Poisson's ratios in tendons: An unexpected mechanical response. *Acta Biomaterialia* [online]. OXON: ELSEVIER SCI, 2015, **24**, 201-208 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.06.018. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706115002871>.

GIBBONS, P. J a K. GRAY. Update on clubfoot. *Journal of Paediatrics and Child Health* [online]. HOBOKEN: WILEY-BLACKWELL, 2013, **49**(9), E434-E437 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1111/jpc.12167. ISSN 1034-4810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpc.12167>

GIUSTI, B. a G. PEPE. Fibrillins in Tendon. *Frontiers in Aging Neuroscience* [online]. LAUSANNE: FRONTIERS MEDIA SA, 2016, **8**, - [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00237. ISSN 1663-4365. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2016.00237/full>.

GRAY, D. H. a J. M. KATZ. A HISTOCHEMICAL-STUDY OF MUSCLE IN CLUB FOOT. *JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY-BRITISH VOLUME* [online]. LONDON: BRITISH EDITORIAL SOCIETY OF BONE AND SURGERY, 1981, **63b**(3), 466-466 [cit. 2017-03-28]. ISSN 2049-4408. Dostupné z: <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/63-B/3/417.long>.

GUTSMANN, T.; G. E. FANTNER; M. VENTURONI, et al. Evidence that Collagen Fibrils in Tendons Are Inhomogeneously Structured in a Tubelike Manner. *Biophysical Journal* [online]. BETHESDA: BIOPHYSICAL SOCIETY, 2003, **84**(4), 2593-2598 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)75064-4. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349503750644>.

HALPER, J. Proteoglycans and Diseases of Soft Tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. BERLIN: SPRINGER-VERLAG BERLIN, 2014, **802**, 49-58 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1007/978-94-007-7893-1_4. ISSN 0065-2598. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7893-1_4.

HATTORI, K.; H. SANO; Y. SAIJO; A. KITA; M. HATORI; S. KOKUBUN a E. ITOI. Measurement of soft tissue elasticity in the congenital clubfoot using scanning acoustic microscope. *JOURNAL OF PEDIATRIC ORTHOPAEDICS-PART B* [online] [abstract]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2007, **16**(5), 357-362 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1097/01241398-198307000-00008. ISSN 1060-152X. Dostupné z: http://journals.lww.com/jpo-b/Abstract/2007/09000/Measurement_of_soft_tissue_elasticity_in_the.10.aspx.

HERCEG, Milan B, Dennis S WEINER, Dimitris P AGAMANOLIS a Debbie HAWK. Histologic and Histochemical Analysis of Muscle Specimens in Idiopathic Talipes Equinovarus. *Journal of Pediatric Orthopaedics* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2006, **26**(1), 91-93 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1097/01.bpo.0000188994.90931.e8. ISSN 0271-6798. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>

HERCHENHAN, A.; N. S. KALSON; D. F. HOLMES, P. HILL; K. E. KADLER a L. MARGETTS. Tenocyte contraction induces crimp formation in tendon-like tissue. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* [online]. HEIDELBERG: SPRINGER HEIDELBERG, 2011, **11**(3-4), 449-459 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1007/s10237-011-0324-0. ISSN 1617-7959. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10237-011-0324-0..>

HEROD, T. W.; N. C. CHAMBERS a S. P. VERES. Collagen fibrils in functionally distinct tendons have differing structural responses to tendon rupture and fatigue loading. *Acta Biomaterialia* [online]. KIDLINGTON: ELSEVIER SCI LTD, 2016, **42**, 296-307 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.06.017. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S174270611630294X>.

HOLMES, D.F.; H.K. GRAHAM, J.A.; TROTTER a K.E. KADLER. STEM/TEM studies of collagen fibril assembly. *Micron* [online]. OXFORD: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD, 2001, **32**(3),

273-285 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/S0968-4328(00)00040-8. ISSN 09684328. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432800000408>.

HOOTNICK, D.R.; E.M. LEVINSOHN; R.J. CRIDER a D.S. PACKARD. CONGENITAL ARTERIAL MALFORMATIONS ASSOCIATED WITH CLUBFOOT - A REPORT OF 2 CASES. *CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT-RAVEN PUBL, 1982, (167), 160-163 [cit. 2016-11-27]. DOI: PubMed ID: 7094458. ISSN 0009-921X.

