

# UNIVERZITA KARLOVA

## 1. lékařská fakulta

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Fyzioterapie



**Karel Fošumpaur**

**Efekt elektrické stimulace na hojení měkkých tkání**

Effect of electrical stimulation on soft tissue healing

**Bakalářská práce**

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Jakub Jeníček, Ph.D.

Praha, 2022



## **ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ**

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

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne .....

..... Karel Fošumpaur

## **PODĚKOVÁNÍ**

Za odborné vedení této bakalářské práce, trpělivost a ochotu, také za cenné a podnětné rady při zpracovávání práce děkuji vedoucímu práce panu Mgr. Jakubovi Jeníčkovi, Ph.D.

## **IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM**

FOŠUMPAUR, Karel. *Efekt elektrické stimulace na hojení měkkých tkání. [Effect of electrical stimulation on soft tissue healing]*. Praha, 2022. 103 s. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika rehabilitačního lékařství. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Jakub Jeníček, Ph.D.

## **ABSTRAKT**

**Jméno, příjmení:** Karel Fošumpaur

**Vedoucí práce:** Mgr. Jakub Jeníček, Ph.D.

**Oponent práce:**

**Název práce:** Efekt elektrické stimulace na hojení měkkých tkání

**Abstrakt bakalářské práce:** Tato bakalářská práce shrnuje současnou úroveň poznání ohledně efektivity elektrické stimulace na hojení měkkých tkání prostřednictvím zpracování přehledu problematiky. Cílem práce je popsat současnou úroveň výzkumu dané problematiky z hlediska jeho úplnosti, aktuální fáze a limitací. Systematickou rešerší bylo dosaženo patnácti odborných, relevantních článků, které byly do práce zařazeny a analyzovány. Pomocí analytického rozboru a zhodnocení studií je určeno zda a za jakých podmínek je elektrická stimulace pro hojení měkkých tkání efektivní. Mezi prezentované články patří studie testující efektivitu elektrické stimulace pro hojení strukturálně poškozené svaloviny, šlach, kůže a vaziva. Práce přináší převážně pozitivní závěr ohledně hojivého efektu elektrické stimulace.

**Klíčová slova:** elektrická stimulace, hojení, měkké tkáně, sval, šlacha, kůže, vazivo, vaz, regenerace, reparace, elektroterapie

## **ABSTRACT**

**First and last name:** Karel Fošumpaur

**Supervisor:** Mgr. Jakub Jeníček, Ph.D.

**Opponent of the thesis:**

**Name of the thesis:** Effect of electrical stimulation on soft tissue healing

**Abstract of the thesis:** This bachelor thesis summarizes the current state of knowledge regarding the effectiveness of electrical stimulation on soft tissue healing by providing an overview of the issue. The aim of the thesis is to describe the current level of research on the subject in terms of its completeness, current stage and limitations. Fifteen peer-reviewed, relevant articles were included and analyzed through a systematic search. Through analytical analysis and evaluation of the studies, it is determined whether and under what conditions electrical stimulation is effective for soft tissue healing. The articles presented include studies testing the effectiveness of electrical stimulation for healing structurally damaged muscle, tendon, skin and ligament. The work provides a largely positive conclusion regarding the healing effect of electrical stimulation.

**Key words:** electrical stimulation, healing, soft tissue, muscle, tendon, skin, connective tissue, ligament, regeneration, reparation, electrotherapy





## Obsah

1 Úvod.....	11
2 Teoretická východiska práce.....	12
2.1 Regenerace a reparace.....	12
2.2 Měkké tkáně.....	13
2.3 Strukturální svalová poranění.....	13
2.3.1 Částečné svalové ruptury.....	14
2.3.2 Subtotální a totální svalové ruptury.....	14
2.3.3 Svalové kontuze a lacerace.....	14
2.4 Proces hojení strukturálně poraněné kosterní svaloviny.....	15
2.4.1 Role satelitních buněk pro svalovou regeneraci.....	16
2.4.2 Vaskularizace.....	17
2.5 Strukturální poranění šlach.....	18
2.6 Proces hojení strukturálně poraněné šlachy.....	19
2.6.1 Operativní léčba ruptur šlach.....	19
2.7 Kůže a podkoží.....	20
2.7.1 Regenerativní potenciál kůže a podkoží.....	20
2.7.2 Klasifikace ran.....	20
2.7.3 Proces hojení povrchové rány.....	21
2.7.4 Aktivní jizva.....	22
2.8 Vazivo.....	23
2.9 Přímý a nepřímý hojivý účinek fyzikální terapie.....	24
2.10 Elektrická stimulace.....	25
2.10.1 Parametry elektrické stimulace.....	26
3 Metodologie práce.....	28
3.1 Cíl bakalářské práce.....	28
3.2 Metoda zpracování systematické rešerše a vyhledávací kritéria.....	28
3.2.1 Shrnutí vyhledávacích kritérií.....	30
3.3 Metodologie analýzy odborné literatury.....	31
4 Výsledky systematické rešerše.....	32
5 Analýza odborné literatury.....	36
5.1 Efekt elektrické stimulace pro hojení svalové tkáně.....	36

5.1.1 Studie FUJIYA et al. (2015).....	36
5.1.2 Studie WANG, QING-ZHNEG a DONG-MING (2021).....	40
5.1.3 Studie ZICKRI (2014).....	43
5.1.4 Studie YOSHIDA et al. (2015).....	46
5.1.5 Studie VADLAMANI et al. (2019).....	50
5.1.6 Studie BOSUTTI et al. (2019).....	53
5.1.7 Souhrn výsledků studií elektrické stimulace pro hojení svalové tkáně.....	55
5.2 Efekt elektrické stimulace pro hojení šlach.....	57
5.2.1 Studie CHAN, FUNG a NG (2007).....	57
5.2.2 Studie CASAGRANDE et al. (2021).....	59
5.2.3 Studie RAMPAZO et al. (2016).....	63
5.2.4 Studie BERETTA et al. (2009).....	65
5.2.5 Studie AHMED, ELGAYES a IBRAHIM (2011).....	67
5.2.6 Souhrn výsledků studií elektrické stimulace pro hojení šlach.....	70
5.3 Efekt elektrické stimulace pro hojení kůže a vazů.....	72
5.3.1 Studie GÜRGEN et al. (2013).....	72
5.3.2 Studie ABEDIN-DO et al. (2021).....	74
5.3.3 Studie BRAVO et al. (2021).....	77
5.3.4 Studie CHAO et al. (2007).....	79
5.3.5 Souhrn výsledků studií elektrické stimulace pro hojení kůže a vazů.....	82
6 Diskuze.....	83
6.1 Diskuze nad tématem bakalářské práce.....	83
6.2 Diskuze nad současným stavem výzkumu.....	84
6.3 Diskuze k efektivitě elektrické stimulace pro hojení měkkých tkání.....	85
6.4 Diskuze nad vedlejšími přínosy výzkumu.....	88
6.5 Diskuze ohledně parametrů elektrické stimulace pro hojení měkkých tkání.....	89
6.6 Argumentace pro strukturu kapitoly teoretických východisek.....	90
7 Závěr.....	91
8 Seznam literatury.....	92
9 Seznam zkratk.....	101
10 Seznam obrázků.....	102
11 Seznam tabulek.....	103

# 1 Úvod

Proces hojení měkkých tkání je z hlediska fyzioterapie důležitým faktorem, který rozhoduje o budoucí funkci a biomechanických vlastnostech poraněné tkáně. Při nekvalitním či pomalém hojení svalů, šlach, vazů či kůže může poranění fibrotizovat, tvořit adheze a negativně tak ovlivnit pohybové stereotypy, funkci, či sílu segmentu a sekundárně celého těla. Další komplikace, které mohou doprovázet nekvalitní hojení měkkých tkání, jsou například: rhabdomyolýza, osifikace, kalcifikace, či kompartment syndrom (Alessandrino, 2013). Proto obory a léčebné postupy jako regenerativní medicína, farmakologie, či elektroterapie přichází s řešeními, které by mohly pozitivně ovlivnit regenerační či reparační procesy strukturálně poraněných měkkých tkání.

Jeden z přístupů k prevenci zmíněných patologií je elektrická stimulace, jejíž hojivý efekt je testován současným výzkumem. V českém prostředí je však povědomí o tomto výzkumu minimální. V rámci fyzikální terapie jsou popsány již známé účinky terapeutického elektrického proudu pro lidský organismus jako jsou například: analgezie, antiedematózní účinek, trofotropní účinek, či neurostimulace. Hojivý efekt založený na facilitaci aktivity kmenových buněk či fibroblastů, to jest buněk přímo zodpovědných za tkáňovou regeneraci, respektive reparaci, je ale dosud předmětem testování. Fyzikální terapie již disponuje osvědčenými léčebnými postupy, pomocí kterých se snaží podpořit hojivé procesy poraněných měkkých tkání nepřímo – to jest formou zvýšení prokrvení v místě poranění. Je to například magnetoterapie, nízko-výkonný laser či galvanoterapie (Navrátil, 2019).

Cílem mé bakalářské práce je shrnout současnou úroveň poznání ohledně zmíněného hojivého efektu na měkké tkáně prostřednictvím zpracování přehledu problematiky. Popsání současného výzkumu, jeho aktuální fáze a limitací tak umožní jednodušší orientaci v problematice. K zhotovení přehledu problematiky dospěji pomocí systematické rešerše aktuální literatury. V druhé řadě pomocí analýzy studií opatřených rešerší zjistím zda a za jakých podmínek je elektrická stimulace pro hojení měkkých tkání efektivní. Převládající pozitivní závěry studií hovořící o efektivitě a terapeutickém potenciálu elektrické stimulace by tak mohly být přínosem pro obor fyzikální terapie a pokrokem v léčbě strukturálních poranění měkkých tkání vzniklých například při sportu či jiné fyzické aktivitě.

## 2 Teoretická východiska práce

### 2.1 Regenerace a reparace

Regenerace a reparace jsou progresivní změny vyvolané ve většině případů poraněním tkáně. Jedná se o procesy zprostředkující náhradu poškozené nebo ztracené tkáně. (Vokurka et al., 2012).

*Regenerace* je náhrada zcela rovnocennou tkání po stránce funkční i morfologické.

Podle schopnosti tkání regenerovat rozlišujeme tkáně (Bártová, 2015; Kendall, 2018):

- 1) **Permanentní:** neschopné regenerace. Poškozené tkáně se hojí jizvou. Jedná se například o srdeční svalovinu
- 2) **Stabilní:** schopné regenerovat pouze za určitých podmínek (podkapitola 2.4.1), nejčastěji v případě zranění. Do této skupiny tkání patří například játra, kosterní svalovina nebo ledviny.
- 3) **Labilní:** regenerují neustále – například epiteliální buňky kůže, kostní dřev.

Toto rozlišení dle schopnosti regenerovat se shoduje v tuzemské i zahraniční literatuře. Ve většině případů je pro regeneraci nutná přítomnost tkáňově vlastních kmenových buněk, které jsou po proliferaci schopné diferencovat do stejných buněk, které byly poraněním ztraceny.

*Reparace* je náhrada méněcennou tkání, nejčastěji tkání pojivovou (vazivová jizva). Reparace se dělí na hojení *per primam* a *per secundam*. Hojení *per primam* probíhá bez větších známek zánětu a infekce (čisté řezné rány s blízkými okraji). Hojení *per secundam* zahrnuje závažnější, rozsáhlé a plošné rány, které doprovází infekce. Vznikají rozsáhlé jizvy (Bártová, 2015).

Zásadní roli v procesu reparace hrají fibroblasty, které proliferují a tvoří kolagen různých typů, který organizací svých vláken formuje extracelulární matrix a výslednou jizvu. Reparace je tedy žádoucí vazivová přestavba, která má za cíl opravit strukturální poškození tkání, kde je omezená nebo nemožná regenerace z důvodu nepřítomnosti či nedostatečnosti kmenových buněk. Dále platí, že reparace je prioritní způsob hojení chabě vaskularizovaných poraněných tkání (Bártová, 2015). Reparace je ale i děj při kterém dochází k organizaci

hematomu nebo trombu, vhojování cizích těles, hojení zlomenin a hojení defektů nervové tkáně. Pro účely bakalářské práce shrnuji regeneraci a reparaci pojmem *hojení*.

## 2.2 Měkké tkáně

Měkké tkáně je souborný název pro tkáně, které nebyly ztvrzeny osifikačním nebo kalcifikačním procesem a obklopují, spojují a podporují vnitřní orgány a kosti. Mezi měkké tkáně tak patří svaly, šlachy, fascie, vazivo, podkoží a kůže. (Mescher, 2018). Na základě výše zmíněné definice přiřazují někteří autoři k měkkým tkáním i cévy a nervy (Ibrahim, 2016).

Z pohledu odborného zaměření fyzioterapie se měkkými tkáněmi nejčastěji míní právě kůže, podkoží, fascie, svaly, šlachy a vazivo. Tyto a další struktury související s pohybovým aparátem se fyzioterapie snaží ovlivnit pomocí myoskeletální medicíny (Rychlíková, 2004).

Měkké tkáně mají schopnost reagovat na dlouhodobé mechanické a chemické podněty přestavbou nebo růstem. Mezi tyto podněty patří například zranění nebo časté přetěžování. Růst nebo přestavba tak mohou být jevem fyziologickým: například růst svalů v reakci na trénink, nebo patofyziologickým: například vznik fibróz či stenóz (Vokurka et al., 2012).

## 2.3 Strukturální svalová poranění

Obsáhlý klasifikační systém svalových poranění a poruch zhotovil Mueller-Wohlfahrt et al. Já jsem z jeho klasifikačního systému vybral pouze strukturální poranění z důvodu uvedeného výše.

Strukturální svalová poranění s makroskopickým důkazem jsou převážně nepřímá. Vznikají náhlým protažením svalových vláken nad limit své elasticity či nadměrným mechanickým napětím. Tato poranění jsou obvykle lokalizována na přechodu svalu v šlachu (Jakobsen, 2021). Přímá poranění jsou zmíněné kontuze a lacerace. Izolované poranění jednoho svalového vlákna je symptomaticky němé. Symptomy jako bolest, omezená možnost sval kontrahovat a hematom jsou zřetelné až při přetržení jednoho a více primárních snopců. Diagnostika strukturálních poranění je opatřena pomocí vyšetření MRI nebo ultrasonografie (Ferko et al., 2015), dále je zásadní anamnéza pro zjištění mechanismu poranění a aspekční vyšetření.

Nejčastěji k těmto typům zranění dochází u sportovců s nedostatkem odpočinku (Kreher, 2012), protože svaly při neustálém zatěžování nemají možnost plně zregenerovat a na zátěž se adaptovat. Poranění svalů tak mohou být součástí syndromu přetrénování

u sportovců. Může k nim dojít i u nesportovců, kteří situačně vystaví své svaly nepřiměřenému mechanickému napětí či protažení.

### **2.3.1 Částečné svalové ruptury**

Mueller-Wohlfahrt doporučuje klasifikovat strukturální svalová poranění podle velikosti anatomického nálezu. Částečné svalové ruptury dělí na menší – na úrovni jednoho a více primárních svalových snopců a střední – na úrovni jednoho a více sekundárních svalových snopců. V obou případech dochází i k narušení perimysia.

Konzervativní léčba zahrnuje podávání NSAIDs, ledování, imobilizaci a klidový režim. Menší ruptury většinou zcela zregenerují za 2-4 týdny. V případě středních ruptur dochází ve většině případů k hojení reparací a tvorbou vazivové jizvy (kapitola 2.4). Tento proces trvá dle velikosti poranění 4-8 týdnů (Mueller-Wohlfahrt et al., 2012).

### **2.3.2 Subtotální a totální svalové ruptury**

Subtotální svalové ruptury jsou častější než totální. Jako subtotální ruptura se klasifikuje přerušeni kontinuity více než poloviny průměru svalu. Totální i subtotální ruptura se projeví omezenou nebo úplnou ztrátou funkce, bolestí a rozsáhlým hematodem. Léčba je převážně operativní. Po sešití odtržených konců svalů k sobě dochází k srůstu kolagenní jizvou (Mueller-Wohlfahrt et al., 2012). Rozsah této vazivové jizvy záleží na faktorech jako jsou: míra vaskularizace, míra aktivity svalových kmenových buněk (podkapitola 2.4.1), kvalita operace a rehabilitace.

### **2.3.3 Svalové kontuze a lacerace**

Při pohmoždění svalu může vést k radiálnímu narušení struktury svalových vláken v místě úderu, nicméně ve většině případů zůstává integrita struktur zachována. Vzniká rozptýlený nebo ohraničený hematod. Kontuze jsou méně bolestivé než ruptury. Závažná komplikace kontuze spočívá ve vzniku kompartment syndromu. Léčba zahrnuje ledování, klidový režim, popřípadě elevaci končetiny (Mueller-Wohlfahrt et al., 2012).

Lacerace je způsobena hlubokou řeznou či tržnou ránou narušující povrchovou fascii a sahající až do masy svalu. Léčbou je neprodlená operace – sešití tkání. Po operaci dochází během týdnů k tvorbě jizvy, která prostupuje zasažené tkáně (Mueller-Wohlfahrt et al., 2012). Stejně jako v případě ruptur je na místě imobilizace, ledování a klidový režim po čas rekonvalescence (Oliva, 2013).

## 2.4 Proces hojení strukturálně poraněné kosterní svaloviny

Proces hojení strukturálně poraněné svaloviny vysvětlím na příkladu menší částečné ruptury svalu. V tomto případě došlo k narušení integrity primárních svalových snopců, to znamená: přerušení svalových vláken a jejich endomysia, přerušení cév zásobující tato vlákna a přerušení perimysia primárního snopce. Místo poranění lze rozdělit na odtržené konce a centrální zónu (mezera vyplněná hematodem). Veškeré děje probíhající během procesu hojení jsou podpořeny přítomnými růstovými faktory (Järvinen et al., 2000). *Obrázek 2.4.1* zobrazuje fáze hojení kosterní svaloviny na úrovni více svalových vláken (číslíce nad ilustracemi značí den hojení), *Obrázek 2.4.2* znázorňuje centrální zónu.

1-2. den: V místě poranění vzniká zánět. Distální konce poraněných svalových vláken degenerují, nekrotizují a jsou odstraněny makrofágy.

3-4. den: Zánět aktivuje proliferaci a diferenciaci satelitních buněk v myoblasty. Fibrin a fibronectin přítomný v místě hematomu iniciují formaci extracelulárního matrixu, který stimuluje fibroblasty k tvorbě kolagenu. V počátku je fibroblastická aktivita výhodná, protože kolagen tvoří basální laminy, které slouží jako „vodiče“ pro nově vznikající svalová vlákna.

5-6. den: Myoblasty fúzí v myotubuly, svalová vlákna tak regenerují a jejich konce se přibližují k sobě a uzavírají centrální zónu. Zároveň se centrální zóna plní kolagenem vyprodukovaným fibroblasty a vzniká tak pojivová tkáň.

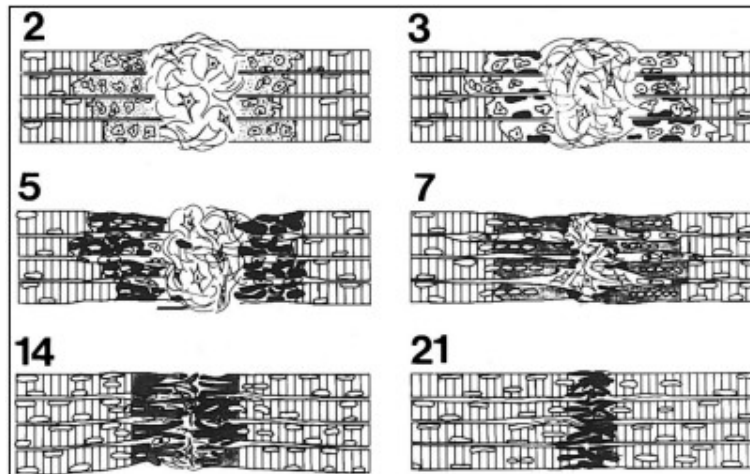
7-13. den: Svalová vlákna odtržených konců dále regenerují a částečně prorůstají pojivovou tkáň v centrální zóně. Nakonec se části svalových vláken podaří dotknout druhého konce vlákna a srůst. Zbylé konce svalových vláken se pouze přiblíží a mezi nimi zůstane pojivová tkáň.

14-20. den: Pojivová tkáň v centrální zóně se dále aktivitou fibroblastů zhušťuje a tvoří jizvu.

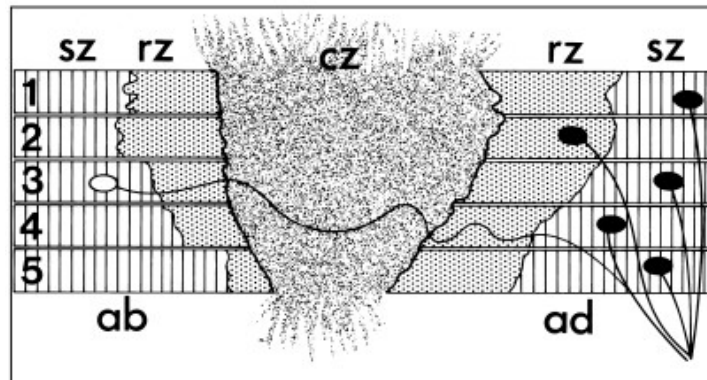
21-30. den: Jizva je finálně dotvořena. Skládá se z probíhajících svalových vláken, do kterých z části zasahuje pojivová tkáň.

Následuje nejdelší fáze – remodelace, která může trvat měsíce, v závislosti na závažnosti poranění. Remodelace je proces, kdy dochází k maturaci regenerujících vláken, reorganizaci kolagenních vláken pojivové tkáně.

Obrázek 2.4.1: Fáze hojení svalových vláken (Järvinen et al., 2000)



Obrázek 2.4.2: Centrální zóna (Järvinen et al., 2000)



Legenda k Obrázku 2.4.2: sz – survival zone (zóna zdravých vláken), rz – regenerating zone (zóna regenerující zvláken), cz – central zone (centrální zóna), ab – abjunction stumps (abjunkční pahýly), ad – adjunction stumps (adjunkční pahýly)

### 2.4.1 Role satelitních buněk pro svalovou regeneraci

Satelitní buňky jsou lokalizovány mezi sarkolemou a bazální laminou svalového vlákna. Jedná se funkčně o kmenové buňky kosterní svaloviny, které jsou za fyziologických podmínek v klidové fázi (G0 fáze buněčného cyklu). Podnět pro jejich aktivaci a přestup do fáze G1 a následnou proliferaci je traumatizace svalového vlákna, na jehož sarkolemě je satelitní buňka připojená. Satelitní buňky po proliferaci diferencují v myoblasty, které zacelí vzniklou „trhlinu“ ve svalovém vláknu. Část satelitních buněk nediferencuje a usadí se na



povrchu sarkolemy pro budoucí regenerační procesy. Výsledné, opravené, svalové vlákno je silnější, má větší průměr a lépe reaguje na mechanický stres. Právě tento proces je jedním ze způsobů hypertrofie kosterní svaloviny, ke které dochází vlivem sportovního tréninku. Dochází k mikrotraumatizaci na úrovni svalových vláken, která jsou následně na trénink adaptována díky regeneraci zprostředkované satelitními buňkami. Dle definice regenerace se tedy jedná o náhradu ztracené tkáně rovnocennou tkání, nicméně je tomu tak pokud dochází k traumatizaci pouze na úrovni svalových vláken. Jakékoli poranění zahrnující narušení integrity struktur nadřazených svalovým vláknům (endomysium, primární snopec atd.) spouští kromě proliferace satelitních buněk také proliferaci fibroblastů a tvoří se pojivová tkáň. Dochází též k narušení drobných cév, což vyústí k tvorbě hematomu a zánětu (Hill et al., 2003; Alarcin et al., 2021).

#### **2.4.2 Vaskularizace**

Vaskularizace svalových vláken v místě poranění je esenciální pro regeneraci, kvůli přísunu kyslíku a živin potřebných pro proteosyntézu.

„Nové kapiláry vyklíčí z cév, které poranění přežili, a prorostou do centrální zóny. Nové myotubuly mají průměrný aerobní metabolismus, ale silně zvýšenou aktivitu anaerobního metabolismu. Nicméně aerobní metabolismus je hlavní energetickou cestou během finální fáze regenerace mnohjaderných svalových vláken. Proto přechod myotubul ve svalová vlákna nemůže být uskutečněn dokud kapilární řečiště nezprostředkuje dostatek kyslíku pro aerobní metabolismus.“ (Järvinen et al., 2000, s. 158). Bez dostatečné vaskularizace vždy převládá proces kolagenní přestavby a fibróza v místě centrální zóny.

Regenerace svalových vláken aktivitou satelitních buněk a tvorba jizevnaté tkáně v centrální zóně jsou dva současné děje. Který děj převládá je zásadně stanovené anatomických rozsahem poranění, potažmo rozsahem centrální zóny (mezery). Klinicky se tedy dá odvodit, že velikost hematomu určí velikost budoucí jizevnaté tkáně. Z funkčního hlediska je žádoucí, aby vznikla co „nejužší“ jizva. Proto v případě rozsáhlejších ruptur nebo lacerací je nutné sešítí konců, jinak by hrozila tvorba velké jizvy, což by zásadně ovlivnilo funkci svalu (pohybový stereotyp, sílu) (Laumonier, 2016). Zjednodušeně řečeno, čím blíže si budou konce svalu rozděleného poraněním, tím lépe pro rychlost rekonvalescence a rehabilitaci. Vycházím z poznatku, že pojivová tkáň není kontraktilní.

U chronických nebo špatně a dlouho se hojících poranění (například z důvodu nedostatečné vaskularizace) není aktivita satelitních buněk dostačující. Proto se vyvíjejí různé metody jak aktivitu satelitních buněk externě stimulovat (Cholok, 2017).

## 2.5 Strukturální poranění šlach

Po histologické stránce je šlacha tvořena hustým kolagenním vazivem. Mezibuněčná hmota obsahuje převážně paralelně uspořádaná kolagenní vlákna, v druhé řadě elastická vlákna a proteoglykany. Fibroblasty jsou uloženy v řadách mezi vlákny. Na povrchu šlachy se nachází řídké kolagenní vazivo, ze kterého do šlachy vybíhají septa s pronikajícími cévy a nervy (Mescher, 2018).

Podobně jako u svalů, pokud jsou šlachy vystaveny nadlimitnímu napětí, mohou se trhat – částečně nebo úplně. Symptomy ruptury šlach jsou většinou stejné jako symptomy svalových ruptur. Zahrnují: bolest, částečnou nebo úplnou ztrátu funkce svalu (dle rozsahu ruptury), většinou je přítomný hematom. Pacient s rupturou šlachy nebude schopný žádného zatížení postižené šlachy, respektive svalu. Typický je lupavý zvukový fenomén v okamžiku utržení. Při úplné ruptuře má sval tendenci se stáhnout směrem k místu začátku nebo úponu, kde je šlacha nenarušena. Například při úplné ruptuře úponové šlachy m. biceps brachii celý sval „uskočí“ kraniálně. V klinickém obraze je potom na paži rozsáhlý prostor mezi staženým svalovým bříškem a místem úponu šlachy (Sharma, 2006).

Nejčastější strukturální poranění šlach je ruptura Achillovy šlachy (Shamrock, 2022), proto tuto rupturu popíšeme jakožto reprezentativní příklad v rámci teoretického přehledu. Klasifikaci tohoto poranění navrhnul Kuwada. Jedná se o klasifikaci dle rozsahu ruptury Achillovy šlachy (Kuwada, 1990):

- Typ I:           částečná ruptura <50 %
- Typ II:          kompletní ruptura s defektem <3 cm
- Typ III:         kompletní ruptura s defektem 3-6 cm
- Typ IV:         kompletní ruptura s defektem >6 cm

Velikost defektu je rozsah mezery mezi oddělenými konci šlachy v podélné rovině. V klinickém obraze můžeme vidět nesouměrnou délku svalových bříšek m. triceps surae v porovnání se zdravou končetinou, v akutní fázi otok a hematom.

## 2.6 Proces hojení strukturálně poraněné šlachy

Stejně jako u svalové tkáně, proces hojení šlach probíhá ve třech fázích: zánět, vazivová přestavba a remodelace. Též je v případě závažných strukturálních poranění, kdy jsou konce šlachy oddáleny, zásadní operace, kdy jsou konce sešity k sobě (Thomopoulos et al., 2015).

Zánět trvá zpravidla 3-6 dní. Během tohoto období se v místě zánětu vyskytují neutrofily makrofágy. Makrofágy lze rozdělit na dvě skupiny: M1 – populace pro-zánětlivých makrofágů a M2 – populace protizánětlivých makrofágů (Nichols, 2019).

Během následujícího týdne přechází zánět ve fázi vazivové přestavy. Populace fibroblastů proliferují a produkují kolagen, který obnoví kontinuitu v poškozené tkáni. Vzniká tak „provizorní“ jizva. Fibroblasty, respektive jejich množství a aktivita, hrají v případě hojení šlachy srovnatelně důležitou a klíčovou roli jako satelitní buňky v případě hojení svalů. Šlachy jsou totiž sami o sobě převážně kolagenní tkání (Nichols, 2019).

Remodelace je dlouhotrvající fáze (měsíce až roky), kdy se tkáň provizorní jizvy mění v původní, „funkční“ tkáň. Nicméně u šlach je tento proces značně omezen a jizevnatá tkáň ustoupí pouze zčásti. Faktor, který má přímý vliv na remodelaci jizvy, je úroveň vaskularizace šlachy a jejího okolí. Dále důležitou roli hraje rehabilitace: postupné zatěžování svalu, který se hojící se šlachou upíná na kost, je důležité k jeho funkční obnově (Nichols, 2019).

I šlachy mají své kmenové buňky, analogické k svalovým satelitním buňkám. Nicméně s aktivitou svalových kmenových buněk není aktivita TSC's (tendon stem cells) srovnatelná, naopak, je minimální. Současný výzkum se zabývá způsoby, kterými by šlo aktivitu TSC's během rané fáze poranění stimulovat a maximalizovat (Costa-Almeida, 2015).

### 2.6.1 Operativní léčba ruptur šlach

Operativní léčba je preferována při částečné i rozsáhlejší ruptuře šlachy. Operace zahrnuje sešití šlachy stehy a v případě odtržení šlachy od kosti fixaci osteosyntetickým materiálem. Následně je místo poranění fixováno a imobilizováno po dobu 6 – 8 týdnů. Ruptura Achillovy šlachy je po operaci fixována sádrou či plastovou ortézou. Po dobu fixace bérce musí pacient užívat antikoagulancia (prevence embolie) (Park et al., 2020). Sešití i následná imobilizace jsou důležité kvůli minimalizaci jizvy („nefunkční“ tkáň).

## 2.7 Kůže a podkoží

Kůže tvoří ochranný obal lidského těla. Povrch kůže je v průměru 1,7 m<sup>2</sup>. Dvě vrstvy tvořící kůži jsou pokožka – *epidermis* a škára – *dermis*. Dále kůži doplňují kožní deriváty jako vlasy, nehty, mazové, potní a mléčné žlázy. Histologicky se jedná o krycí epitel (Mescher, 2018).

Podkoží, neboli podkožní vazivo – *tela subcutanea*, spojuje kůži s fascií či periostem. Je tvořeno převážně tukovými buňkami a pojivovou tkání. Tloušťka podkoží standardně dosahuje 1 až 3 cm (Mescher, 2018).

### 2.7.1 Regenerativní potenciál kůže a podkoží

Epidermis se obnovuje neustále díky epidermálním kmenovým buňkám, které jsou uloženy v nejspodnější vrstvě epidermis. Kmenové buňky tvoří keratinocyty, které jsou dále stratifikovány do vyšších vrstev. Vrstev je pět: od nejspodnější – stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum a stratum corneum. Keratinocyty během svého života v podstatě postupují od nejspodnější vrstvy do nejvyšší – stratum corneum, kdy rohovatí a jako mrtvé buňky odpadávají. Proces obnovy pokožky trvá průměrně 13 až 18 dnů. Jedná se dle definice o permanentní regeneraci. Při erozi (poranění pouze pokožky), se pokožka zahojí bez tvorby jizvy (Takeo, 2015).

Škára obsahuje více druhů kmenových buněk. Tyto buňky mají však primární funkci jinou - hlavně se jedná o kmenové buňky v blízkosti vlasových folikulů, podporující růst vlasů a ochlupení. V menší míře jsou ale i schopné přispět k hojení ran (Takeo, 2015).

V případě podkoží jsem nenašel literaturu dokazující přítomnost vlastních kmenových buněk. Hojení zde probíhá reparačním procesem – hlavní roli hrají fibroblasty produkující kolagen.

### 2.7.2 Klasifikace ran

Rány, či povrchová poranění, se klasifikují podle následujících hledisek (Brabcová, 2021):

Příčina vzniku exogenní: mechanické, termické, chemické a elektrické.

Příčina vzniku endogenní: vředy

Podle průběhu hojení: akutní – hojí se v krátkém čase bez komplikací, chronické – hojí se déle než čtyři týdny s komplikacemi.

Podle rozsahu: zavřené, povrchové, hluboké, pronikající do dutin, komplikované (poškozené jsou i další orgány).

Podle množství choroboplodných zárodků: rány aseptické, infikované a kontaminované.

Podle způsobu hojení: *per primam* – po sešití, slepení; *per secundam* – rána se hojí nově vytvořenou tkání

Klasifikace dle Brabcové (2021) je obsáhlá, nejedná se ale o universální klasifikaci. V zahraniční literatuře lze narazit na jiné způsoby klasifikace. Patrúlea mimo zmíněné kategorie zařazuje i dělení dle komplexity rány: rána jednoduchá, zasahující pouze jeden orgán či tkáň; a rána kombinovaná, prostupující do více orgánů či tkání (Patrúlea, 2015).

### 2.7.3 Proces hojení povrchové rány

Proces hojení povrchových ran je běžně popsán v třech po sobě jdoucích fázích: zánět, proliferace a remodelace. Fibrin a trombocyty nejdříve vytvoří zátku, která vede k zástavě krváčení – vytvoří se strup. Aktivované trombocyty společně s narušenými volnými nervovými zakončeními vyvolají zánětlivou odpověď. Neutrofilly nejprve fagocytují bakterie, mrtvé buňky a cizí tělesa, zároveň produkují interleukiny IL-1, IL-6 a tumor-nekrotizující faktor  $\alpha$ . Do procesu fagocytózy se po 24-48 hodinách dále přidávají makrofágy, které společně s neutrofilly produkují růstové faktory, podporující vznik granulační tkáně během proliferativní fáze. Další buňky regulující proces zánětu jsou T-lymfocyty, eosinofily a fibrocyty. Účel zánětu je vyčistit ránu a připravit ji na opravu (Rippa, 2019).

72 hodin po zranění začíná proliferativní fáze. Účel proliferativní fáze, která může trvat až 10 dní, je vytvořit granulační tkáň a zacelit poraněním vzniklý prostor. Hlavní roli v tomto procesu hrají fibroblasty. Fibroblasty produkují kolagen a podílí se tak na tvorbě extracelulárního matrix a na tvorbě jizvy. Během této fáze dochází též k angiogenezi. Myofibroblasty, buňky hladké svaloviny tvořící napřimovače chlupů v kůži, diferencují. Kontrakce hladké svaloviny v okolí rány je důležitá pro přiblížení okrajů rány k sobě a uzavření rány (Marshall, 2016).

Epitelizace je proces, který doprovází jak zánětlivou, tak proliferativní fázi a začíná již dvě hodiny po zranění. Keratinocyty z okraje rány a z místních vlasových folikulů migrují na povrch rány. Keratinocyty proliferují na povrchu rány dokud nespojí okraje rány k sobě (Marshall, 2016).

Po 2-3 týdnech následuje fáze remodelace, která může trvat přes rok (v závislosti na rozsahu poranění). Během této fáze je kolagen III. typu nahrazován kolagenem I. typu, a orientace kolagenních fibril se přeorganizuje. Jizva se stává více poddajnou, tenčí a z důvodu ústupu původně vytvořených kapilár vybledne. Přestavba kolagenu způsobí vzestup síly jizvy z 20 % 3 týdny po zranění na 70-80 % v 6 týdnu po zranění, ale nikdy nedosáhne stejné síly a vlastností jako původní tkáň (Rippa, 2019).

Kožní jizva neobsahuje žádné kožní deriváty (vlasy, potní žlázy atd.), a obsahuje značně méně elastinu než okolní zdravá kůže a podkožní vazivo (Rippa, 2019). Proto jizva, zasahující do hlubších vrstev (podkoží, fascie) může zásadně ovlivnit pohybový stereotyp, není-li rehabilitována její posunlivost a protažitelnost. Měkké tkáně, respektive jejich vrstvy, by měly být vůči sobě posunlivé. Není-li tomu tak, může to být způsobeno vzniklou adhezí v místě jizvy.

Podobně jako u šlachové tkáně hrají klíčovou roli v hojení kůže fibroblasty, protože produkují kolagen typu I a III tvořící jizvu. Keratinocyty hrají roli v procesu re-epitelizace. Rychlost hojivého procesu je dána mírou vaskularizace, hygienou, výživou a celkovým zdravotním stavem jedince.