HOSKING, S.W. a SCOTT, W.. A study of anatomy and biomechanics of the ankle region in normal and club feet (talipes equino varus) of infants. *Journal of anatomy* [online]. Oxford: Blackwell Publishing, 1982, **134**(2), 227-236 [cit. 2016-11-27]. DOI: PMCID: PMC1167913. ISSN 00218782. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1167913/>.

HUANG, Ch. a R. OGAWA. Fibroproliferative Disorders and Their Mechanobiology. *Connective Tissue Research* [online]. LONDON: INFORMA HEALTHCARE, 2012, **53**(3), 187-196 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.3109/03008207.2011.642035. ISSN 0300-8207. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03008207.2011.642035>.

IPPOLITO, E.; F. DE MAIO; F. MANCINI; D. BELLINI a A. OREFICE. Leg muscle atrophy in idiopathic congenital clubfoot: is it primitive or acquired? *Journal of Children's Orthopaedics* [online]. BERLIN: SPRINGER BERLIN HEIDELBERG, 2009, **3**(3), 171-178 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1007/s11832-009-0179-4. ISSN 1863-2521. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686819/>.

IPPOLITO, E. Update on pathologic anatomy of clubfoot. *Journal of pediatric orthopedics* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT-RAVEN PUBL, 1995, **4**(1), 17-24 [cit. 2017-01-17]. ISSN 1060-152X.

IONASESCU, V, J.A. MAYNARD, I.V. PONSETI a H. ZELLWEGER. The role of collagen in the pathogenesis of idiopathic clubfoot. Biochemical and electron microscopic correlations. *Helvetica paediatrica acta* [online]. SCHWABE, 1974 [cit. 2016-11-27]. ISSN 0018-022X. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/18738866_The_role_of_collagen_in_the_pathogenesis_of_idiopathic_clubfoot_Biochemical_and_electron_microscopic_correlations.

ISAACS, H., J.E. HANDELSMAN, M. BADENHORST a A. PICKERING. The muscles in club foot - a histological histochemical and electron microscopic study. *Bone and Joint Journal* [online]. LONDON: British Editorial Society of Bone and Joint Surgery, 1997, **59-B**, 465-472 [cit. 2017-03-28]. ISSN 2049-4408. Dostupné z: <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/59-B/4/465>.

IŠKA, M. *Modernizace mikrotesteru pro jedno a dvoufotonovou mikroskopii* [online]. Praha, 2016 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <https://dspace.cvut.cz/handle/10467/65641>. Bakalářská. České vysoké učení technické v Praze. Vedoucí práce F. Lopot.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* [online]. COPENHAGEN: MUNKSGAARD INT PUBL LTD, 2000, **10**(6), 312-320 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1034/j.1600-0838.2000.010006312.x. ISSN 0905-7188. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0838.2000.010006312.x>.

KARLON, W. J.; J. W. COVELL; A. D. MCCULLOCH a J. J. HUNTER, et al. Automated measurement of myofiber disarray in transgenic mice with ventricular expression of ras. *The Anatomical Record*, NEW YORK: WILEY-LISS, 1998, 252(4), 612-625.

KHAN, A; M. RYAN; M. GRUBER; S. HARALABATOS a M. BADALAMENTE. Connective tissue structures in clubfoot: A morphologic study. *Journal of Pediatric Orthopedics* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2001, **21**(6), 708-712 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1097/00004694-200111000-00002. ISSN 02716798. Dostupné z:

https://ovidsp.tx.ovid.com/sp3.24.1b/ovidweb.cgi?&S=AIAOFPNGLGDDFCJNNCHKAFDCHPNBA A00&Link+Set=S.sh.22%7c1%7csl_10.

LAU, T. Y.; R. AMBEKAR a K. C. TOUSSAINT. Quantification of collagen fiber organization using three-dimensional Fourier transform-second-harmonic generation imaging. *Optics Express* [online]. WASHINGTON: OPTICAL SOC AMER, 2012, **20**(19), 21821-21832 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1364/OE.20.021821. ISSN 1094-4087. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-20-19-21821>.

LEGERLOTZ, K., J. DORN, J. RICHTER, M. RAUSCH a O. LEUPIN. Age-dependent regulation of tendon crimp structure, cell length and gap width with strain. *Acta Biomaterialia* [online]. OXON: ELSEVIER SCI LTD, 2014, **10**(10), 4447-4455 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.05.029. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706114002414>.

LOREN, G.; N. KARPINSKI a S. MUBARAK. Clinical implications of clubfoot histopathology. *Journal of Pediatric Orthopedics* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 1998, **18**(6), 765-769 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1097/00004694-199811000-00013. ISSN 02716798. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>.