Léčba povrchových ran záleží na rozsahu a typu poranění. Konvenčně se k léčbě používají farmakologické roztoky, masti a v případě infekce antibiotika. V případě hlubších poranění zahrnující krvácení je nutné nejprve krvácení zastavit a následně ránu sešít pro umožnění hojení per primam (minimalizace rozsahu jizvy) (Ferko et al., 2015).

#### **2.7.4 Aktivní jizva**

Aktivní jizva má vyšší teplotu a jinou barvu než okolní tkáň. Je tuhá, napjatá, neprotažitelná a vůči spodním vrstvám měkkých tkání neposunlivá. Může být palpačně bolestivá a způsobuje pacientovi pohybové omezení. Takovou jizvu je potřeba protahovat stejně jako například zkrácené svaly (Kolář, 2010).

## 2.8 Vazivo

Vazivo je nejrozšířenějším typem pojivové tkáně v lidském těle. Funkcí vaziva je spojovat orgány k sobě a chránit je vůči mechanickým podnětům. Vazivo je tvořeno buněčnou hmotou, vlákny a amorfní hmotou. Buněčná hmota vaziva se dělí na buňky fixní: fibroblasty, fibrocyty, myofibroblasty, melanocyty, tukové buňky a retikulární buňky; a buňky bloudivé: plazmatické buňky, makrofágy a mastocyty. Vlákná vazivové tkáně se dělí na kolagenní, tvořeny kolagenem typu I, II, III, IV, V a VII; a elastická, tvořena elastinem. Oba typy vláken jsou tvořeny fibroblasty. Pakliže dojde k narušení vazivové či jiné tkáně s nízkou regenerační kapacitou, dochází k reparaci vazivem, které je produkováno zmíněnými fibroblasty (Mescher, 2018).

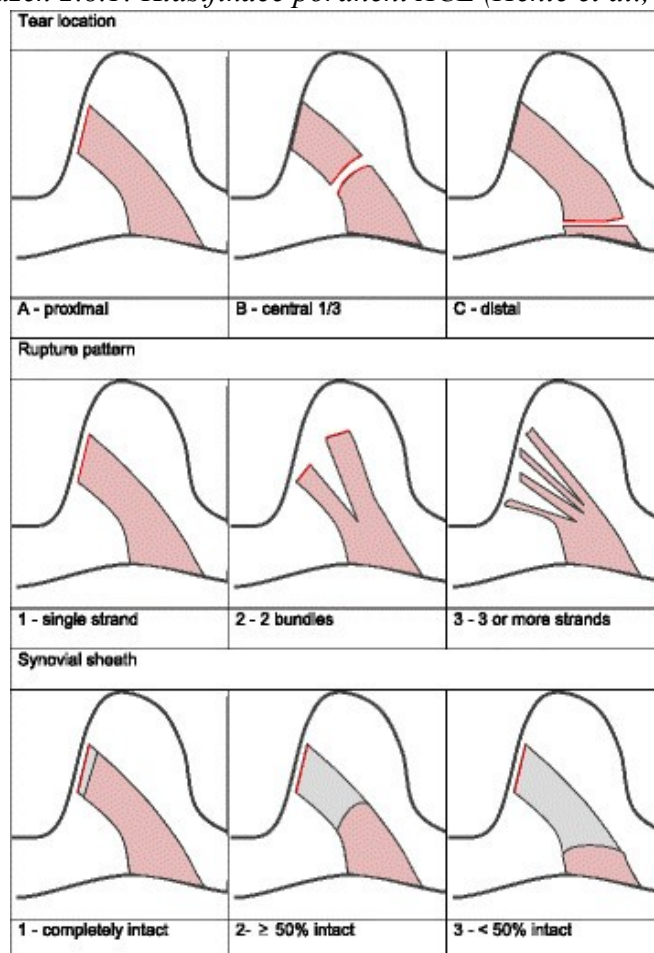
Jelikož jedna ze studií, ke které jsem se dopracoval prostřednictvím systematické rešerše provedené pro účely této bakalářské práce, popisuje efekt elektrické stimulace pro ovlivnění celulární migrace fibroblastů v tkáni předního zkříženého vazů, rozhodl jsem se uvést klasifikaci poranění právě tohoto ligamentu. Klasifikace poranění ligamentů jsou partikulární a mají odlišné autory.

Henle et al. (2015) klasifikují poranění ACL (anterior cruciate ligament – přední zkřížený vaz) dle následujících hledisek (*Obrázek 2.8.1*):

- 1) Dle místa ruptury: proximální, centrální a distální
- 2) Dle vzorce ruptury: jednoduchá, rozdvojená na svazky, roztřepená na tři a více svazků
- 3) Dle míry zachovalosti synoviální pochvy: zachováno 100 % synoviální pochvy, zachováno více než 50 %, a zachováno méně než 50 %.

Ruptury ligamentů lze diagnostikovat specifickými ortopedickými testy či pomocí zobrazovacích metod. Typický pro klinický obraz je instabilita daného kloubu a zvýšená pohyblivost kosti ve směru přerušeno vazů. Léčba takového poranění zahrnuje v první řadě fixaci a imobilizaci místa poranění (nejčastěji kloubu) a následně dle rozsahu poranění a míře používání daného kloubu, jenž byl vazem stabilizován, se uvažuje o operativní léčbě stehy či vazovou plastikou (náhražkou) (Ferko et al., 2015).

Obrázek 2.8.1: Klasifikace poranění ACL (Henle et al., 2015)



Legenda k Obrázku 2.8.1: proximal – proximální, central – centrální, distal – distální, single strand – jednoduchá ruptura, 2 bundles – ruptura rozděvená na svazky, 3 or more strands – ruptura roztržená na tři a více svazků, completely intact – zachováno 100 % synoviální pochvy, > 50 % intact – zachovaná více než polovina synoviální pochvy, < 50 % intact – zachovaná méně než polovina synoviální pochvy

## 2.9 Přímý a nepřímý hojivý účinek fyzikální terapie

Pro účely této bakalářské práce rozdělují hojivý účinek fyzikální terapie na přímý a nepřímý. Jedná se o vlastní terminologické rozhodnutí pro odlišení přínosu prezentovaných studií v následujících kapitolách od současných, běžně používaných procedur fyzikální terapie.

Princip fyzikální terapie s *přímým* hojivým účinkem spočívá ve vyvolání regenerační či reparační reakce strukturálně poškozené tkáně založené na principu stimulace proliferační aktivity tělu vlastních kmenových buněk (například satelitních buněk v rámci stimulace



poraněného svalu) nebo fibroblastů. Význam kmenových buněk a fibroblastů pro hojení (regeneraci, respektive reparaci) je vysvětlen v podkapitolách 2.4.1 a 2.7.3. Dále přímým hojivým účinkem míním procedury, které mají pozitivní vliv na intenzitu celulární migrace a směr fibroblastů formou galvanotaxe. Galvanotaxe je řízený pohyb buněk veden elektrickým polem. Díky elektrickému potenciálu buněčné membrány jsou buňky přitahovány ke kladnému či zápornému pólu. Jedná se tedy o způsob nasměrování pohybu buněk do požadovaného místa, což by v případě fibroblastů mohlo být například poranění šlachy nebo vazů (Cortese, 2014).

Již byl prokázán efekt jiných fyzikálně terapeutických postupů pro stimulaci proliferační aktivity satelitních svalových buněk nebo fibroblastů. Proliferace svalových buněk byla stimulována ultrazvukovou terapií (Yang, 2018), proliferaci fibroblastů se podařilo stimulovat pomocí nízko-výkoného laseru (Frigo, 2010). Obdobný efekt stimulace elektrickým proudem je předmětem systematické rešerše této bakalářské práce.

Za vybuzení proliferační a diferenciační aktivity satelitních buněk a fibroblastů pomocí elektrické stimulace jsou podle spekulací autorů zodpovědné proteiny, jejichž exprese je elektrickým proudem zvýšena. Tyto proteiny umožňují kaskádu dějů od proliferace buňky až po její maturaci (Wang, 2021). Vysvětlení efektu elektrické stimulace pro proliferaci a diferenciaci klíčových buněk pro regeneraci, respektive reparaci, se ovšem mezi autory liší. Vysvětlení efektu popisují specificky a partikulárně v rámci analýzy jednotlivých studií (kapitola 5).

Fyzikálně terapeutické procedury s *nepřímým* hojivým účinkem jsou procedury způsobující lokální podporu metabolismu zprostředkovaného hyperemií. Místně tak dochází k intenzivnějšímu přívodu živin a odvodu metabolitů, což hojivé procesy může urychlit. Procedury s tímto efektem jsou známé a osvědčené, jsou to například: galvanoterapie, ultrazvuk, laser nebo vakuově-kompresivní terapie. Obecně jsou tyto procedury známy jako fyzikální terapie s trofotropním účinkem (Poděbradský, 2009; Robertson, 2006).

## **2.10 Elektrická stimulace**

Elektrická stimulace je obecně definovaná jako metoda spadající do fyzikální terapie, která za pomoci elektrického proudu přeneseného do tkáně pomocí elektrod vyvolá ve tkáni požadovaný účinek. Pomocí stimulace tkání elektrickým proudem tak můžeme dosáhnout účinků jako jsou například: analgezie, neurostimulace, myorelaxace, účinek trofotropní,

účinek antiedematózní. Výsledné změny tkání, respektive účinek, závisí na tkáni, strukturách či buňkách, kterými prochází elektrický proud a též na fyzikálních parametrech stimulace (Robertson, 2006).

V bakalářské práci používám pojem *elektrická stimulace*, stejně jako autoři studií prezentovaných v kapitole výsledků systematické rešerše a analýzy literatury. Poděbradský používá pojem *elektrostimulace* jako konkrétní přístup myostimulace oslabených, paretických svalů k jejich posílení a prevenci atrofie či fibrotizace (Poděbradský, 2009). Jedná se tedy termín s užším významem.

### 2.10.1 Parametry elektrické stimulace

Parametry elektrické stimulace definuji jako fyzikální veličiny spjatými se stimulací elektrickým proudem z lékařského či terapeutického důvodu a jejich hodnoty dané číslem a jednotkou. Mezi základní parametry elektrické stimulace se řadí (Poděbradský, 2009):

Intenzita: nejčastěji udávána jako absolutní hodnota elektrického proudu [ $\mu\text{A}$  -  $\text{mA}$ ] nebo dle senzitivního vjemu – podprahově senzitivní, prahově senzitivní, podprahově motorická, prahově motorická a podprahově algická. Ve studiích prezentovaných rešerší je možné se setkat i s intenzitou chápanou jakožto výši napětí – jednotka volt [ $\text{V}$ ], či plošné napětí [ $\text{V}/\text{cm}^2$ ].

Frekvence: v případě stimulace střídavým či pulzním stejnosměrným proudem [ $\text{Hz}$ ].

Schéma elektrod: stimulace probíhá buďto bipolárně pomocí dvou elektrod s opačným nábojem (anoda a katoda) či pomocí jedné aktivní elektrody (anoda nebo katoda) a indiferentní elektrody – monopolární stimulace. Schéma elektrod též zahrnuje umístění elektrod – longitudinálně, transregionálně, paravertebrálně. Důležité je pořadí elektrod v případě longitudinálního umístění. U stimulace statickým stejnosměrným proudem je nutné uvést polaritu a čas její změny.

Délka impulsu: doba impulsu při stimulaci střídavým či pulzním stejnosměrným proudem [ $\mu\text{s}$  –  $\text{s}$ ].

Mezi další důležité parametry spadající spíše obecně do metody stimulace jsou délka stimulace (doba aplikace, většinou v minutách) a frekvence aplikace (kúra – počet aplikací za den / týden).

Soubor stimulačních parametrů (fyzikálních veličin) definuje *stimulační protokol*, který je podle svých parametrů pojmenován. Mezi pojmenované stimulační protokoly testované autory studií prezentovaných v této práci patří: MENS – microcurrent electrical neurostimulation (mikroproudová elektrická neurostimulace), LFES – low-frequency electrical stimulation (nízkofrekvenční elektrická stimulace), LVMAS – low-voltage microamperage stimulation (nízkovoltážní elektrická mikroproudová stimulace), EMGstim – electromyographic stimulation (elektromyografická stimulace), HVPC – high-voltage pulsed current (vysokovoltážní pulzní proud), TENS – transcutaneous electrical neurostimulation (transkutánní elektrická neurostimulace) a NsPEF – nanosecond pulsed electric field (nanosekundové pulzní elektrické pole). Podrobný rozbor parametrů zmíněných stimulačních protokolů je uveden partikulárně v rámci analýzy každé studie.

## 3 Metodologie práce

### 3.1 Cíl bakalářské práce

Cílem mé bakalářské práce je shrnout současnou úroveň poznání ohledně zmíněného hojivého efektu na měkké tkáně prostřednictvím zpracování přehledu problematiky. K zhotovení přehledu problematiky dospěji pomocí systematické rešerše aktuální literatury. V druhé řadě pomocí analýzy studií opatřených systematickou rešerší zjistím zda a za jakých podmínek je elektrická stimulace pro hojení měkkých tkání efektivní.

Současné úrovni poznání ohledně efektivity elektrické stimulace na hojení měkkých tkání z hlediska úplnosti, fáze a limitací výzkumu, se podrobně věnuji v diskuzní části bakalářské práce.

### 3.2 Metoda zpracování systematické rešerše a vyhledávací kritéria

Systematická rešerše je prostředek ke splnění cíle mé bakalářské práce. Rešerše byla provedena s využitím následujících databází: Web of Science, PubMed a ResearchGate. PubMed a ResearchGate byly zvoleny kvůli jejich zaměření na literaturu z oblasti biomedicíny, Web of Science je multidisciplinární. ResearchGate zobrazuje pouze 100 nejrelevantnějších výsledků. Vyhledávání literatury jsem rozdělil na čtyři procesy dle měkké tkáně: svaly, šlachy, kůže a vazy. V závislosti na druhu tkáně jsem sestavil partikulární vyhledávací fráze. Časové rozmezí vyhledávání odborných článků jsem stanovil na rok 2007 až 2022 z důvodu opatření aktuálních poznatků a zároveň získání dostatečného množství zdrojů. Vyhledávací fráze:

Svalová tkáň: *(electrical stimulation OR microcurrent OR electroporation) AND (muscle OR myoblasts OR satellite cells) AND (regeneration OR proliferation)*

Šlachy: *(electrical stimulation OR microcurrent) AND (tendon OR tendon injury OR tendinopathy) AND (tissue repair OR healing)*

Kůže: *(electrical stimulation OR microcurrent) AND (fibroblast OR wound OR skin) AND (healing)*

Vazy: *(electrical stimulation OR electric field) AND (ligament) AND (healing)*

Klíčová slova frází jsem volil podle cíle mé bakalářské práce, to znamená za účelem vyhledání studií testující přímý hojivý účinek (definovaný v kapitole 2.9) elektrické stimulace na svalovou tkáň, šlachy, kůži a vazy. Partikulární vyhledávací fráze jsem zvolil pro získání maximálně relevantních článků (maximální shoda klíčových slov) a minimalizaci velkého množství nežádoucích výsledků.

*Tabulka 3.2.1: Výsledky po zadání vyhledávacích frází*

Měkká tkáň	Web of Science – počet výsledků	PubMed – počet výsledků	ResearchGate – počet výsledků	Celkem výsledků
Svalová tkáň	826	689	100	1615
Šlachy	43	34	100	177
Kůže	473	657	100	1230
Vazy	28	10	100	138

*Tabulka 3.2.1* zobrazuje počet nalezených literárních zdrojů po zadání vyhledávacích frází. Na tyto výsledky již bylo aplikováno kritérium časového rozmezí. Nalezenou literaturu jsem podrobil screeningu relevance podle názvu a abstraktu. Byly vyřazeny články, které sice obsahovaly testování efektivity elektrické stimulace po zranění, nicméně v irelevantním kontextu vzhledem k cíli mé rešerše. To jsou například: studie popisující efekt elektrické stimulace pro prevenci atrofie u dlouhodobě ležících pacientů po operaci poraněných měkkých tkání nebo studie testující elektrickou stimulaci pro regeneraci svaloviny po poranění nervu. Tyto dva typy irelevantních výsledků tvořili převážnou většinou vyřazených článků.

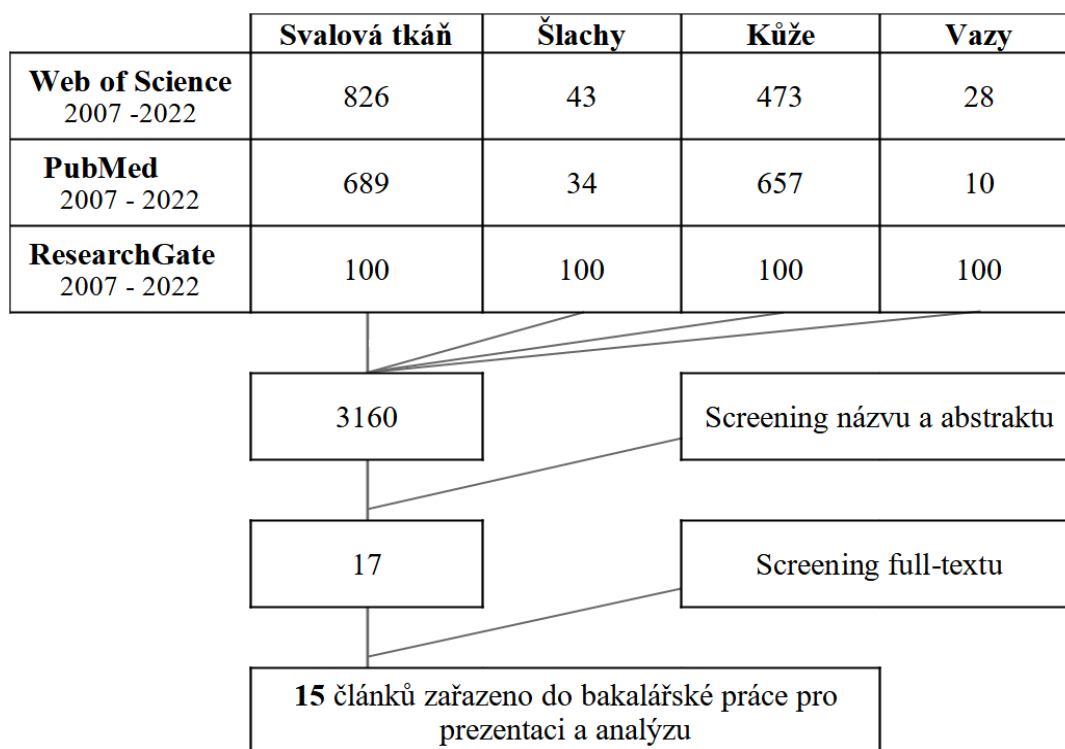
Po screeningu názvů a abstraktů z původních 3160 článků (součet výsledků všech tkání) zbylo 17 článků, jejichž full-textový screening vyřadil další dva články. V případě prvního z těchto článků se jednalo o review zbylých, původních studií, které jsem objevil a v případě druhého se jednalo o teoretický přehled způsobů stimulace kmenových buněk, nikoli o studii.

Do bakalářské práce nakonec bylo zařazeno 15 článků splňující všechna kritéria. 6 článků se týká svalové tkáně, 5 šlach, 3 kůže a jeden vazů. Čtrnáct článků je v anglickém jazyce, jeden je v portugalštině. Pro překlad portugalského článku byl použit překladač *DeepL*

(DeepL, 2022). Při pokusu o zpětném vyhledání všech patnácti článků pomocí jedné komplexní fráze obsahující kombinaci všech použitých klíčových slov jsem nebyl úspěšný, z čehož vyvozují, že použití více frází bylo výhodnější pro dosažení mého cíle.

Následující PRISMA diagram (Obrázek 3.2.1) graficky znázorňuje můj vyhledávací postup.

Obrázek 3.2.1: PRISMA diagram



### 3.2.1 Shrnutí vyhledávacích kritérií

- Zdroje jsou publikovány v roce 2007 až 2022.
- Zdroje jsou relevantní k tématu přímého hojení svalové tkáně, šlach, kůže či vazů podpořeného elektrickou stimulací. To zahrnuje články popisující efekt elektrické stimulace pro satelitní buňky a fibroblasty.
- Zdroje mají úroveň důkazu 1B, 2A a 2B (level of evidence) (Burns, 2011).
- Zdroje jsou studie testující in vivo a / nebo in vitro.
- Zdroje byly nalezeny pomocí výše uvedených vyhledávacích frází.

### **3.3 Metodologie analýzy odborné literatury**

Po přeložení a důkladném přečtení jsem extrahoval naměřená data a postupy studií opatřených systematickou rešerší. S ohledem na cíl bakalářské práce jsem popsal následující kategorie u každého prezentovaného článku: léčená patologie či jiný subjekt testování (buněčná populace), parametry testované elektrické stimulace (stimulační protokol), zvolené indikátory a měřené veličiny, výsledky a závěr. Úroveň podrobnosti popisu těchto kategorií a rozboru indikátorů je nastavená pro jednodušší pochopení literatury ale zároveň pro dostatečné splnění cíle práce.

Články hodnotím objektivně z hlediska správnosti postupování při testování, respektive validity, a subjektivně z ohledem na relevanci pro účel mé bakalářské práce. Články jsem rozdělil do tří kategorií dle typu stimulované tkáně: efekt elektrické stimulace na hojení svalové tkáně, šlach, a kůže společně s vazy. V rámci každé z těchto tří kategorií uvádím souhrn výsledků studií s ohledem k cíli práce. Ucelené shrnutí výsledků jsem se rozhodl umístit do diskuzní části bakalářské práce.

## 4 Výsledky systematické rešerše

Tato kapitola shrnuje výsledky vyhledávání odborné literatury a stručně uvádí základních data. Z 15 vyhledaných studií 6 testují přímý hojivý účinek elektrické stimulace pro svalovou tkáň, 5 pro šlachy, 3 pro kůži (povrchové rány), a 1 pro vazy. Designing studií, způsoby testování a použité elektrostimulační protokoly jsou různorodé. 10 vědeckých článků testuje elektrické stimulace na animálních subjektech. Zbýlých 5 studií jsou elektrostimulace testovány in vitro na izolovaných buněčných populacích nebo vzorcích měkké tkáně. Žádná ze studií netestuje efekt elektrické stimulace na pacientech. Důvodům, proč jsem nenašel dostupnou literaturu hovořící o testování elektrické stimulace pro hojení měkkých tkání na lidských pacientech, se věnuji v diskuzní části této bakalářské práce. Animální a in vitro testování odpovídá současné fázi výzkumu. *Tabulka 4.1* zobrazuje souhrn základních dat vyhledaných studií. Podrobný rozbor studií jsem provedl v kapitole analýzy odborné literatury.

*Tabulka 4.1: Výsledky studií*

Autor / autoři, rok	Subjekt, patologie	Intervence	Hlavní závěr
Fujiya et al., 2015 •	Animální, CTX-vyvolaná nekróza m. tibialis anterior	MENS	MENS podpořila proliferaci satelitních buněk, regenerace akcelerována
Wang, Qing-zhng a Dong-ming, 2021 •	Animální, částečná ruptura m. biceps femoris	LFES	LFES podpořila proliferaci satelitních buněk, regenerace akcelerována
Zickri, 2014 •	Animální, incizí simulovaná částečná ruptura m. soleus	Microcurrent	Microcurrent podpořil proliferaci satelitních buněk, regenerace akcelerována
Yoshida et al., 2015 •	Animální, CTX-vyvolaná nekróza m. tibialis anterior	MENS, ledování	MENS podpořila proliferaci satelitních buněk, regenerace akcelerována



Vadlamani et al., 2019 •	In vitro, myoblasty	nsPEFs	NsPEFs podpořila proliferaci a diferenciaci myoblastů
Bosutti et al., 2019 •	In vitro, animální svalová vlákna m. flexor digitorum brevis	EMGstim, Standart protocol	EMGstim podpořila diferenciaci myoblastů
Chan, Fung a NG, 2007 •	Animální, umělá částečná ruptura Achillovy šlachy	LVMAS	LVMAS zvýšila pevnost hojící se šlachy
Casagrande et al., 2021 •	Animální, umělá totální ruptura Achillovy šlachy	Tenorafie, LFES	LFES zvýšila syntézu kolagenu, přispěla k maturaci jizvy
Rampazo et al., 2016 •	Animální, umělá částečná ruptura Achillovy šlachy	HVPC	HVPC nepodpořil syntézu kolagenu a angiogenezi
Beretta et al., 2009 •	Animální, umělá totální ruptura Achillovy šlachy	Tenorafie, TES	TES nepodpořila proliferaci fibroblastů a angiogenezi, neovlivnila množství zánětlivých buněk
Ahmed, Elgayed a Ibrahim, 2011 •	Animální, umělá totální ruptura Achillovy šlachy	Tenorafie, Microcurrent	Microcurrent podpořil hojení povrchové rány a šlachy, zlepšil biomechanické vlastnosti hojící se šlachy
Gürgen et al., 2013 •	Animální, incize kůže	TENS	TENS podpořila hojení povrchové rány
Abedin-Do et al., 2021 •	In vitro, fibroblasty lidské diabetické kůže	Stejnoseměrný proud	Elektrická stimulace podpořila proliferaci fibroblastů, sekreci růstového faktoru a snížila sekreci prozánětlivých cytokinů

Bravo et al., 2021 •	In vitro, animální fibroblasty	Microcurrent	Microcurrent podpořil proliferaci fibroblastů
Chao et al., 2007 •	In vitro, animální fibroblasty z ACL, vzorek narušené ACL tkáně	Statický stejnosměrný proud, pulzní stejnosměrný proud	Stejnoseměrný proud podpořil rychlost celulórní migrace a směr fibroblastů do místa rány, podpořil syntézu kolagenu
			Statický i pulzní stejnosměrný proud inhibovaly uzavírání rány

Popis *Tabulky 4.1*: studie zabývající se efektem elektrické stimulace pro hojení svalové tkáně •, šlach •, kůže • a vazů •.

**Pozitivní závěr:** elektrická stimulace je efektivní pro hojení měkké tkáně protože:

- 1) Elektrická stimulace podpořila hojivé procesy strukturálně poraněných měkkých tkání formou facilitace regenerační či reparační aktivity tělu vlastních kmenových buněk, respektive fibroblastů.
- 2) Elektrická stimulace způsobila intenzivnější množení, diferenciaci a maturaci kmenových buněk a fibroblastů – klíčových buněk pro regeneraci, respektive reparaci.
- 3) Elektrická stimulace podpořila rychlost celulórní migrace fibroblastů formou galvanotaxe.
- 4) Elektrická stimulace zlepšila výsledné histologické či biomechanické vlastnosti léčené měkké tkáně.
- 5) Elektrická stimulace urychlila hojivý proces – byl rychlejší v porovnání s nestimulovanou kontrolní skupinou.

**Negativní závěr:** elektrická stimulace není efektivní pro hojení měkké tkáně protože:

- 1) Elektrická stimulace nepodpořila hojivé procesy strukturálně poraněných měkkých tkání formou facilitace regenerační či reparační aktivity tělu vlastních kmenových buněk, respektive fibroblastů.
- 2) Elektrická stimulace nezpůsobila intenzivnější množení, diferenciaci a maturaci kmenových buněk a fibroblastů – klíčových buněk pro regeneraci, respektive reparaci.
- 3) Elektrická stimulace nepodpořila rychlost celulární migrace fibroblastů formou galvanotaxe.
- 4) Elektrická stimulace nezlepšila výsledné histologické či biomechanické vlastnosti léčené měkké tkáně.
- 5) Elektrická stimulace inhibovala hojivý proces – byl pomalejší v porovnání s nestimulovanou kontrolní skupinou.

Současné úrovni poznání ohledně efektivity elektrické stimulace pro hojení měkké tkáně z hlediska úplnosti, fáze a limitací výzkumu se podrobně věnuji v diskuzní části bakalářské práce.

## 5 Analýza odborné literatury

V kapitole analýzy odborné literatury se věnuji prezentaci a rozboru jednotlivých vyhledaných relevantních odborných článků. S ohledem na cíl bakalářské práce pokládám za důležité důkladně popsat následující kategorie u každého prezentovaného článku: léčená patologie či jiný subjekt testování (buněčná populace), parametry testované elektrické stimulace (stimulační protokol), zvolené indikátory a měřené veličiny, výsledky a závěr. Články hodnotím objektivně z hlediska správnosti postupování při testování, respektive validity, a subjektivně z ohledem na relevanci pro účel mé bakalářské práce. Články jsem rozdělil do tří kategorií dle typu stimulované tkáně: efekt elektrické stimulace pro hojení svalové tkáně, šlach, a kůže společně s vazy. V rámci každé z těchto tří kategorií uvádím souhrn výsledků studií s ohledem k cíli bakalářské práce. Shrnutí informací o efektivitě elektrické stimulace na hojení měkkých tkání je součástí diskuzní části.

Odborné teoretické informace týkající se některých indikátorů jsou místo v kapitole teoretických východisek práce vysvětleny specificky v této kapitole v rámci analýzy jednotlivých studií.

### 5.1 Efekt elektrické stimulace pro hojení svalové tkáně

#### 5.1.1 Studie FUJIYA et al. (2015)

*„Microcurrent Electrical Neuromuscular Stimulation Facilitates Regeneration of Injured Skeletal Muscle in Mice“*

V této studii autoři testují facilitační efekt mikroproudové elektrické stimulace pro regeneraci poraněného svalu. Jedná se o animální studii, kdy svalové poranění bylo uměle navozeno injekcí kardiotoxinu do m. tibialis anterior třiceti pokusných myší. Kardiotoxin způsobil nekrózu svalu a spustil tak regenerační děje srovnatelné s regenerací po úrazem navozeném strukturálním poranění svalu. Třicet subjektů bylo dále rozděleno na dvě skupiny: experimentální skupina o 15 subjektech podstoupila léčbu pomocí Microcurrent Electrical Neuromuscular Stimulation (dále MENS), kontrolní skupina (zbylých 15 subjektů) léčbu nepodstoupila.

## Parametry elektrické stimulace

Parametry elektrické stimulace byly zvoleny následovně: intenzita 10  $\mu\text{A}$ , frekvence pulsů 0.3 Hz, délka pulsu 250 ms. Léčba byla u experimentální skupiny denní, po 60 minutách, třikrát týdně. Experimentální skupina byla tímto způsobem léčena po dobu jednoho až tří týdnů, evaluace výsledků probíhala po každém týdnu. Rozložení elektrod bylo kontaktní, ale neinvazivní. První elektroda byla umístěna na distální anteriorní část kolenního kloubu, druhá na proximální anteriorní část hlezenního kloubu. Informace o polaritě elektrod není ve studii uvedena.

## Indikátory

Jakožto indikátory, které by validně ověřily efekt léčby, byly zvoleny: obsah poškozených vláken (%), průřez svalového vlákna (cross-section area, dále CSA,  $\mu\text{m}^2$ ), celková tělesná hmotnost, absolutní hmotnost svalu před vysušením (absolute muscle wet weight), absolutní hmotnost vysušeného svalu (absolute muscle dry weight), hmotnost vysušeného svalu ku celkové tělesné hmotnosti (muscle dry weight relative to body weight), obsah svalových proteinů ku celkové tělesné hmotnosti (muscle protein content relative to body weight), počet Pax7-pozitivních nuclei, počet myonuclei a počet Pax7-pozitivních nuclei ku myonuclei.

Obsah poškozených vláken byl autory určen dle počtu vláken s centrálně uskupenými jádry. Svalová vlákna jsou mnohojaderné útvary a pozice jader ve svalovém vlákně spolehlivě odpovídá zdraví či patologii daného svalového vlákna (Folker, 2013). Zatímco zdravé svalové vlákno obsahuje jádra rovnoměrně rozprostřená na periferii, jádra patologického svalového vlákna jsou seskupena centrálně a blízko sebe. Nicméně centrálně uložená jádra nejsou pouze známkou „nezvratně“ nemocného svalu, ale i svalové vlákno procházející opravou například po silovém tréninku, kdy dochází k mikrotraumatizaci vláken právě na úrovni vláken, má část svých vláken uložena centrálně.

Další kategorií měřených hodnot byly hmotnostní parametry. Stejně jako rozměry vláken je pro autory důležitá i hmotnost svalu před a po vysušení. Těžší sval v porovnání s kontrolní skupinou by představoval důkaz lepší opravy, respektive růstu svalu, u experimentální skupiny.

Poslední skupinou indikátorů jsou Pax7-pozitivní nuclei, počet myonuclei a poměr dvou zmíněných. Pax7 je transkripční faktor hrající klíčovou, počáteční roli při proliferaci

svalových satelitních buněk. Právě přítomnost tohoto faktoru určí, zdali satelitní buňka přešla ze svého klidového stádia G0 do stádia proliferace (Lepper, Partridge, Fan, 2011). Množství faktoru Pax7 bylo autory zjištěno pomocí využití protilátek anti-Pax7, které jakožto markery detekovaly Pax7 svou vzájemnou vazbou. Poměr počtu Pax7 ku počtu celkových myonuclei je přímý korelát proliferace (množení) satelitních buněk.

## Výsledky

P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ . Kromě procentuálního obsahu poškozených vláken neuvádí autoři v kapitole výsledků jiná číselná data. Ostatní výsledky zjišťovaných indikátorů byly pouze graficky znázorněny a případně označeny za signifikantní dle stanovené p-hodnoty. Výsledky byly vyhodnocovány po prvním, druhém a třetím týdnu od aplikace kardiotoxinu do m. tibialis anterior. Pro vyhodnocení výsledků byly subjektům odňaty transverzální průřezy mm. tibialis anteriores.

*Tabulka 5.1.1.1* znázorňuje procentuální obsah poškozených vláken v průběhu doby testování. U obou skupin došlo k poklesu obsahu poškozených vláken, nicméně byl prokázán signifikantní efekt času i efekt léčby u experimentální skupiny.

*Tabulka 5.1.1.1: Procentuální obsah poškozených svalových vláken (Fujiya et al., 2015)*

<b>% poškozených vláken</b>	1. týden	2. týden	3.týden
Experimentální skupina	93 %	88 %	85 %
Kontrolní skupina	95 %	97 %	88 %

Výsledky následujících měřených hodnot roztřídím do kategorií podle signifikantního efektu způsobeného: 1) pouze časem, 2) efektu způsobeného časem i léčbou a 3) efektem způsobeného oběma zmíněnými faktory a jejich vzájemnou interakcí:

- 1) Signifikantní efekt způsobený pouze časem se dostavil u měření rozdílu absolutní hmotnosti svalu před vysušením a absolutní hmotnosti vysušeného svalu.
- 2) Signifikantní efekt způsobený časem i léčbou se kromě procentuálního obsahu poškozených vláken dostavil u měření rozdílu počtu celkových myonuclei a měření rozdílu hmotnosti vysušeného svalu ku celkové tělesné hmotnosti.

3) Signifikantní efekt způsobený oběma zmíněnými faktory a jejich vzájemnou interakcí se dostavil při měření CSA – experimentální skupina měla, dle mého odhadu z grafického znázornění, 1,6x větší průřez svalového vlákna v porovnání s kontrolní skupinou. Další měřené veličiny spadající do této kategorie je rozdíl v počtu celkových Pax7-pozitivních nuclei, rozdíl v poměru Pax7-pozitivních nuclei ku myonuclei a rozdíl v obsahu svalových proteinů ku celkové tělesné hmotnosti.

Rozdíl mezi celkovou tělesnou hmotností nebyl signifikantní ani po třetím týdnu, tj. čas ani léčba neměli na tělesnou hmotnost vliv.

### **Závěr**

Autoři zjistili, že stimulace pomocí MENS vedla k přímému hojivému účinku způsobem facilitace proliferační aktivity svalových satelitních buněk. Ve svalových vláknech experimentální skupiny byla regenerace akcelerována. Léčba poraněné kosterní svaloviny pomocí MENS má tedy podle autorů terapeutický potenciál.

### **Zhodnocení**

Mezi hlavní pozitiva studie patří pestré a bohaté množství indikátorů, na kterých byl posuzován efekt elektrické stimulace. Kromě absolutních hodnot se autoři zaměřují i na relativní hodnoty, tj. například poměr Pax7-pozitivních nuclei ku myonuclei. Zároveň autoři zkoumají výsledky na více úrovních – kromě hmotností svalů a CSA byla měřena i kvantita transkripčních faktorů, která spolehlivě koreluje s úrovní proliferační aktivity satelitních buněk. Mezi negativa studie patří nepřítomnost číselných dat většiny sledovaných měřených indikátorů. Ačkoli nebyla procedura testována na strukturálním poranění svalu, uměle navozená patologie aplikací kardiotoxinu nastartovala srovnatelný regenerační děj.

Celkově studii hodnotím jako zásadní pro účel mé bakalářské práce z důvodu, že správně a dostatečně testovala vliv elektrické stimulace na přímé hojení svalové tkáně cestou stimulace aktivity vlastních satelitních buněk. Autoři zvolili indikátory detekující fyziologickou příčinu hojení i výsledné změny morfologie svalu.