MAGNUSSON, S. P.; K. QVORTRUP; J.O. LARSEN; S. ROSAGER; P. HANSON, P. AAGAARD; M. KROGSGAARD a M. KJAER. Collagen fibril size and crimp morphology in ruptured and intact Achilles tendons. *Matrix Biology* [online]. AMSTERDAM: ELSEVIER SCIENCE BV, 2002, **21**(4), 369-377 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/S0945-053X(02)00011-2. ISSN 0945053x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X02000112>.

MELLING, M.; K. TEHERANI; S. MOSTLER; M. BEHNAM; G. SOBAL a E. MENZEL. Changes of Biochemical and Biomechanical Properties in Dupuytren Disease. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [online]. NORTHFIELD: COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS, 2000, **124**(9), 1275-1281 [cit. 2017-03-28]. ISSN 1543-2165. Dostupné z: [http://www.archivesofpathology.org/doi/10.1043/0003-9985\(2000\)124%3C1275:COBAP%3E2.0.CO;2?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed&code=coap-site](http://www.archivesofpathology.org/doi/10.1043/0003-9985(2000)124%3C1275:COBAP%3E2.0.CO;2?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed&code=coap-site).

MERRILL, L. J.; Ch. A. GURNETT; M. SIEGEL; S. SONAVANE a M. B. DOBBS. Vascular Abnormalities Correlate with Decreased Soft Tissue Volumes in Idiopathic Clubfoot. *Clinical Orthopaedics and Related Research®* [online]. NEW YORK: SPRINGER, 2011, **469**(5), 1442-1449 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1007/s11999-010-1657-1. ISSN 0009-921x. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3069258/pdf/11999_2010_Article_1657.pdf.

MILLES, H.; R. REIHSNER; D. EBERHARD; R. MALLINGER; G. HAMILTON a E. MENZEL. The mechanical properties of the palmar aponeurosis and their significance for the pathogenesis of Dupuytren's contracture. *The Journal of Hand Surgery: Journal of the British Society for Surgery of the Hand* [online]. MIDLOTHIAN: CHURCHILL LIVINGSTONE, 1997, **22**(4), 510-517 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/S0266-7681(97)80279-3. ISSN 0266-7681. Dostupné z: [http://jhs.sagepub.com/cgi/doi/10.1016/S0266-7681\(97\)80279-3](http://jhs.sagepub.com/cgi/doi/10.1016/S0266-7681(97)80279-3).

MOON, D. K.; Ch. A. GURNETT; H. AFEROL; M. J. SIEGEL; P. K. COMMEAN a M. B. DOBBS. Soft-Tissue Abnormalities Associated with Treatment-Resistant and Treatment-Responsive Clubfoot. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* [online]. NEEDHAM: JOURNAL BONE JOINT SURGERY, 2014, **96**(15), 1249-1256 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.2106/JBJS.M.01257. ISSN 0021-9355. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>.

MORÁVEK, M. *Analýza strukturálních změn nanovlákněných scaffoldů vzhledem k jejich relativnímu prodloužení* [online]. Praha, 2016 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/133540/>. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce F. Lopot.

MURRAY, L. A.. Editorial: The Cell Types of Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology* [online]. LAUSSANE: FRONTIERS MEDIA S.A., 2016, **6** [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.3389/fphar.2015.00311. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4722104/pdf/fphar-06-00311.pdf>.

NORDIN, S.; M. AIDURA; S. RAZAK a W.I. FAISHAM. Controversies in Congenital Clubfoot: Literature Review. *The Malaysian journal of medical sciences* [online]. KELANTAN: UNIVERSITY SAINS MALAYSIAa, 2002, **9**(1), 34–40 [cit. 2016-11-27]. DOI: PMCI: PMC3436098. ISSN 1394-195X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3436098/>.

OSMAN, S.; J. L. SELWAY; P. E. HARIKUMAR; C. J. STOCKER; E. T. WARGENT; M. A. CAWTHORNE; S. JASSIM a K. LANGLANDS. A novel method to assess collagen architecture in skin. *BMC Bioinformatics* [online]. LONDON: BIOMED CENTRAL, 2013, **14**(1), 1-10 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1186/1471-2105-14-260. ISSN 1471-2105. Dostupné z: <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-14-260>.