### **5.1.2 Studie WANG, QING-ZHNEG a DONG-MING (2021)**

*„Low-Frequency Electrical Stimulation Promotes Satellite Cell Activities to Facilitate Muscle Regeneration at an Early Phase in a Rat Model of Muscle Strain“*

V této studii autoři testují efekt nízkofrekvenční elektrické stimulace pro facilitaci regenerace poraněného kosterního svalu. Jedná se o animální studii, kdy byla experimentálním subjektům uměle navozena částečná ruptura m. biceps femoris. Celkem 36 krys bylo rozděleno do následujících šesti skupin: kontrolní skupina, která poraněna nebyla; skupiny D0, D7 a D14, které poraněny byly, ale nebyly léčeny pomocí elektrické stimulace (čísllice 7 a 14 znamenají dny evaluace výsledků ode dne poranění); a poraněné skupiny D7-20Hz a D14-20Hz, které podstoupily experimentální léčbu pomocí Low-Frequency Electrical Stimulation (dále LFES).

#### **Parametry elektrické stimulace**

Parametry LFES byly zvoleny následovně: délka impulsu 200  $\mu$ s, pulsní režim 5 s on, 10 s off, frekvence 20 Hz, prahově-motorická intenzita. Stimulace trvala 30 min, 2x denně s 4 h pauzou mezi cykly. Léčba pomocí LFES začala pátý den po poranění, to znamená že experimentální skupina D7-20Hz podstoupila 3 dny léčby a skupina D14-20Hz 10 dnů léčby. Dvě elektrody o velikosti 1 cm x 2 cm byly umístěny kontaktně, nainvazivně: první na střední část m. biceps femoris a druhá na fibulu. Informace o polaritě elektrod není v článku uvedena.

#### **Indikátory**

Autoři se zaměřili na expresi proteinů MyoD a myogeninu, které hrají roli transkripčních faktorů při proliferaci satelitních buněk, myogenezi a tudíž regeneraci svalové tkáně. MyoD a myogenin jsou spolehlivé markery aktivity satelitních buněk (Adams, Haddad, Kenneth, 1999). Oba proteiny byly detekovány pomocí vazby s protilátkami.

V druhé řadě autoři měřili úroveň hladiny proteinů MyoD a myogeninu pomocí western blottingu. Výsledkem tohoto měření byly separované pásy genů (specific band) o různé mohutnosti.



## Výsledky

Design a rozdělení skupin subjektů jsou nastaveny tak, aby jediný faktor, který vysvětluje rozdíl mezi poraněnou léčenou, poraněnou neléčenou a kontrolní skupinou byl právě efekt léčby. Jakožto p-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ . Výsledky byly vyhodnocovány sedmý a čtrnáctý den po poranění.

*Tabulka 5.1.2.1: Expese proteinů MyoD a myogeninu 7 dní po poranění (Wang, Qing-zhneg a Dong-ming, 2021)*

Expese proteinů 7 dní po poranění	MyoD	Myogenin
Kontrolní skupina	9,4 % ± 5,2 %	10,9 % ± 6,1 %
D7 (neléčená skupina)	23,1 % ± 6,0 %	21,9 % ± 6,1 %
D7-20Hz	38,9 % ± 8,8 %	41,2 % ± 12,4 %

*Tabulka 5.1.2.1* zobrazuje střední hodnoty ± směrodatnou odchylku procentuální expese proteinů MyoD a Myogeninu 7 dní po poranění. Došlo k signifikantnímu rozdílu expese obou proteinů v porovnání kontrolní a neléčené skupiny, ale hlavně k signifikantnímu rozdílu mezi skupinou D7 a D7-20Hz. Z výsledků vyplývá, že expese MyoD u léčené skupiny pomocí elektrické stimulace byla po třech dnech léčby přibližně 1,7x větší než u neléčené skupiny a expese myogeninu byla větší přibližně 1,9x. Úrovně hladiny proteinů detekovány při western blottingu byly též vyšší u léčené skupiny v porovnání s neléčenou a kontrolní skupinou.

*Tabulka 5.1.2.2: Expese proteinů MyoD a myogeninu 14 dní po poranění (Wang, Qing-zhneg a Dong-ming, 2021)*

Expese proteinů 14 dní po poranění	MyoD	Myogenin
Kontrolní skupina	3,4 % ± 3,2 %	2,9 % ± 0,6 %
D14 (neléčená skupina)	6,5 % ± 3,2 %	5,2 % ± 3,4 %
D14-20Hz	13,1 % ± 6,7 %	16,2 % ± 7,4 %

*Tabulka 5.1.2.2* zobrazuje střední hodnoty  $\pm$  směrodatnou odchylku procentuální exprese proteinů MyoD a Myogeninu 14 dní po poranění. Došlo k signifikantnímu rozdílu exprese obou proteinů v porovnání kontrolní a neléčené skupiny, ale hlavně k signifikantnímu rozdílu mezi skupinou D14 a D14-20Hz. Z výsledků vyplývá, že exprese MyoD u léčené skupiny pomocí elektrické stimulace byla po deseti dnech léčby přibližně 2x větší než u neléčené skupiny a exprese myogeninu byla větší přibližně 3,1x. Z porovnání procentuální exprese proteinů skupiny D7-20Hz a D14-20Hz ale vyplývá, že stimulace LFES způsobila větší expresi sedm dnů po poranění než po 14 dnech. Z toho autoři vyvozují, že by elektrická stimulace mohla být efektivnější v časném stádiu úrazu. Úrovně hladiny proteinů detekovány při western blottingu byly vyšší u léčené skupiny v porovnání s neléčenou a kontrolní skupinou, nicméně mohutnosti pásů již nebyly tak rozdílné jako v případě blottingu po sedmém dni.

## **Závěr**

LFES akceleruje regeneraci strukturálně poraněné kosterní svaloviny cestou facilitace proliferační aktivity vlastních svalových satelitních buněk převážně v časném stádiu poranění. To autoři odvozují od naměřených zvýšených hodnot transkripčních faktorů, jejichž množství koreluje s intenzitou aktivity satelitních buněk. Léčba pomocí LFES má proto terapeutický potenciál v léčbě strukturálně poraněných svalů.

## **Zhodnocení**

Mezi pozitiva studie patří důkladné popsání parametrů použité procedury a design rozdělení skupin subjektů, který je snadno pochopitelný a jehož výsledky po aplikaci procedury jsou vysvětlené jednofaktorovou analýzou rozptylu. Kromě pozitivního závěru autoři přispěli i informací o načasování léčby – intenzivnější aktivita satelitních buněk byla zaznamenána v časném stádiu léčby. Autoři doplňují studii i grafickým znázorněním CSA, kde je patrné že došlo k většímu nárůstu průřezu svalových vláken u léčené skupiny, nicméně průřez svalu nebyl hlavní součástí zkoumaných veličin.

Celkově studii hodnotím jako validní a přínosnou pro účely mé bakalářské práce z důvodu správného a dostatečného testování vlivu elektrické stimulace na přímé hojení svalové tkáně cestou stimulace aktivity tělu vlastních satelitních buněk. Autoři popisují fyziologickou podstatu přímého hojivého účinku.

### **5.1.3 Studie ZICKRI (2014)**

*„Possible Local Stem Cells Activation by Microcurrent Application in Experimentally Injured Soleus Muscle“*

Autor věnoval svojí studii zkoumání účinku mikroproudové (microcurrent) terapie pro lokální stimulaci aktivity svalových satelitních buněk u uměle navozeného strukturálního poranění svalu. 26 krys bylo rozděleno do tří skupin. Kontrolní, neporaněná a neléčená skupina po 6 krysách; poraněná, neléčená skupina po 10 krysách a poraněná, léčená skupina po 10 krysách. Tři skupiny byly následně rozděleny na podskupiny podle doby vyhodnocení výsledků a času utracení. Výsledky byly vyhodnocovány po dvou a po čtyřech týdnech experimentu. Skupinám poraněných subjektů bylo uměle navozeno strukturální poranění m. soleus v podobě 1 cm incize kolmo na průběh vláken. Kůže a fascie byly následně sešity, sval sešit nebyl.

#### **Parametry elektrické stimulace**

Parametry mikroproudové terapie byly zvoleny následovně: intenzita 100  $\mu$ A, frekvence 10 Hz. Stimulace trvala 20 min, jednou denně, třikrát týdně po dobu 2 až 4 týdnů. Elektrody o velikosti 1 cm x 1 cm byly umístěny kontaktně, neinvazivně: anoda přímo na místo poranění, katoda proximálně na stehno.

#### **Indikátory**

Autor zvolil tři indikátory: obsah atypických svalových vláken, procentuální obsah  $\alpha$ -SMA a procentuální obsah CD34. Atypická vlákna ve svalu vznikla díky navozenému poranění a při zobrazení byly odlišné od zdravých, typických vláken svým tvarem a vzdálenou separací navzájem od sebe. Jejich procentuální obsah byl autory určen díky mikroskopickému zobrazení a H&E barvení.

Alpha SMA (smooth muscle actin) je protein, který slouží primárně jako marker aktivity myofibroblastů. Je to ale i marker fibrogenních buněk. Zvýšený procentuální obsah tohoto markeru by mohl znamenat vznik vazivové tkáně (Cherng, Young, Ma, 2008).

CD34 je protein sloužící jako marker aktivních satelitních buněk kosterní svaloviny, ale i hematopoetických progenitorních buněk (Alfaro et al., 2011).

## Výsledky

Výsledky byly evaluovány po druhé a čtvrtém týdnu experimentu. Jakožto p-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ .

*Tabulka 5.1.3.1: Výsledky měření obsahu atypických vláken, procentuálního obsahu  $\alpha$ -SMA a procentuálního obsahu CD34 (Zickri, 2014)*

Výsledky	Obsah atypických vláken	Obsah alpha SMA (%)	Obsah CD34 (%)
Kontrolní skupina	-	0.98±0.25	0.81±0.19
Poraněná, neléčená podskupina po 2 týdnech	86.74±9.27	1.99±0.35	0.79±0.20
Poraněná, neléčená podskupina po 4 týdnech	243.38±9.69	3.29±1.01	1.62±0.47
Podskupina léčená 2 týdny	41.74±10.57*	5.67±0.43*	7.77±0.63*
Podskupina léčená 4 týdny	13.62±3.39*	9.61±1.17*	3.95±0.26*

*Tabulka 5.1.3.1* zobrazuje střední hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky naměřených výsledků. Signifikantní rozdíly jsou označeny \* a vztahují se ke své kategorii indikátoru. Podskupina léčená dva týdny měla signifikantně menší obsah atypických vláken v porovnání s oběma neléčenými podskupinami a podskupina léčená čtyři týdny měla signifikantně menší obsah patologických vláken než podskupina léčená pouze dva týdny. V tomto případě se jedná o jasný efekt léčby, protože u neléčené skupiny se obsah atypických vláken s časem nesnížil, ba dokonce se zvýšil téměř trojnásobně.

Podobně tomu bylo i v případě procentuálních obsahů markerů alpha SMA a CD34, kdy léčená skupina dosáhla signifikantně vyšších obsahů než neléčená skupina. Podskupina léčená čtyři týdny dosáhla navíc signifikantně vyšších výsledků procentuálního obsahu alpha SMA i s porovnáním s podskupinou léčenou pouze dva týdny. V případě procentuálního obsahu CD34 tomu bylo naopak: podskupina léčená pouze 2 týdny dosáhla signifikantně vyšší hodnoty než podskupina léčená po dobu čtyř týdnů.

## **Závěr**

Autor prokázal definitivní přímý hojivý efekt mikroproudové terapie pro strukturální poranění kosterní svaloviny. Efekt byl dokázán jakožto související s facilitací proliferace svalových satelitních buněk. Mikroproudová terapie proto má terapeutický potenciál.

## **Zhodnocení**

K pozitivům této metodologické studie patří podobný design jako u předešlé studie (Wang, Qing-zheng a Dong-ming, 2021): výhodné rozdělení subjektů pro použití jednofaktorové analýzy rozptylu výsledků. Studie tak působí přehledně a výsledky jsou jednoduše pochopitelné.

Uměle navozená patologie dostatečně mimikuje skutečné, úrazem navozené strukturální poranění jako je například ruptura svalu. Nicméně v případě takového úrazu by v první řadě byla pacientovi poskytnuta chirurgická léčba sešitím oddělených částí svalu. Autor operaci svalu sešitím u animálního subjektu neprovedl.

Zvolený marker alpha SMA byl při H&E barvení odhalen ve vřetenovitých buňkách (spindle cells), které se infiltrovaly mezi svalová vlákna v místě poranění. Vřetenové buňky jsou součástí hladké svaloviny ale může jít i například o fibroblasty (Magro et al., 2019). Autor ale identifikuje přítomné vřetenovité buňky bez bližší specifikace, takže jejich přítomnost může značit buďto angiogenezi (jelikož hladká svalovina je součástí cév), nebo fibroblastickou přestavbu svalu – reparaci. V případě dokázané probíhající angiogeneze by se jednalo o pozitivní závěr, nicméně v případě dokázané probíhající fibrogenese by se sice stále jednalo o důkaz přímého hojivého efektu kvůli dosažení reparace, ale nikoli o důkaz regenerace zprostředkované satelitními buňkami. Při nesešití oddělených částí svalu v případě částečné ruptury vždy dochází k fibroblastické přestavbě. Proto marker alpha SMA v této studii může spíše odhalovat stimulaci podpořenou reparací místo regenerace. Nemyslím si tedy, že se jedná o správný marker pro dokázání aktivity satelitních buněk. Podle R&D Systems nepatří alpha SMA mezi markery satelitních buněk kosterní svaloviny.

Marker CD34 je spolehlivým markerem aktivity satelitních buněk (R&D Systems, 2022). Jedná se tedy ale o jediný indikátor této studie značící zvýšenou proliferační aktivitu satelitních buněk. Snížený obsah atypických, patologických vláken u léčené skupiny je až možným výsledkem této aktivity. Pakliže si autor kladl za cíl prokázat vliv elektrické

stimulace na facilitaci satelitních buněk, učinil tak pomocí pouze jednoho spolehlivého indikátoru.

Celkově studii hodnotím za přínosnou pro účely mé bakalářské práce. Studie definitivně prokazuje přímý hojivý účinek elektrické stimulace pro strukturální poranění kosterní svaloviny, nicméně nemohu spolehlivě určit, zdali došlo k hojení způsobem regenerace nebo reparace, či který z těchto dějů převládal. Kromě fyziologické podstaty přímého hojivého účinku autor detekoval i výsledné změny morfologie svalu – snižující se počet atypických svalových vláken.

#### **5.1.4 Studie YOSHIDA et al. (2015)**

*„Regeneration of Injured Tibialis Anterior Muscle in Mice in Response to Microcurrent Electrical Neuromuscular Stimulation with or without Icing“*

Autoři testují efekt MENS pro regeneraci svalové tkáně. Léčbu elektrickou stimulací kombinují s ledováním za účelem dokázání možného aditivního efektu léčby. Jedná se o animální studii, kdy 48 myší bylo rozděleno do následujících 4 skupin po 12 myších: kontrolní skupina (neporaněná); poraněná, neléčená skupina (X); poraněná, léčená skupina pomocí pouze MENS (XM) a poraněná, léčená skupina pomocí MENS v kombinaci s ledováním (XIM). Patologie svaloviny byla vyvolána aplikací kardiotoxinu do m. tibialis anterior, což spustilo regenerační děje svalu.

#### **Parametry elektrické stimulace**

Parametry elektrické stimulace byly zvoleny následovně: intenzita 10  $\mu$ A, frekvence pulsů 0.3 Hz, délka pulsu 250 ms. Léčba byla u experimentální skupiny denní, po 60 minutách, třikrát týdně. Experimentální skupiny XM a XIM byly tímto způsobem léčeny po dobu tří týdnů. Rozložení elektrod bylo kontaktní, ale neinvazivní. První byla elektroda umístěna na distální anteriorní část kolenního kloubu a druhá na proximální anteriorní část hlezenního kloubu. Informace o polaritě elektrod není ve studii uvedena.

#### **Ledování**

Ledování u skupiny XIM mělo tento režim: ponor obou celých zadních končetin do vody o teplotě 4°C na 20 min.

## Indikátory

Indikátory byly zvoleny podobně jako v prvním hodnoceném článku: počet Pax7-pozitivních nuclei v poměru ku celkovému počtu myonuclei, CSA svalového vlákna ( $\mu\text{m}^2$ ), hmotnost nevysušeného svalu v poměru k celkové tělesné hmotnosti a obsah svalových proteinů v poměru k celkové tělesné hmotnosti.

## Výsledky

P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ . Autoři neuvádí číselné hodnoty naměřených dat. Výsledky zjišťovaných indikátorů byly pouze graficky znázorněny a případně označeny za signifikantní dle stanovené p-hodnoty. Výsledky byly vyhodnocovány v prvním a třetím týdnu od aplikace kardiotoxinu do m. tibialis anterior. Následující kategorie odpovídají výsledkům měřených indikátorů:

### **Hmotnost nevysušeného svalu v poměru ku celkové tělesné hmotnosti**

Naměřené výsledky dokazují signifikantní efekt léčby, času i interakce léčby s časem v případě evaluace v prvním i třetím týdnu.

První týden měla neléčená skupina X signifikantně nižší hmotnostní poměr svalu ku celkové tělesné hmotnosti v porovnání s neporaněnou kontrolní skupinou. Skupina XM byla co se týče tohoto indikátoru srovnatelná a bez signifikantního rozdílu oproti kontrolní skupině, což značí pozitivní, léčebný efekt elektrické stimulace. Skupina XM měla tudíž analogicky signifikantně vyšší naměřenou hodnotu než neléčená skupina. Skupina XIM kombinující MENS s ledováním neměla signifikantně vyšší naměřenou hodnotu oproti neléčené skupině, dokonce měla signifikantně nižší výsledek oproti kontrolní skupině a XM. Z těchto výsledků vyplývá, že léčba pomocí MENS měla v interakci s časem první týden významný efekt pro zvýšení hmotnostního poměru svalu ku tělesné hmotnosti, ale kombinace s ledováním byla kontraproduktivní.

Třetí týden byly naměřené hodnoty všech experimentálních skupin (X, XM a XIM) vzájemně srovnatelné, bez významného rozdílu ale signifikantně vyšší v porovnání s kontrolní skupinou.

## **Obsah svalových proteinů v poměru ku celkové tělesné hmotnosti**

Naměřené výsledky dokazují signifikantní efekt léčby a interakce léčby s časem v případě evaluace po prvním i třetím týdnu.

První týden byl obsah proteinů v poměru ku tělesné hmotnosti u neléčené skupiny významně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. Obě léčené skupiny nezaznamenaly významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou, což vypovídá o efektivitě léčby (stav léčených skupin je srovnatelný se zdravou skupinou).

Třetí týden nebyl mezi všemi skupinami žádný významný rozdíl, což vypovídá o efektivitě založené na interakci času i léčby. I neléčená skupina dosáhla v třetím týdnu srovnatelných výsledků s ostatními skupinami, což vypovídá samostatné, nepodpořené regeneraci, nicméně pomalejší v porovnání s léčenými skupinami.

## **CSA svalových vláken ( $\mu\text{m}^2$ )**

Naměřené výsledky dokazují signifikantní efekt léčby, času i interakce léčby s časem v případě evaluace v prvním i třetím týdnu.

První týden byly průřezy vláken významně nižší v porovnání s neporaněnou, kontrolní skupinou. Nevýznamně vyšší byly hodnoty XM oproti neléčené skupině. Nejlepších výsledků léčby ovšem dosáhla skupina XIM, ta měly signifikantně vyšší průměrný průřez svalových vláken než neléčená skupina.

Třetí týden byly obě léčené skupiny XM a XIM srovnatelné a vykazovali významně vyšší hodnoty průřezu v porovnání s neléčenou skupinou. Stále ale měly obě léčené skupiny významně nižší hodnoty v porovnání s kontrolní skupinou.

## **Počet Pax7-pozitivních nuclei v poměru ku celkovému počtu myonuclei**

Naměřené výsledky dokazují signifikantní efekt léčby, času i interakce léčby s časem v případě evaluace v prvním i třetím týdnu.

První týden neléčená i obě léčené skupiny prokázaly významně vyšší hodnotu počtu Pax7-pozitivních jader v poměru k myonuclei oproti kontrolní skupině. Léčené skupiny, dle mého odhadu z grafického zobrazení, přibližně 7,3x. Neléčená skupina dosáhla podle odhadu z grafického zobrazení 5,3x vyšší hodnoty v porovnání s kontrolní skupinou. Mezi neléčenou a léčenými skupinami byl významný rozdíl. Neprokázal se signifikantně vyšší efekt kombinace ledování s MENS v porovnání se skupinou léčenou pouze MENS.



Třetí týden prokázal podobný trend, nicméně XIM dosáhla nejvyšších hodnot v porovnání s kontrolní skupinou a měla signifikantně vyšší hodnoty i s porovnání s XM. Skupina léčená pouze pomocí MENS neměla významně vyšší výsledek než neléčená skupina. Neléčená skupina a XM byly tedy třetí týden srovnatelné, ale obě vykazaly odhadem z grafického zobrazení dvojnásobně vyšší počet Pax7-pozitivních nuclei v poměru ku celkovému počtu myonuclei.

### **Závěr**

Autoři dokázali, že proliferace satelitních buněk je stimulována pomocí MENS. Došlo k intenzivnější regeneraci u obou skupin, které dostaly léčbu MENS v porovnání s neléčenou skupinou. Z výsledků je patrné, že elektrická stimulace hrála zásadní roli v regeneraci zprostředkované satelitními buňkami převážně první týden, to znamená v počátečním stádiu poranění. Autoři doporučují kombinace ledování a MENS při terapii strukturálně poraněných svalů.

### **Zhodnocení**

Jedná se o studii, jejíž výzkumný tým je tvořen zčásti stejnými autory první hodnocené studie (Fujiya et al., 2015). Jedná se tedy o „navázání“ a rozšíření výzkumu o další terapeutický prvek – ledování. I design studie, metoda rozdělení subjektů a vyhodnocování výsledků je podobná prvotní studii. Autoři znovu potvrdili terapeutický potenciál MENS pro strukturálně poraněné svaly. Nebyl dostatečně ověřen aditivní hojivý efekt u kombinace MENS s ledováním, ale autoři navrhuji tuto kombinaci za účelem snížení otoku a bolesti například u sportovního poranění. Samotné ledování zmenšuje otok a zmírňuje bolest, regeneraci ale zpomaluje (Wang, Ni, 2021). V kombinaci s MENS je ovšem inhibiční vliv ledování na regeneraci odstraněn.

Celkově studii hodnotím jako zásadní pro účel mé bakalářské práce z důvodu, že správně a dostatečně testovala vliv elektrické stimulace na přímé hojení svalové tkáně cestou stimulace aktivity vlastních satelitních buněk. Studie navíc přispívá testováním kombinace elektrické stimulace s ledováním. Autoři zvolili indikátory detekující fyziologickou příčinu hojení i výsledné změny morfologie svalu.

### **5.1.5 Studie VADLAMANI et al. (2019)**

*„Nanosecond pulsed electric field induced proliferation and differentiation of osteoblasts and myoblasts“*

Satelitní buňky svalových vláken jsou za běžných podmínek v G0 (spící) fázi buněčného cyklu. Po adekvátními stimulu, jako je například poranění, se „probouzí“ a začínají proliferovat v myogenní prekursorů – myoblasty, které samy dále proliferují a následně diferencují a fúzí v myotubuly – stavební prvky svalových vláken (Hill et al., 2003).

Autoři testují efekt nanosekundového pulzního elektrického pole (NsPEF) pro proliferaci a diferenciaci osteoblastů a myoblastů. Studie má tedy dvě cílové buněčné populace. Pro účely mé bakalářské práce budu hodnotit vliv elektrické stimulace pouze na populaci myoblastů. Jedná se tedy o testování in vitro, kde subjekt představuje kultivovaná populace buněk. Myoblasty byly získány z animálního modelu. Autoři experimentují s různými hodnotami intenzity elektrické stimulace a porovnávají rozdíl mezi nestimulovanou (kontrolní – intenzita  $0 \text{ kV cm}^{-1}$ ) a stimulovanou (experimentální) populací. Nejedná se tedy o testování léčby pro patologii jako v předešlých hodnocených člancích.

#### **Parametry elektrické stimulace**

Parametry elektrické stimulace byly zvoleny následovně: délka pulsu 300 ns, opakovací frekvence 1 Hz. Intenzita je autory udána jako výše použitého napětí. Pro zjištění optimální intenzity pro proliferaci myoblastů byly testované tyto intenzity: 0; 2,5 ; 5; 10; 20 a 30  $\text{kV cm}^{-1}$ . Pro stimulaci buněčné populace elektrickým polem byly použity elektroporézní kyvety. Buněčné populace dostaly pouze pět NsPEF impulsů. Nejedná se tedy o proceduru testovanou minuty jako v předešlých člancích, impulsy však vnašely do buněčné populace vysoké napětí v rádech kilovoltů.

#### **Indikátory**

Jakožto hlavní indikátor byl zvolen počet myoblastů. Sekundární indikátor je počet, respektive koncentrace myosinových těžkých řetězců, které se nacházejí v diferencujících myoblastech a jejich množství tak značí pokročilost regeneračního procesu – maturaci myoblastů a jejich fúzi (Wells, Edwards, Bernstein, 1996). Pro zobrazení těžkých řetězců myosinu byla použita imunofluorescence – označená protilátka markeru.

## Výsledky

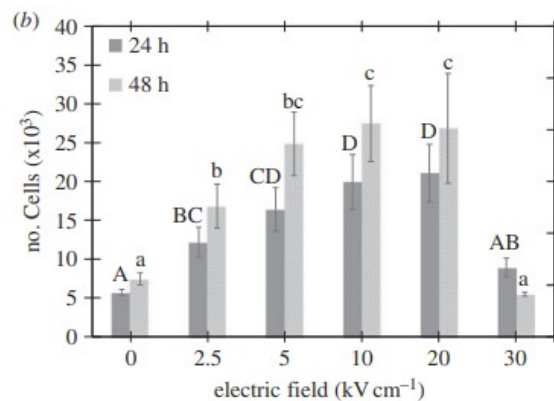
P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ . Výsledky byly vyhodnoceny ihned po stimulaci, dále 24 h a 48 h po stimulaci.

### Počet myoblastů (velikost populace)

Evaluaace naměřeného počtu velikosti populace ihned po stimulaci vykazuje následující trend: intenzita  $2,5 \text{ kV cm}^{-1}$  neměla na velikost populace žádný významný vliv. Vyšší intenzity ( $5$  až  $30 \text{ kV cm}^{-1}$ ) měly za následek lineární klesání velikosti populace myoblastů, což potenciálně naznačuje nepřímou úměru mezi vyšší intenzitou a přežitím buněk.

Následně bylo vysazeno (izolováno) fixní množství myoblastů pro pozorování změn 24 a 48 hodin po pěti NsPEF impulzech. NsPEF o intenzitě  $2,5 \text{ kV cm}^{-1}$  zdvojnásobilo množství myoblastů bez vlivu na jejich přežití. NsPEF s intenzitou  $5, 10$  a  $20 \text{ kV cm}^{-1}$  mělo 3x až 4x větší stimulační efekt pro proliferaci myoblastů (3x až 4x větší populace), ale za cenu nižšího přežití buněk (pro malou část buněk byly zmíněné intenzity smrtící). Intenzita  $30 \text{ kV cm}^{-1}$  se ukázala jako kontraproduktivní, protože byla pro většinu myoblastů smrtící. Velikosti populací odpovídající různým intenzitám, kterým byly vystaveny, vykazují stejný trend po 24 i 48 hodinách (Obrázek 5.1.5.1).

Obrázek 5.1.5.1: Výsledky velikosti populace myoblastů (Vadlamani et al., 2019)



Obrázek 5.1.5.1: Velikost populace myoblastů přímo odpovídá s intenzitou jejich proliferace. Autoři ve studii neuvádí číselná data, pouze označují signifikantní rozdíly. Intenzita  $2,5; 5; 10$  a  $20 \text{ kV cm}^{-1}$  signifikantně zvýšila velikost populace myoblastů (porovnání kontrolní a experimentálních skupin). Intenzita  $30$  nevyvolala z výše zmíněných důvodu signifikantní rozdíl ve velikosti populace. Skupiny s intenzitou  $10$  a  $20$  dosáhly signifikantně vyšších hodnot než skupiny s intenzitou  $2,5 \text{ kV cm}^{-1}$ .

## **Počet myosinových těžkých řetězců**

Při imunofluorescentním zobrazení myosinových těžkých řetězců byla jejich nejvyšší koncentrace zaznamenána u intenzity 5 kV cm<sup>-1</sup>. V kontrastu, méně myosinových těžkých řetězců bylo pozorováno u skupiny s intenzitou 25 kV cm<sup>-1</sup>. Autoři předpokládají tento klesající trend i u vyšších intenzit. Podle těchto výsledků autoři vyvozují, že intenzita 5 kV cm<sup>-1</sup> je optimální pro fúzi myoblastů.

## **Závěr**

Autoři potvrdili vliv NsPEF stimulace pro proliferaci a diferenciaci myoblastů při použití nižších intenzit napětí. Na základě tohoto potvrzení soudí, že stimulace NsPEF může mít potenciál v regenerativní medicíně a terapeutický potenciál v léčbě svalových poranění.

## **Zhodnocení**

Ačkoli se použité hodnoty napětí jeví jako příliš vysoké a potenciálně nebezpečné, délka impulsu je natolik krátká, že by v případě testování procedury na animálním nebo lidském subjektu nemělo dojít k poranění vysokým napětím. To analogicky odvozují od skutečnosti, že známá procedura HVPC (High-voltage pulsed current) používá též vysoké hodnoty napětí. Sice se jedná o desetiny intenzity (cca 0,5 kV) použité v této studii, ale délky trvání impulsů jsou stonásobné (cca 100 μs) (Polak, Franek, Taradaj, 2014).

Autoři dostatečně vysvětlují závěry z naměřených výsledků. Připouštím, že hodnotím pouze polovinu studie, jelikož efekt stejné stimulace pro proliferaci a diferenciaci osteoblastů nepokládám za relevantní pro mou bakalářskou práci.

Tuto studii pokládám celkově za relevantní, validní a přínosnou pro účely mé bakalářské práce, ale jelikož se jedná o studii in vitro, nemůžu jí přisuzovat stejnou hodnotu jako animální studii. Závěr experimentu je pozitivní ve prospěch možného budoucího užití elektrické stimulace v terapii poraněných svalů, ale testování in vitro je stále nejdálší konečné realizaci terapie na lidském pacientovi. Autoři prokázali pozitivní vliv elektrické stimulace pro fyziologickou podstatu hojení svalové tkáně. In vitro design studie logicky postrádá hodnocení výsledků hojení.

### 5.1.6 Studie BOSUTTI et al. (2019)

„A “noisy” electrical stimulation protocol favors muscle regeneration in vitro through release of endogenous ATP”

Autoři testují regenerativní reakci in vitro na izolovaných animálních mm. flexores digitorum breves. Porovnávají efekt tzv. „noisy“ (rušné) stimulace (EMGstim) se standardním elektrostimulačním protokolem (1 Hz). Stimulace je zaměřená na satelitní buňky a myogenní prekursory (myoblasty) svalových vláken.

#### Parametry elektrické stimulace

Parametry elektrické „noisy“ stimulace (EMGstim) jsou odvozeny od lidského myografického záznamu, tomu odpovídá i křivka průběhu. Intenzita byla nastavena 12 V. Rozložení elektrod bylo bipolární.

Standardní elektrostimulace (1 Hz) měla následující parametry: frekvence 1 Hz nebo 10 Hz, délka impulsu 1 ms a intenzita 24 V, bipolární. Křivka průběhu je pravidelná. Rozložení elektrod bylo bipolární. *Obrázek 5.1.6.1* zobrazuje grafický průběh obou testovaných protokolů:

*Obrázek 5.1.6.1: EMGstim (a) a 1 Hz (b) (Bosutti et al., 2019)*



Rozložení elektrod specifikují autoři následovně: elektrody 1 cm od sebe vzdálené ve výši 1 - 2 mm nad buňkami.

#### Indikátory

Jakožto indikátory značící změny aktivity satelitních buněk a myoblastů byly zvoleny: počet Pax7-pozitivních jader, vyjádřeno jako % pozitivních jader v oblasti; počet myogenin-pozitivních buněk, vyjádřeno v %; a intenzita firingu  $Ca^{2+}$  (uvolňování vápenatého kationtu ze sarkoplazmatického retikula svalových vláken m. flexor digitorum brevis).

Pax7-pozitivní jádra a myogenin-pozitivní buňky byly zobrazeny pomocí imunofluorescentního barvení navázaných protilátek (využití markerů).

## Výsledky

P-hodnota signifikantního rozdílu byla stanovena  $p < 0,05$ .

### **Intenzita firingu $Ca^{2+}$**

Intenzita firingu  $Ca^{2+}$  byla měřena a analyzována jako průměrná plocha pod křivkou. Jedná se nepřímě o indikátor počtu kontrakcí svalu při stimulaci, proto byl tento indikátor zjišťován jako počet arbitrárních jednotek kontrakcí svalu za 1 ms (AU / ms). Porovnávány byly pouze EMGstim a 1 Hz stimulace.

EMGstim se prokázala jako signifikantně efektivnější v porovnání se standardní 1 Hz stimulací. Střední hodnota plochy pod křivkou EMGstim byla  $2438.00 \pm 288.80$  AU / ms. Střední hodnota plochy pod křivkou 1 Hz byla  $1434.00 \pm 146.70$  AU / ms.

### **% Pax7-pozitivních jader**

% Pax7-pozitivních jader nebyl pomocí EMGstim ovlivněn. Stimulovaná skupina neprokázala signifikantní rozdíl od kontrolní, nestimulované skupiny 24, 48 ani 72 hodin po seedingu.

### **% myogenin-pozitivních buněk (velikost buněčné populace)**

Velikost buněčné populace myogenin-pozitivních buněk u EMGstim skupiny stimulované 1 hodinu se signifikantně zvýšila v porovnání s kontrolní skupinou. Skupina stimulována standardní stimulací, tentokrát o frekvenci 10 Hz, nedocílila signifikantního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou, ačkoli disponuje dvojnásobnou intenzitou. % myogenin-pozitivních buněk EMGstim skupiny bylo  $44.70 \% \pm 0.84 \%$  v porovnání s  $36.76 \% \pm 0.80 \%$  kontrolní skupiny ( $p < 0,001$ ).

## **Závěr**

Autoři potvrdili, že elektrická stimulace v podobě elektromyografické křivky má akcelerační vliv na diferenciaci myoblastů, což přispívá k regeneraci svalové tkáně. Autoři jev vysvětlují jakožto způsobený zvýšeným vyplavováním endogenního ATP svalových vláken během kontraktlní aktivity, která byla akcelerována stimulovaným firingem vápenatého kationtu. Toto ATP je dle autorů klíčové pro diferenciaci a myoblastů.

Druhým zjištěním byla nadřazenost EMGstim protokolem nad standardním, regulérním protokolem co se týče facilitace regenerace. EMGstim navíc přináší pozitivní výsledky s poloviční intenzitou (U) v porovnání se standardní 1 Hz / 10 Hz stimulací.

Proliferace satelitních buněk nebyla pomocí EMGstim zprostředkována. To autoři vysvětlují na nevýznamně změněném procentuálním obsahu Pax7-pozitivních jader.

## **Zhodnocení**

Pozitivně hodnotím studii z následujících důvodů: výběr neobvyklého a originálního typu elektrické stimulace a její následné porovnání se standardní stimulací. Jelikož se jedná o stimulaci kopírující elektromyografický záznam, předpokládám, že pozitivní výsledek byl pozorován kvůli „přirozenosti“ průběhu proudu pro svalové buňky.

Indikátory pro proliferaci satelitních buněk i pro diferenciaci myoblastů byly vybrány správně. In vitro studie celkově nedisponují stejnou možností pestrého a hojného výběru indikátorů.

Celkově pokládám studii za validní a přínosnou pro účely mé bakalářské práce. Studii in vitro nepokládám za srovnatelnou s animálními studii ze stejných důvodů, které jsou uvedeny v hodnocení článku Vadlamani et al..

### **5.1.7 Souhrn výsledků studií elektrické stimulace pro hojení svalové tkáně**

Šest ze šesti prezentovaných článků týkajících se efektu elektrické stimulace pro hojení svalové tkáně přichází s pozitivním závěrem. Elektrická stimulace podpořila hojivé procesy patologické strukturálně poraněné kosterní svaloviny v případě čtyř animálních studií formou facilitované regenerace. Převažující většina závěrů těchto studií popisují stimulovanou aktivitu satelitních buněk jakožto hlavní důvod naměřených výsledků.

Dvě in vitro studie došly též k pozitivnímu závěru, protože prokázaly facilitovanou diferenciační aktivitu klíčových buněk pro regeneraci svalové tkáně.