OŠTÁDAL, M.; A. ECKHARDT; J. HERGET; I. MIKSIK; P. DUNGL; J. CHOMIAK; M. FRYDRYCHOVÁ a M. BURIAN. Proteomic analysis of the extracellular matrix in idiopathic pes equinovarus. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. DORDRECHT: SPRINGER, 2015, **401**(1-2), 133-139 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1007/s11010-014-2300-3. ISSN 0300-8177. Dostupné z: <http://link.springer.com.ezproxy.is.cuni.cz/article/10.1007/s11010-014-2300-3>.

OŠTÁDAL, Martin. *PES EQUINOVARUS: NOVÉ LÉČEBNÉ POSTUPY A PATOGENETICKÉ MECHANIZMY*. Praha, 2015. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta. Vedoucí práce Jan Herget, Jiří Chomiak.

PROVENZANO, P. P. a R. VANDERBY. Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biology* [online]. AMSTERDAM: ELSEVIER SCIENCE BV, 2006, **25**(2), 71-84 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/j.matbio.2005.09.005. ISSN 0945053x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X05001332>.

RAO, R. A. R.; M. R. MEHTA a K. C. TOUSSAINT. Fourier transform-second-harmonic generation imaging of biological tissues. *Optics Express* [online]. WASHINGTON: OPTICAL SOC AMER, 2009, **17**(17), 14534- [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1364/OE.17.014534. ISSN 1094-4087. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-17-17-14534>.

RODRÍGUEZ, C. A.; I. GARZÓN; J. G. GÓMEZ; et al. Identification of Histological Patterns in Clinically Affected and Unaffected Palm Regions in Dupuytren's Disease. *PLoS ONE* [online]. SAN FRANCISCO: PUBLIC LIBRARY SCIENCE, 2014-11-7, **9**(11), 1-12 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0112457. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0112457>.

RUMIAN, A. P.; A. L. WALLACE a H. L. BIRCH. Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features—a comparative study in an ovine model. *Journal of Orthopaedic Research* [online]. MALDEN: WILEY-BLACKWELL, 2007, **25**(4), 458-464 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1002/jor.20218. ISSN 07360266. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.20218>.

RUSSO, V.; A. MAURO; A. MARTELLI; O. DI GIACINTO; L. DI MARCANTONIO; D. NARDINOCCHI; P. BERARDINELLI a B. BARBONI. Cellular and molecular maturation in fetal and adult ovine calcaneal tendons. *Journal of Anatomy* [online]. HOBOKEN: WILEY-BLACKWELL, 2015, **226**(2), 126-142 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1111/joa.12269. ISSN 00218782. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/joa.12269>.

SANO, H., H. K. UHTHOFF, J. G. JARVIS, A. MANSINGH a G. F. C. WENCKEBACH. Pathogenesis of soft-tissue contracture in club foot. *The Journal of Bone and Joint Surgery* [online].

LONDON: BRITISH EDITORIAL SOC BONE JOINT SURGERY, 1998, **80**(4), 641-644 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1302/0301-620X.80B4.8526. ISSN 0301-620X. Dostupné z: <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/cgi/doi/10.1302/0301-620X.80B4.8526>.

SCOTT, W.A.; S.W. HOSKING a A. CATTERALL. Club foot: Observations on the surgical anatomy of dorsiflexion. *Bone and Joint Journal* [online]. BRITISH EDITORIAL SOCIETY OF BONE AND JOINT, 1984, **vol?66**(no. 1), 71-76 [cit. 2016-11-27]. DOI: PubMed 6693481. ISSN 2049-4408. Dostupné z: <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/jbjsbr/66-B/1/71.full.pdf>.

SIVAGURU, M.; S. DURGAM; R. AMBEKAR; D. LUEDTKE; G. FRIED; A. STEWART a K. C. TOUSSAINT. Quantitative analysis of collagen fiber organization in injured tendons using Fourier transform-second harmonic generation imaging. *Optics Express* [online]. WASHINGTON: OPTICAL SOC AMER, 2010, **18**(24), 24983- [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1364/OE.18.024983. ISSN 1094-4087. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-18-24-24983>.

SLUIJS, V.D. J.A. a J.E.H. PRUYS. Normal collagen structure in the posterior ankle capsule in different types of clubfeet. *JOURNAL OF PEDIATRIC ORTHOPAEDICS* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 1999, **8**(4), 261-263 [cit. 2017-03-28]. ISSN 1060-152X.