Kvůli různorodosti použitých elektroprocedur nelze přesně stanovit optimální parametry stimulace. Převažují však stimulace střídavým proudem o velmi nízkých frekvencích: 0.3 až 20 Hz. Intenzita byla v případě tří animálních studií uvedena v absolutní hodnotě, přičemž že byla použita mikrointenzita: 10 až 100  $\mu$ A. Čtvrtá animální studie použila prahově motorickou intenzitu. Stimulace byla vždy bipolární. Autoři odborné literatury se délkou a frekvencí procedur přiblížily standardním kúram elektrické fyzikální terapie pro pacienty: délka přibližně 20 až 60 minut, jednou až dvakrát denně, každý den nebo třikrát týdně. Jediný případ použití stejných parametrů elektrické stimulace v rámci metod dvou studií jsou studie autorů Fujiya et al. a Yoshida et al., které mají ale přibližně stejné

zastoupení autorů a studie Yoshida et al. navazuje s dalšími poznatky. Autoři připouští, že v případě klinických studií by intenzity museli být poměrově adekvátně vyšší k dosažení efektu u lidských svalů.

Celkově vybrané články mapují široké spektrum indikátorů, jejichž změřené rozdíly mezi kontrolními a experimentálními skupinami dostatečně vysvětlují fyziologickou příčinu hojení i histologické výsledky. Mezi indikátory příčiny regenerace patří protilátkové markery aktivity satelitních buněk a myoblastů, konkrétněji proteiny doprovázející metabolické procesy těchto klíčových buněk. Následek regenerační aktivity byl pozorován při mikroskopických či hmotnostních měřeních: velikost průřezu vlákna (CSA), úbytek patologických vláken, relativní a absolutní hmotnosti svalových vláken. Testované elektrostimulační protokoly mají pozitivní efekt pro přímé hojení svalové tkáně.



## **5.2 Efekt elektrické stimulace pro hojení šlach**

### **5.2.1 Studie CHAN, FUNG a NG (2007)**

*„Effects of Low-Voltage Microamperage Stimulation on Tendon Healing in Rats“*

Autoři se zabývají účinkem nízkovoltážní mikroproudové stimulace (LVMAS) pro hojení strukturálně poraněné šlachy. Své pozorování cílí na biomechanické vlastnosti šlachy. Jedná se o animální studii testovanou na čtrnácti krysách, které byly rozděleny na dvě skupiny po sedmi: skupina kontrolní (dále KS), která po poranění byla podrobena placebo léčbě neaktivní elektrickou stimulací a experimentální skupinu (dále XS), která po poranění dostala léčbu LVMAS. Animálním subjektům byla uměle navozena částečná ruptura pravé achillovy šlachy chirurgickou hemitransekcí.

#### **Parametry elektrické stimulace**

Parametry LVMAS byly zvoleny následovně: intenzita  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  s napětím 2,5 V, 10 pulsů za sekundu. Skupiny byly podrobeny léčbě 30 min denně, 6 dní v týdnu. Léčba začala 6. den po poranění a trvala 25 dní - to znamená 22 aplikací LVMAS dohromady. Kontrolní skupina byla podrobena placebo léčbě s vypnutým stimulátorem. Elektrody byly uloženy na kůži. Anoda o velikosti 1 x 1 cm byla přiložena přes místo poranění, katoda o stejné velikosti byla uložena na lýtko 1 cm proximálně nad anodu.

#### **Indikátory**

Jakožto indikátory byly zvolené biomechanické a viskoelastické vlastnosti šlachy po léčbě, a sice: pevnost v tahu, napěťová relaxace a tuhost. Pevnost v tahu šlachy je její nejvyšší možné napětí, kterému odolává aniž by došlo k narušení její integrity. „Při napěťové relaxaci dochází po počátečním nárůstu napětí k jeho poklesu při konstantní délce“ (Janura, 2003, 33). Tuhost je schopnost materiálu odolávat deformaci, v případě šlachy se tuhost zvyšuje s prodloužením. (Janura, 2003)

#### **Výsledky**

Zmíněné vlastnosti šlach byly měřeny 31. den experimentu, to znamená po ukončení léčebného období. Design studie je nastaven pro vysvětlení rozdílu mezi skupinami jedinou proměnnou – efekt léčby pomocí LVMAS. P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ . Naměřené hodnoty indikátorů byly porovnávány jako procentuální rozdíl oproti zdravé, levé achillově šlaše stejného zvířete. Následně byly poměry každého zvířete arytmetizovány.

*Tabulka 5.2.1.1* popisuje naměřené výsledky biomechanických a viskoelastických vlastností šlach u XS v porovnání s KS. Hodnoty jsou uvedeny jako střední hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky.

*Tabulka 5.2.1.1: Výsledky naměřených vlastností šlach (Chan, Fung a NG, 2007)*

Výsledky	Pevnost v tahu (%)	Napět'ová relaxace (%)	Tuhost (%)
XS	110,5 $\pm$ 25,0	110.2 $\pm$ 25,5	94,3 $\pm$ 52
KS	75,3 $\pm$ 20,8	130 $\pm$ 42,6	67,7 $\pm$ 22,8
p-hodnota	0,014	0,35	0,239

Z výsledků vyplývá, že k signifikantnímu rozdílu došlo pouze při měření pevnosti v tahu. Napět'ová relaxace a tuhost neprokázaly signifikantní rozdíl mezi XS a KS. V případě měření napět'ové relaxace dokonce prokázala vyšší naměřené hodnoty KS. Tuhost sice prokázala vyšší hodnotu u XS, ale nevýznamně.

### **Závěr**

Autoři prokázali pozitivní vliv transkutánní nízkovoltážní mikroproudové stimulace pro pevnost v tahu šlachy léčené po částečné transekcii. Autoři předpokládají, že dostavený efekt byl způsoben díky facilitované syntéze kolagenu. Na základě toho autoři doporučují LVMAS pro léčbu strukturálně poraněných šlach a ostatních měkkých tkání.

### **Zhodnocení**

Volba biomechanických a viskoelastických vlastností šlach jakožto indikátorů je přínosná, ale nevysvětluje dostatečně biologickou a fyziologickou příčinu hojení. Tato příčina by mohla být vysvětlena pomocí imunohistologických zobrazení, použití markerů, zobrazení CSA, atd. Subjektům navíc po hemitranskcii, která měla simulovat částečnou rupturu šlachy, nebyly oddělené části šlachy suturovány. Směrodatné odchylky naměřených hodnot jsou relativně vysoké, za což nejspíše může malý počet subjektů.

Celkově studii hodnotím jako relevantní pro účely mé bakalářské práce, protože testuje účinek elektrické stimulace pro hojení měkké tkáně. Nemohu ale identifikovat, zdali se

jedná o přímý hojivý účinek, z důvodu nezařazení měření biologických a fyziologických indikátorů, které by objasnili příčinu pozitivního závěru autorů.

### **5.2.2 Studie CASAGRANDE et al. (2021)**

*„Histological evaluation of the effect of low-frequency electric stimulation on healing Achilles tendons in rats“*

Záměr autorů je ozřejmit hojivý efekt nízkofrekvenční elektrické stimulace (LFES) po histologické stránce. Jedná se o animální studii testující proceduru pro hojení strukturálního poškození achillovy šlachy. Třiceti-třem krysám byla vykonána tenotomie achillovy šlachy (simulace totální ruptury), která byla následně suturována (tenorafie). Kůže byla po operaci též sešita stehy. Krysy pak byly rozděleny do dvou skupin: experimentální skupina (XS, 15 krys), která podstoupila léčbu pomocí LFES a kontrolní skupina (KS, 18 krys), která žádnou následující léčbu nepodstoupila.

#### **Parametry elektrické stimulace**

Pro stimulaci byl zvolen alternující, bifázický, pravoúhlý proud o frekvenci 2 Hz. Byla použita intenzita 1 mA s délkou impulsu 600  $\mu$ s. Stimulace proudem probíhala skrz akupunkturní jehly zavedené 1 cm proximálně a 1 cm distálně od tenorafie. Léčba probíhala denně, 20 minut, po dobu 14 dní.

#### **Indikátory**

Autoři zvolili indikátory zaměřené na histologické prokázání efektu stimulace. Jakožto první indikátor bylo zvoleno „Healing score“ (Stoll, 2011): „Dvanáct histopatologických parametrů bylo pozorováno dle Stolla: organizace extracelulárního matrixu, obsah myoxidního materiálu, buněčnost a vztah k buněčnému matrixu, splynutí buněk, buněčná distribuce, morfologie jádra, organizace pojivové tkáně ve šlašitém svalku, přechod z patologické do fyziologické šlašité tkáně, konfigurace svalku, degenerativní změny a tkáňová metaplazie, vaskularizace v oblasti defektu a zánět. Každý z parametrů má dvě až čtyři proměnné. Proměnné každého z dvanácti histopatologických parametrů všech vzorků byly evaluovány a aritmetizovány.“ (Casagrande et al., 2021, s. 3).

Další skupinou indikátorů byly hustoty kolagenů, jejich součet a poměr: hustota kolagenu typu I a kolagen typu III, totální kolagen (součet I a III) a maturitní index jizvy (poměr I ku III). Maturitní index jizvy staví do poměru dva typy kolagenu, jelikož s časem

hojení je kolagen typu III nahrazován kolagenem typu I. Jedná se tedy o index vyjadřující vyzrálou jizvu, neboli pokrok hojícího procesu pojivové tkáně.

K získání vzorků pro histopatologickou evaluaci byly po 14. dni léčby odebrány poraněné šlachy obsahující jizvu (společně s m. gastrocnemius). Kolagen i Healing score byly zobrazeny pomocí mikroskopu a barvení.

## Výsledky

Výsledky byly vyhodnoceny po ukončení léčebného období, tj. v druhém týdni, dále v čtvrtém a šestém týdni. Pro porovnání výsledků KS a XS byl použit Mann-Whitneho test a pro porovnání výsledků z druhého, čtvrtého a šestého evaluovaného týdne byl použit Kruskal-Wallisův test. P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ .

Autoři ve své studii uvádí u výsledků každého indikátoru průměrnou hodnotu, medián, maximální hodnotu, minimální hodnotu, směrodatnou odchylku, p-hodnotu mezi skupinami během času a p-hodnotu mezi druhým, čtvrtým a šestým týdnem každé skupiny. Pro přehlednost mé bakalářské práce prezentuji pouze průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky a obě verze p-hodnoty.

*Tabulka 5.2.2.1: Healing score experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden (Casagrande et al., 2021)*

Healing score	2. týden	4. týden	6. týden	Signifikantní rozdíl mezi týdny
XS	$9,2 \pm 0,8$	$14,4 \pm 3$	$15,4 \pm 0,5$	Signifikantní rozdíl mezi 2. a 4., 4. a 6., 2. a 6. týdnem.
KS	$9,8 \pm 1,5$	$13,2 \pm 1,9$	$14,1 \pm 0,7$	Signifikantní rozdíl mezi 2. a 4., 4. a 6., 2. a 6. týdnem.

*Tabulka 5.2.2.1* zobrazuje výsledky naměřeného Healing score. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pozorován pouze šestý týden ve prospěch XS.

*Tabulka 5.2.2.2: Hustota kolagenu typu I experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden (Casagrande et al., 2021)*

Kolagen typu I	2. týden	4. týden	6. týden	Signifikantní rozdíl mezi týdny
XS	10,1 ± 4,14	21,7 ± 3,08	30,8 ± 4,34	Signifikantní rozdíl mezi 2. a 4., 4. a 6., 2. a 6. týdnem.
KS	2,3 ± 0,31	6,8 ± 0,96	13,1 ± 2,52	Signifikantní rozdíl mezi 2. a 4., 4. a 6., 2. a 6. týdnem.

*Tabulka 5.2.2.2* zobrazuje výsledky naměřené hustoty kolagenu typu I. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pozorován druhý, čtvrtý i šestý týden ve prospěch XS. U obou skupin lze pozorovat lineární nárůst, nicméně u XS s průměrně a zaokrouhleně trojnásobnými až čtyřnásobnými hodnotami.

*Tabulka 5.2.2.3: Hustota kolagenu typu III experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden (Casagrande et al., 2021)*

Kolagen typu III	2. týden	4. týden	6. týden	Signifikantní rozdíl mezi týdny
XS	21,6 ± 3,39	30,3 ± 7,82	44,9 ± 6,2	Signifikantní rozdíl mezi 4. a 6., 2. a 6. týdnem.
KS	26,4 ± 15	27,3 ± 7,42	30,3 ± 3,47	Žádný signifikantní rozdíl mezi týdny.

*Tabulka 5.2.2.3* zobrazuje výsledky naměřené hustoty kolagenu typu I. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pozorován pouze šestý týden ve prospěch XS.

*Tabulka 5.2.2.4: Totální kolagen experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden (Casagrande et al., 2021)*

Totální kolagen	2. týden	4. týden	6. týden	Signifikantní rozdíl mezi týdny
XS	31,7 ± 11,8	52 ± 6,99	75,6 ± 3,63	Signifikantní rozdíl mezi 2. a 4., 4. a 6., 2. a 6. týdnem.
KS	28,7 ± 3,34	34,1 ± 7,58	43,4 ± 7,24	Signifikantní rozdíl mezi 2. a 4., 4. a 6., 2. a 6. týdnem.

*Tabulka 5.2.2.4* zobrazuje výsledky totálního naměřeného kolagenu. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pozorován čtvrtý a šestý týden ve prospěch XS.

*Tabulka 5.2.2.5: Maturitní index jizvy experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden (Casagrande et al., 2021)*

Maturitní index	2. týden	4. týden	6. týden	Signifikantní rozdíl mezi týdny
XS	0,802 ± 0,7	0,756 ± 0,221	0,692 ± 0,140	Žádný signifikantní rozdíl mezi týdny.
KS	0,089 ± 0,018	0,274 ± 0,107	0,444 ± 0,098	Signifikantní rozdíl mezi 2. a 4., 4. a 6., 2. a 6. týdnem.

*Tabulka 5.2.2.5* zobrazuje výsledky maturitního indexu jizvy. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pozorován druhý, čtvrtý i šestý týden ve prospěch XS. Zatímco ale KS vykazovala trend pozvolného lineárního růstu, XS zaznamenala mírný úpadek po čtvrtém týdnu.

## **Závěr**

Autoři prokázali přímý hojivý efekt LFES pro hojení strukturálně poraněné šlachy, jehož následky přetrvávají i po ukončení léčebné kúry. Léčba pomocí LFES měla zásadní vliv na syntézu kolagenu, což autoři odvozují od předpokládané stimulované facilitace fibroblastů, a na vyzrállost jizvy. Nízkofrekvenční stimulace tak přispěla k reparaci strukturálně poškozené šlachy.

## **Zhodnocení**

Autoři zvolili jakožto simulaci strukturální patologie úplnou tenotomii šlachy, která byla následně sešita. Díky tomuto řešení a až následné elektrostimulaci se autoři svou studií nejvíce přiblížili klinické praxi na pacientech, kterým jsou též ruptury šlach a svalů nejprve sešity. Výběrem indikátorů autoři jasně vysvětlují příčinu hojení šlachy.

Evaluace dat po až po ukončení léčby a následně po dalších dvou a čtyřech týdnech je netradiční volba času měření výsledků. Tradičně, jako je tomu v předchozích hodnocených člancích, probíhá evaluace výsledků během léčby, aby se porovnal efekt času s efektem elektrické stimulace. V takovém případě by jediná validní data v této studii byly rozdíly mezi skupinami v druhém týdnu, tedy ve chvíli těsně po ukončení léčby. Nicméně zde jsou hodnoty

na konci kúry „startovní“ a už u nich můžeme pozorovat ve většině případů významné rozdíly. Fakt, že rozdíly zůstávají signifikantní i během následujícího měsíce, ba že i dokonce experimentální skupina vykazuje rychlejší a na grafickém znázornění strmější růst, svědčí o tom, že léčba pomocí LFES zanechala u léčené skupiny dlouhodobé pozitivní následky. Lze tedy hovořit o pozdních účincích procedury. Neléčená skupina též vykazovala lineární, z časem vzrůstající trend svědčící o hojení, nicméně ve většině případů významně nižší než léčená skupina. Strmější lineární trend experimentální skupiny vypovídá o efektu způsobeném interakcí času s léčbou. Invazivní aplikace elektrod, která by nemusela být komfortní pro některé pacienty.

Celkově studii hodnotím jako přínosnou, relevantní a validní pro účely mé bakalářské práce z důvodu správně použitých metod, výběru indikátorů a použití komplexní analýzy výsledků. Studie dostatečně přispívá informacemi pro dosažení cíle práce, protože popisuje fyziologickou podstatu hojení i výsledný stav hojení.

### **5.2.3 Studie RAMPAZO et al. (2016)**

*„High voltage pulsed current in collagen realignment, synthesis, and angiogenesis after Achilles tendon partial rupture“*

Autoři testují efekt vysokovoltážní pulzní terapie (HVPC) na syntézu kolagenu a angiogenezi po částečné ruptuře achillovy šlachy. Animální studie o čtyřiceti krysách byla rozdělena do následujících čtyř skupin: kontrolní skupina (KS), která podstoupila placebo stimulaci; experimentální skupina stimulovaná katodou (XS1); experimentální skupina stimulovaná anodou (XS2); a experimentální skupina léčená střídavě 3 dny katodou a 3 dny anodou (XS3). Všem skupinám byla pod anestezií navozena částečná ruptura achillovy šlachy trakčním přístrojem.

#### **Parametry elektrické stimulace**

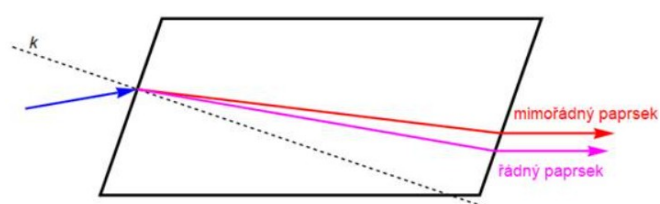
Parametry HVPC byly nastaveny následovně: intenzita prahově senzitivní, délka impulsu 5  $\mu$ s (dvojitě impulsy), 100  $\mu$ s interpulsní pauza, frekvence 120 pulsů za sekundu. Aplikace probíhala denně třicet minut po dobu šesti dní. Aktivní elektroda (katoda, respektive anoda) byly uloženy přes místo poranění a indiferentní elektroda o velikosti 3 x 5 cm byla uložena na záda krysy. Kontrolní skupina byla podrobena placebo léčbě s vypnutým stimulatorem.

## Indikátory

Jakožto indikátory byly zvoleny: hustota kolegenních vláken typu I a typu III, vypočteno jako procentuální obsah vláken na oblast; míra angiogeneze, vypočteno jako počet cév na oblast; a optické zpoždění po dvojlomu.

Optické zpoždění po dvojlomu (birefringence optical retardation) je metoda, která určí tloušťku média (polarizátoru, v tomto případě kolagenní tkáň) na základě optické retardace mezi řádným a mimořádným paprskem, které mají po výstupu z polarizátoru rozdílnou vlnovou délku (Rampazo et al., 2016).