SODRE, H.; S. BRUSCHINI; L.A. MESTRINER; et al. ARTERIAL ABNORMALITIES IN TALIPES EQUINOVARUS AS ASSESSED BY ANGIOGRAPHY AND THE DOPPLER TECHNIQUE. *JOURNAL OF PEDIATRIC ORTHOPAEDICS* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT-RAVEN PUBL, 1990, **10**(1), 101-104 [cit. 2016-11-27]. DOI: PubMed ID: 2405019. ISSN 0271-6798.

SVENSSON, R. B.; P. HANSEN; T. HASSENKAM, et al. Mechanical properties of human patellar tendon at the hierarchical levels of tendon and fibril. *Journal of Applied Physiology* [online]. BETHESDA: AMER PHYSIOLOGICAL SOC, 2012, **112**(3), 419-426 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1152/jappphysiol.01172.2011. ISSN 8750-7587. Dostupné z: <http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jappphysiol.01172.2011>.

TANG, S.; W. TONG; W. SHEN; K. W. K. YEUNG a Y. LAM. Stringent requirement for spatial arrangement of extracellular matrix in supporting cell morphogenesis and differentiation. *BMC Cell Biology* [online]. LONDON: BIOMED CENTRAL, 2014, **15**(1), 1-11 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1186/1471-2121-15-10. ISSN 1471-2121. Dostupné z: <http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-15-10>.

THOMASON, D. B.; O. ANDERSON a V. MENON. Fractal analysis of cytoskeleton rearrangement in cardiac muscle during head-down tilt. *Journal of Applied Physiology*, NEW YORK: AMER INST PHYSICS, 1996, **81**(4), 1522-1527.

TOMASEK, J. J.; G. GABBIANI; B. HINZ; C. CHAPONNIER a R. A. BROWN. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. LONDON: NATURE PUBLISHING GROUP, 2002, **3**(5), 349-363 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1038/nrm809. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm809>.

VALENTA, J. a S. KONVIČKOVÁ. *Biomechanika člověka: Svalově kosterní systém 1. díl*. Dot. 1. vyd. Praha: České vysoké učení technické, 1997. ISBN 80-010-1452-5.

WANG, J. H.-C. Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics* [online]. OXFORD: ELSEVIER SCI LTD, 2006, **39**(9), 1563-1582 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2005.05.011. ISSN 00219290. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929005002265>.

WREN, T. A. L.; D. P. LINDSEY; G. S. BEAUPRÉ a D. R. CARTER. Effects of Creep and Cyclic Loading on the Mechanical Properties and Failure of Human Achilles Tendons. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. BIOMEDICAL ENGINEERING SOC AMER INST PHYSICS, 2003, **31**(6),

710-717 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1114/1.1569267. ISSN 0090-6964. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1114/1.1569267>.

ZHAO, D.F., Y. YUE, B. YANG a J. SHI. Changes of extracellular matrix of congenital clubfoot. *CHINESE JOURNAL OF CLINICAL REHABILITATION* [online]. 2005, (9(18), 230-231 [cit. 2016-11-27]. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/288566434_Changes_of_extracellular_matrix_of_congenital_clubfoot.

ZHU, J.; X. ZHANG; Y. MA; C. ZHOU a Y. AO. Ultrastructural and Morphological Characteristics of Human Anterior Cruciate Ligament and Hamstring Tendons. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* [online]. HOBOKEN: WILEY-BLACKWELL, 2012, **295**(9), 1430-1436 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1002/ar.22527. ISSN 19328486. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.22527>.

ZIMNY, M. L.; S. J. WILLIG; J. M. ROBERTS a R. D. DAMBROSIA; An ELECTRON-MICROSCOPIC STUDY OF THE FASCIA FROM THE MEDIAL AND LATERAL SIDES OF CLUBFOOT. *JOURNAL OF PEDIATRIC ORTHOPAEDICS* [online]. PHILADELPHIA: LIPPINCOTT-RAVEN PUBL, 1985, **5**(5), 577-581 [cit. 2017-03-28]. ISSN 0271-6798.

Seznam příloh

Příloha č. 1: Seznam obrázků

Příloha č. 2: Seznam grafů

Příloha č. 3: Seznam tabulek

Příloha č. 4: Souhlas etické komise

Příloha č 5: Informovaný souhlas

Příloha č. 1: Seznam obrázků

Obrázek 1: Pes equinovarus congenitus. Zdroj: Cooke a další, 2008	12
Obrázek 2: Pes equinovarus congenitus přítomný u lidského plodu. Zdroj: Fukuhara a další, 1994.....	13
Obrázek 3 Porovnání šířky fibril v příčném řezu vazivové tkáně člověka. Zobrazení pomocí TEM. A) vlevo: přední zkřížený vaz. B) vpravo: šlacha ze zadní skupiny stehenních svalů. Zdroj: Zhu a další, 2012	16
Obrázek 4 Porovnání zvlnění povrchu vazivové tkáně člověka. Zobrazení pomocí SEM. A) vlevo: přední zkřížený vaz. B) vpravo: šlacha ze zadní skupiny stehenních svalů. Zdroj: Zhu a další, 2012	16
Obrázek 5 Schéma hierarchické organizace šlacha. Zdroj: Wang, 2006	18
Obrázek 6 A) vlevo: Detail kolagenní fibrily s typickou periodicitou každých 64nm. Zobrazení pomocí TEM. Zdroj: Franchi a další, 2007. B) vpravo: Stále patrné fibrilární uzly při natažení myší šlacha. Zobrazení pomocí SEM. Zdroj: Franchi a další, 2007 (2)	19
Obrázek 7: Organizaie mikrostruktury šlacha během vývoje. Zobrazení pomocí SEM. A) vlevo nahoře: raný fetální vývoj šlacha ovce. B) vpravo nahoře: pozdější fetální vývoj šlacha u myší. C) dole: Dospělá myší šlacha. Zdroj: Provenzano a Vanderby, 2006.....	22
Obrázek 8 Závislost napětí a deformace šlacha. Ilustrace chování kolagenních vláken. Zdroj: Wang, 2006	24
Obrázek 9 Pracovní diagram tahové zkoušky. I. Úpatí, nebo také oblast bez odezvy napětí, II. Lineární oblast, III. Oblast plastické deformace 1. Mez úměrnosti, 2. Mez kluzu, 3. Mez pevnosti Zdroj: vlastní.....	26
Obrázek 10 Pracovní diagramy tělesa ve třech různých rychlostech (v) zatížení. Zdroj: vlastní	29
Obrázek 11 Náhlá deformace a odlehčení konstantní velikosti (nahore) a silová odezva tělesa v čase. Zdroj: vlastní	30
Obrázek 12 Hysterezní křivka. Zdroj: vlastní	31
Obrázek 13 Cyklická deformace konstantní velikosti a rychlosti (nahore) a snižující se silová odpověď tělesa v čase. Zdroj: vlastní.....	31
Obrázek 14 Vliv viskozity na hysterezní křivky tří po sobě jdoucích cyklů zátěže v rámci plně elastického regionu. Zdroj: vlastní	32

Obrázek 15 Porovnání mikrostruktury vazivové tkáně u lidského plodu s PEC a lig. calcaneonaviculare nepostiženého plodu. Fotomikrografie barveného vzorku ze světelného mikroskopu. A) vlevo: fibrotická tkáň mediální strany PEC. B) vpravo: lig. calcaneonaviculare. Zdroj: Fukuhara a další, 1994	41
Obrázek 16 3D model trhačky. 1) Silové čidlo, 2) motor, 3) nosič čelistí, 4) vodící tyč pro čelisti, 5) čelist, 6) upnutí vzorku 7) závitová pohybová tyč pro motor. Zdroj: Iška, 2016.....	46
Obrázek 17 Ovládací panel pro tester	47
Obrázek 18 Hrubá data z trhačky uložena v textovém souboru.....	48
Obrázek 19 Schéma sestavy mikroskopu	49
Obrázek 20 Fotka vzorku Achillovy šlachy králíka.....	50
Obrázek 21 Upnutí a natažený vzorek v čelistech testeru.....	51
Obrázek 22 SHG snímky vzorku šlachy králíka během pěti kroků prodloužení	52
Obrázek 23 Uložení vzorku na upravené trhačce.....	54
Obrázek 24 A) vlevo: natažený a částečně přetržený vzorek po ukončení testování v trhačce B) vpravo: uložení vzorku na hrubé náplasti před upevněním horní poloviny čelisti	56
Obrázek 25 Demonstrativní fotografie vzorku 3b A) vlevo: Znázornění vedení přímek pro měření počtu pixelů napříč vzorkem B) vpravo: vzorek na sklíčku vedle měřítka.....	58
Obrázek 26 Demonstrace úpravy křivky.....	60
Obrázek 27 Vzorek 1 vcelku před zmrazením	72
Obrázek 28 Vzorek 1 vcelku před zmrazením - odvrácená strana.....	73
Obrázek 29 Vzorek 3 vcelku ze dvou odvrácených stran před zmrazením	74
Obrázek 30 A) nahoře: fotografie vzorku 1 vcelku B) dole: fotografie vzorku 3 vcelku (označení 3a na snímku je připraveno pro první polovinu tohoto vzorku).....	75
Obrázek 31 Reakce vzorků na deformaci v sérii krátkých kroků (0.1mm). Od shora vzorky 1a, 1b, 3a, 3b. První snímek reprezentuje stav po upnutí do čelistí, druhý stav v polovině série a třetí stav na konci série.....	77
Obrázek 32 Reakce vzorku 1a na deformaci v sérii dlouhých kroků (1mm). Vlevo stav po ukončení série krátkých kroků, uprostřed stav v polovině série dlouhých kroků a vpravo stav na konci série dlouhých kroků	79
Obrázek 33 Reakce vzorků na deformaci v sérii dlouhých kroků (1mm). Od shora vzorky 1b, 3a, 3b. První snímek reprezentuje stav po upnutí do čelistí, druhý stav v polovině série a třetí stav na konci série	81

Obrázek 34 Vzorek 3a. Změna orientace vláken vzorku ve třech úrovních natažení. Stupně jsou průměrnou hodnotou ze třech přímk. Úhel je počítán od horizontály proti směru hodinových ručiček	83
Obrázek 35 Tuková tkáň a cévní zásobení tkáně	84
Obrázek 36 A) vlevo: prověšení vzorku v čelistech. Střed vzorku mimo rovinu zaostření. B) vpravo: doostření středu vzorku	85
Obrázek 37 A) vlevo: Snímek vzorku 1a před upnutím. B) vpravo: snímek vzorku 1a po natažení o 23.5 %	86
Obrázek 38 Obrázek Grafu 20 ze str. 89	92

Příloha č. 2: Seznam grafů

Graf 1 Závislost síly na čase. Data jednoho kroku získaná během předeexperimentu na šlachách králíka.....	52
Graf 2 Závislost síly a délky vzorku na čase. Červená křivka značí kinematické zatížení (deformací) v deseti krocích. Modrá křivka je složena ze záznamu síly během testování. Přes zjevné značné zatížení křivky šumem, je patrný počáteční růst reakční síly následovaný poklesem, kdy došlo k vyklouzávání vzorku z čelistí.....	53
Graf 3 Záznam silové odezvy vzorku s artefakty.....	59
Graf 4. Závislost síly na čase během čtyř kroků (1mm). Upravená křivka.....	60
Graf 5 Záznam vzdálenosti čelistí (vzorku) v čase během čtyř kroků (1mm).....	61
Graf 6 Křivka vypočtené poměrné deformace v závislosti na čase.....	61
Graf 7 Křivka vypočteného napětí v závislosti na čase během čtyř kroků (1mm).....	62
Graf 8 Křivka síly a změny délky v závislosti na čase.....	63
Graf 9 Křivka vypočteného napětí a změny délky v závislosti na čase.....	63
Graf 10 Křivka síly a délky vzorku v čase během krátkých kroků 0.1mm. Silová křivka je proložena lineární spojnicí trendu.....	64
Graf 11 Křivky vzestupných částí kroků.....	65
Graf 12 Překrytí vzestupné části křivek po přesunutí jejich počátku na bod 0.....	66
Graf 13 Křivky relaxace každého kroku zvlášť.....	67
Graf 14 Invertovaná křivka napětí. Překrytí křivek je dosaženo posunutím jejich počátku na bod 0.....	68
Graf 15 Překrytí křivky napětí během skokové softwarové změny vzdálenosti čelistí na bodovém grafu.....	69
Graf 16 Výsledek modelování pomocí proložení křivek relaxace exponenciálami.....	70
Graf 17 Tuhost vzorku 1b v jednotlivých krocích tahové zkoušky.....	87
Graf 18 Tuhost vzorku 3a v jednotlivých krocích tahové zkoušky.....	88
Graf 19 Tuhost vzorku 3b v jednotlivých krocích tahové zkoušky.....	88
Graf 20 Porovnání absolutních hodnot tuhosti a chování vzorků 3a a 3b napříč kroky tahové zkoušky.....	89
Graf 21 Porovnání absolutních hodnot tuhosti a chování vzorků 1a a 3b napříč kroky tahové zkoušky.....	89

Příloha č. 3: Seznam tabulek

Tabulka 1 Naměřené délkové hodnoty vzorku 1a.....	80
Tabulka 2 Skutečný a měřený posun čelistí a pohyb struktury vzorek 1a	80
Tabulka 3 Naměřené hodnoty u vzorku 3b	82
Tabulka 4 Skutečný a měřený posun čelistí a pohyb struktury vzorek 3b	82
Tabulka 5 Porovnání procentuální změny šíře vzorku a vybrané struktury.....	82
Tabulka 6 Naměřené šířkové rozměry vzorku 3a	83
Tabulka 7 Naměřené šířkové rozměry a jejich změna v průběhu deformace u vzorku 1b	83

Příloha č 4: Souhlas etické komise



NEMOCNICE NA BULOVICE
ETICKÁ KOMISE
180 81 Praha 8, Budínova 2

Vážený pan
MUDr. Martin Ošťádal (spolupříjemce)
Ortopedická klinika NNB
Zde

Praha 29. března 2016

Věc: schválení výzkumného projektu

Vážený pane doktore,

Etická komise NNB na svém mimořádném zasedání dne 29. března 2016 projednala a schválila Váš grantový projekt s názvem „Korelativní přístup k poruchám mezibuněčné hmoty“ od proteinů k uspořádání tkáně u idiopatického onemocnění pes equinovarus“ na základě předložené dokumentace: anotace projektu, návrh informovaného souhlasu pro pacienta a seznam členů řešitelského týmu (evidenční číslo 22.3.2016/8014/EK-Z).

S pozdravem

MUDr. Ferdinand Třebický
předseda Etické komise NNB

NEMOCNICE NA BULOVICE
180 81 Praha 8, Budínova 2
ETICKÁ KOMISE
TEL: 226 081 111 (3) IČO: 00084211

Příloha č 5: Informovaný souhlas

Informovaný souhlas

Pacient:

Rodné číslo:

Vážená paní, vážený pane,

jste léčen na Ortopedické klinice v Nemocnici Na Bulovce s onemocněním *pes equinovarus*. Nabízíme Vám možnost účastnit se vědecké studie „Korelativní přístup k poruchám mezibuněčné hmoty: od proteinů k tkáňovým strukturám u idiopatického onemocnění *pes equinovarus*“, jejímž cílem je sledovat a hlouběji analyzovat průběh onemocnění *pes equinovarus*, což by mělo v budoucnu sloužit k správnému pochopení jejich vzniku. Ze zdravotnické dokumentace vedené na tomto pracovišti budou rovněž získány některé základní údaje týkající se Vaší léčby, vyšetření a případných onemocnění v souvislosti s Vaším onemocněním. Vaše účast projektu, pokud se pro ni rozhodnete, je zcela dobrovolná. Ze studie rovněž můžete kdykoliv vystoupit a toto rozhodnutí nebude mít vliv na Vám poskytovanou péči. Výhodou účasti ve studii je, že některé laboratorní výsledky budou okamžitě dostupné Vašemu ošetřujícímu lékaři, což slouží k lepšímu sledování vývoje nemoci, pro kterou jste hospitalizován(a). Projekt byl schválen Etickou komisí Nemocnice Na Bulovce.

Prosíme Vás o souhlas s vyšetřením fibrotické tkáně která bude odebrána v rámci Vašeho operačního výkonu ošetření na klinice. **Vzorky nebudou použity k jinému výzkumu** a po vyšetření sledovaných laboratorních ukazatelů budou zlikvidovány. V žádném případě nebude testován Váš genetický materiál (DNA či RNA).

Vzorky budou zcela anonymizovány; zkumavka s krví bude označena pouze kódem, nikoliv jménem či jiným identifikátorem.

Pokud výsledky studie budou publikovány, Vaše údaje budou zcela anonymizovány a konkrétní osobu nebude možné na základě zveřejněných výsledků dohledat.

Datum, jméno a podpis lékaře

Potvrzuji tímto, že jsem byl(a) informován(a) o podmínkách výzkumné studie a že jsem se dobrovolně rozhodl(a) pro účast na tomto projektu. Informace mi byly vysvětleny a rozumím podstatě i účelu projektu. Měl jsem možnost klást dotazy a tyto mi byly přiměřeně zodpovězeny.

Datum, jméno a podpis pacienta

Tento informovaný souhlas je vyhotoven ve dvou stejnopisech, které mají platnost originálu. Jeden bude uchován v pacientově dokumentaci, a to po dobu upravenou právním předpisem pro uchovávání zdravotnické dokumentace a druhý obdrží pacient.