Obrázek 5.2.3.1: Dvojlom (Reichl, Všetická, 2022)



Obrázek 5.2.3.1 popisuje dvojlom. Indikátor tedy ve stručnosti měří mohutnost kolagenní tkáň pomocí světelného mikroskopu.

## Výsledky

Po šestém dnu léčby byly subjekty usmrceny a jejich achillovy šlachy odebrány pro histopatologické měření. P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ .

Tabulka 5.2.3.1: mezi KS, XS1, XS2 a XS3 nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl ani u jedné ze čtyř kategorií indikátorů. V tabulce jsou zobrazeny střední hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky.

Tabulka 5.2.3.1: Výsledky měřených indikátorů (Rampazo et al., 2016)

Výsledky	Optické zpoždění (nm)	Hustota kolagenních vláken I (%)	Hustota kolagenních vláken III (%)	Počet cév / mm <sup>2</sup>
KS	68.02 $\pm$ 18.09	14.4 $\pm$ 7.1	85.5 $\pm$ 7.1	38.17 $\pm$ 6.53
XS1 (anoda)	63.33 $\pm$ 32.02	15.3 $\pm$ 7.8	84.7 $\pm$ 7.8	32.26 $\pm$ 9.95
XS2 (katoda)	66.81 $\pm$ 30.11	19.2 $\pm$ 10.4	80.8 $\pm$ 10.4	38.98 $\pm$ 13.59
XS3 (střídavá ap.)	68.18 $\pm$ 23.47	19.4 $\pm$ 12.9	80.8 $\pm$ 13.0	39.74 $\pm$ 13.69



P-hodnota	0.91	0.57	0.57	0.45

## Závěr

Denní třiceti-minutová HVPC stimulace neměla žádný efekt pro syntézu kolagenu a tvorbu cév v případě částečné ruptury achillovy šlachy. Proto, dle autorů, nemá HVPC terapeutický potenciál pro léčbu strukturálně poškozené šlachové tkáně. Nebyl potvrzen přímý hojivý účinek elektrické stimulace.

## Zhodnocení

Indikátory byly vybrány tak, aby dostatečně vysvětlili potenciální fyziologickou příčinu hojení. Nicméně šestidenní léčebné období je v porovnání s dobou testování v předchozích člancích krátké. Proto se domnívám, že výsledky mohly být ovlivněny příliš krátkou dobou léčby.

Dalším faktorem, kterým autoři odlišují svou studii od předešlých studií, je rozložení elektrod. Domnívám se, že pokud by autoři zvolili schéma rozložení elektrod podobné těm v předchozích studiích, tj. obě elektrody v blízkosti poranění, byly by výsledky odlišné. Autoři však umístili indiferentní elektrodu relativně daleko od ruptury.

Celkově studii hodnotím jako relevantní pro účely mé bakalářské práce. Studie zkoumá přímý hojivý účinek elektrické stimulace pro strukturálně poškozenou šlachovou tkáň. Z důvodu krátké doby testování a schématu rozložení elektrod nepřisuzuji článku srovnatelnou validitu a přínosnost s předešlými články.

### 5.2.4 Studie BERETTA et al. (2009)

*„Effects Of Electric Stimulation On The Healing Of Tendon Of The Gastrocnemius Muscle In Rabbits“*

Cílem této studie bylo zhodnotit přímý hojivý účinek elektrické stimulace na regeneraci šlachy m. gastrocnemius u králíků, kteří podstoupily tenotomii s následnou tenorafii Kesslerovými stehy. Dvacet-čtyři králíků bylo rozděleno do čtyř skupin dle dne hodnocení výsledků: skupina hodnocená po sedmi, patnácti, dvaceti-jedna a třiceti dnech.

Operace byla vykonána na obou končetinách každého králíka, pravá končetina pak byla léčena pomocí transkutánní elektrické stimulace levá sloužila jako kontrolní (neléčená).

### **Parametry elektrické stimulace**

Pravá končetina králíků byla léčena transkutánní elektrickou stimulací střídavým proudem o intenzitě 2 mA, frekvenci 100 Hz, 6 minut denně po dobu 7,15,21 nebo 30 dní (dle skupin). Stimulace byla provedena pomocí svorkových elektrod, které byly umístěny proximálně a distálně od místa poranění, 0,5 cm od sebe. Polarita elektrod není v článku uvedena.

### **Indikátory**

Autoři zvolili jakožto indikátory buňky doprovázející zánět: množství polymorfonukleárních buněk, množství mononukleárních buněk a množství fibroblastů. Posledním indikátorem bylo množství nově vzniklých cév v místě poranění. Indikátory byly determinovány pomocí H&E barvení. Pro evaluaci výsledků byly šlachy králíkům odstraněny ve svou dobu dle skupiny.

### **Výsledky**

Jakožto p-hodnota zamítnutí nulové hypotézy byla stanovena  $p < 0,05$ .

Množství polymorfonukleárních buněk se zvýšilo prvních sedm dní po operaci, patnáctý den kleslo a další dny bylo stabilní. Mezi končetinami nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl.

Množství mononukleárních buněk (makrofágů) bylo stabilní po celou dobu vyhodnocování. Žádný signifikantní rozdíl mezi končetinami nebyl pozorován.

Počet fibroblastů ze postupně zvyšoval mezi 7. a 15. dnem, poté byl stabilní. Žádný signifikantní rozdíl mezi končetinami nebyl pozorován.

Počet nově vytvořených cév vzrostl prvních 7 a 15 dnů, dále se počet zmenšoval kvůli remodelační fázi hojení. Žádný signifikantní rozdíl mezi končetinami nebyl pozorován.

### **Závěr**

Transkutánní elektrická stimulace o daných parametrech nebyla schopná podpořit hojení strukturálně poraněné, suturované šlachy m. gastrocnemius. Autoři závěr vysvětlují na nerozdílnosti množství zánětlivých buněk, fibroblastů a počtu vzniklých cév. Autoři pro

pozitivní efekt doporučují elektrickou stimulaci aplikovanou invazivně a delší dobu procedury.

### **Zhodnocení**

Autoři správně připravili subjekty pro testování elektrické procedury – tenotomie byla ošetřena nejprve sešitím a až následně probíhala léčba elektrickou stimulací. Parametry elektrické procedury jsou zvoleny adekvátně s výjimkou doby procedury – šest minut je v porovnání s dobami procedur v předchozích hodnocených člancích netradičně málo. Autoři připouští, že to může být důvod negativního závěru.

Zvolit jako indikátory hojení buňky zánětlivé reakce je originální, nicméně pouze fibroblasty jsou indikátorem značícím přímý hojivý efekt cestou reparaace. Autoři tak mohli zakomponovat do své studie další relevantní indikátory značící přímé hojení potenciálně ovlivněné elektrickou stimulací jako např. množství kolagenních vláken určitého typu.

Celkově studii hodnotím jako relevantní a validní pro účely mé bakalářské práce zejména z důvodu zkoumání přímého hojivého účinku elektrické stimulace na poraněnou a následně suturovanou šlachu tím způsobem, že porovnává množství fibroblastů v místě poranění. Autoři zkoumají pouze potenciální fyziologickou podstatu hojení.

### **5.2.5 Studie AHMED, ELGAYES a IBRAHIM (2011)**

*„Polarity effect of microcurrent electrical stimulation on tendon healing: Biomechanical and histopathological studies”*

Autoři testují vliv polarity elektrod při mikroproudové stimulaci na hojení šlachy. Jedná se o animální studii, kdy devadesát králíků bylo rozděleno na následující skupiny: experimentální skupina léčená anodální stimulací (XSA), experimentální skupina léčená katodální stimulací (XSK) a kontrolní, neléčená skupina (KS). Všem skupinám byla vykonána úplná transekce pravé achillovy šlachy s následnou tenorafí a imobilizací (operace mimikující totální rupturu achillovy šlachy).

#### **Parametry elektrické stimulace**

Byla zvolena elektrická stimulace MES (mikroproudová terapie / microcurrent electrical stimulation) s intenzitou  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , frekvencí 10 Hz a délkou impulsu 50 ms. Doba stimulace byla třicet minut, šestkrát týdně. Aktivní elektroda (anoda, respektive katoda) o velikosti 1 x 1 cm byla uložena přes místo poranění, indiferentní proximálně na stehno.

## **Indikátory**

Autoři zvolili kombinaci biomechanických a histopatologických vlastností šlachy k určení rozdílů mezi skupinami. Jakožto biomechanické vlastnosti šlachy byly měřeny: pevnost v tahu (N), tuhost (N / mm), napět'ová relaxace (N), modul pružnosti (N / mm<sup>2</sup>) a vykonaná práce (mJ).

Modul pružnosti je definován jako míra schopnosti materiálu udržet si svůj tvar při působení vnějších zatížení. Vyjadřuje závislost mezi napětím a přetvořením (Vybíral; Janura, 2003).

Vykonaná práce šlachy byla determinována jako množství energie přenesené silou působící na určitou vzdálenost.

K měření biomechanických vlastností byl použit multifunkční přístroj Lloyd instruments LR10K (Lloyd Instruments Ltd, West Sussex, UK).

Co se týče histopatologických determinantů hojení, autoři popisují stav zánětu a organizaci kolagenních vláken pomocí H&E barvení.

## **Výsledky**

Naměřené výsledky skupin byly evaluovány třetí, pátý a osmý týden po operaci. Výsledky byly vysvětlovány dvoufaktorovou analýzou rozptylu (two-way ANOVA) pro určení efektu času a efektu MES. Následně byly porovnávány výsledky mezi třetím, pátým a osmým týdnem. P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ . Pro přehlednost bakalářské práce jsem se rozhodl heslovitě uvést pouze signifikantní rozdíly mezi skupinami a týdny v rámci kategorií indikátorů.

### **Napět'ová relaxace (N)**

Efekt času: signifikantní rozdíl v hojení u každé skupiny (XSK, XSA, KS), dále signifikantní rozdíl mezi 3. a 5. týdnem, i mezi 5. a 8. týdnem.

Efekt MES: signifikantní rozdíl v hojení 3., 5. i 8. týden mezi XSK, XSA a KS. XSK měla signifikantně lepší výsledky po 3. týdnu než XSA. XSA měla signifikantně lepší výsledky po 5. a 8. týdnu než XSK.

### **Tuhost (N / mm)**

Efekt času: signifikantní rozdíl v hojení u každé skupiny (XSK, XSA, KS), dále signifikantní rozdíl mezi 3. a 5. týdnem, i mezi 5. a 8. týdnem.

Efekt MES: signifikantní rozdíl v hojení 3., 5. i 8. týden mezi XSK, XSA a KS. XSK měla signifikantně lepší výsledky po 3. týdnu než XSA. XSA měla signifikantně lepší výsledky po 5. a 8. týdnu než XSK.

### **Modul pružnosti (N / mm<sup>2</sup>)**

Efekt času: signifikantní rozdíl v hojení u každé skupiny (XSK, XSA, KS), dále signifikantní rozdíl mezi 3. a 5. týdnem, i mezi 5. a 8. týdnem.

Efekt MES: signifikantní rozdíl v hojení 3., 5. i 8. týden mezi XSK, XSA a KS. XSK měla signifikantně lepší výsledky po 3. týdnu než XSA. XSA měla signifikantně lepší výsledky po 5. a 8. týdnu než XSK.

### **Práce (mJ)**

Efekt času: signifikantní rozdíl v hojení u každé skupiny (XSK, XSA, KS), dále signifikantní rozdíl mezi 3. a 5. týdnem, i mezi 5. a 8. týdnem.

Efekt MES: signifikantní rozdíl v hojení 3., 5. i 8. týden mezi XSK, XSA a KS. XSK měla signifikantně lepší výsledky po 3. týdnu než XSA. XSA měla signifikantně lepší výsledky po 5. a 8. týdnu než XSK.

Histopatologické studie zjistili mírnější zánětlivou odpověď u XSK a XSA v porovnání s KS a lepší uspořádání kolagenních vláken, což vysvětluje lepší biomechanické vlastnosti.

### **Závěr**

Elektrická stimulace pomocí MES přispěla k lepšímu hojení suturované achillovy šlachy. Byl prokázán rozdílný efekt elektrod. Stimulace katodou měla lepší výsledky v počáteční fázi hojení díky svému přitažlivému vlivu na makrofágy (podpořená celulární migrace). Makrofágy fagocytují (debridement), facilitují angiogenezi, a podporují proliferaci fibroblastů a následnou syntézu kolagenu. Anodální stimulace se prokázala jako efektivnější v pozdních fázích hojení. Došlo k facilitaci hojení povrchové rány a k dalšímu hojení šlachy, což vyústilo k zlepšení biomechanických parametrů. Polarita elektrod tedy má vliv na hojení. Katodální stimulace vykazuje lepší výsledky v ranné fázi poranění, kdežto anodální stimulace v pozdní fázi.

## Zhodnocení

Autoři vybrali bohaté spektrum biomechanických vlastností jakožto indikátory rozdílu mezi experimentální skupinami a kontrolní skupinou. Pozitivní závěry těchto indikátorů jsou navíc podloženy fyziologickou příčinou. Parametry elektrické stimulace a doba testování a design studie byly adekvátní k ověření efektu.

Celkově studii hodnotím jako zásadní z kategorie „efekt elektrické stimulace pro hojení šlach“ pro účely mé bakalářské práce, protože je relevantní a validní z důvodu dostatečných a správně vybraných použitých metody testování a indikátorů. Naměřené výsledky jsou dostatečně vysvětleny. Studie navíc přispívá svým pozorováním rozdílného přímého hojivého efektu v závislosti na polaritě elektrod.

### 5.2.6 Souhrn výsledků studií elektrické stimulace pro hojení šlach

Tři z pěti prezentovaných článků týkajících se efektu elektrické stimulace pro hojení šlach přichází s pozitivním závěrem. Všech pět studií bylo animálních a pro testování efektu stimulace využili umělého poranění achillovy šlachy – částečnou nebo úplnou rupturu. Články s pozitivním závěrem se shodují v principu hojení, to jest facilitace fibroblastů k tvorbě kolagenu a následné intenzivnější reparaci.

V případě tří článků byla pokusným subjektům vykonána po tenotomii tenorafie Kesslerovými stehy (Casagrande et al., 2021; Beretta et al., 2009; Ahmed, Elgayed a Ibrahim, 2011). Autoři se tímto přiblížili klinicky osvědčené léčbě ruptur šlach. Oddělené konce rupturou musí být k sobě neprodleně přiblíženy a sešity před jakoukoli další léčbou podporující hojení, aby se předešlo vzniku nadměrné jizvy či jiným komplikacím, které popisují v části teoretického přehledu hojení strukturálně poraněných šlach (Park et al., 2020). Dva články, které takto primárně ošetřily operované šlachy došly k pozitivnímu závěru (Casagrande et al., 2021; Ahmed, Elgayed a Ibrahim, 2011), jeden přesto došel k negativnímu závěru (Beretta et al., 2009). Naopak jeden článek, kdy autoři zvolili umělou částečnou rupturou achillovy šlachy jakožto pokusnou patologii, došel k pozitivnímu závěru ačkoli neposkytl subjektům primární sešití částečné ruptury (Chan, Fung a NG, 2007).

Kvůli různorodosti použitých elektroprocedur, stejně jako v případě článků o svalové tkáni, nelze stanovit optimální parametry stimulace. Tři úspěšně hojení-podporující procedury však spojuje stimulace střídavým proudem o velmi nízkých frekvencích: 2 Hz, 10 Hz a 10

impulsů za sekundu. Intenzita byla zvolena proporčně vzhledem k tělesné konstituci animálních subjektů: 100  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  až 1 mA. Léčba pomocí elektrické stimulace probíhala denně nebo šest dní v týdnu po dobu dvaceti až třiceti minut. Experimentální skupiny byly léčeny dva až osm týdnů.

Dohromady pět hodnocených článků zahrnuje mnoho podstatných indikátorů objasňující příčinu hojení i výsledné vlastnosti šlachy. V případě článků o šlachách se jedná zejména o hustoty kolagenních vláken typu I a III a biomechanické vlastnosti. Elektrostimulační protokoly studií Chan, Fung a NG; Casagrande et al.; a Ahmed, Elgayed a Ibrahim mají pozitivní efekt pro přímé hojení šlach.

Dvě studie přichází s negativním závěrem. Možné důvody těchto negativních závěrů vysvětlují specificky v sekcích hodnocení obou těchto studií (Rampazo et al., 2016; Beretta et al., 2009).

## **5.3 Efekt elektrické stimulace pro hojení kůže a vazů**

### **5.3.1 Studie GÜRGEN et al. (2013)**

*„Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) Accelerates Cutaneous Wound Healing and Inhibits Pro-inflammatory Cytokines“*

Studie se zabývá hojivými účinky transkutánní elektrické neurostimulace (TENS) na kožní rány a porovnává její efekt s osvědčenými léčivy. Jedná se o animální studii rozdělující 48 krysy do následujících skupin: experimentální skupina léčená pomocí TENS (XS), skupina léčená pomocí fyziologického roztoku (PS – physiological saline), skupina léčená pomocí jodovaného povidonu (PI - povidone iodine), poraněná kontrolní skupina (KS) a neporaněná skupina (OS). Všem skupinám vyjma OS byla provedena 1 cm incize kůže na dorsu pro simulaci povrchové rány.

#### **Parametry elektrické stimulace, fyziologický roztok a jodovaný povidon**

Parametry TENS byly zvoleny následovně: frekvence 2 Hz s nízkou intenzitou. Stimulace probíhala jednou denně po dobu patnácti minut. Dvě elektrody o velikosti 2 x 1,5 cm byly umístěny 1,5 cm po stranách od incize na dorsu.

Fyziologický roztok a jodovaný povidon jsou běžně užívané a dostupné roztoky k hojení kožních ran a jiných povrchových defektů. Aplikují se formou nátěru (Bigliardi, 2017; Salami, Imosemi, Owoeye, 2006).

Skupiny XS, PS a PI byly léčeny po dobu pěti dnů.

#### **Indikátory**

Stupeň hojení od + do ++++ byl zvolen jako soubor hlavních histopatologických změn. Autoři z tohoto souboru rozlišují stupeň re-epitelizace, stupeň ústupu granulační tkáně a stupeň přiblížení krajů rány (uzavírání). Dalšími indikátory byly hladiny pro-zánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ .

#### **Výsledky**

Po pátém dnu léčby byly krysy usmrceny a jejich kůže s obsahem jizvy byla odebrána pro vzorkování. Následně byly vzorky podrobeny H&E barvení a imunohistochemickému rozboru. P-hodnota signifikantního rozdílu byla stanovena  $p < 0,05$ . Autoři použili pro



vyhodnocování biochemických a histologických dat jednotlivých skupin Kruskal-Wallisův test a pro určení rozdílu mezi skupinami Mann-Whitneyho *U* test.

*Tabulka 5.3.1.1: Výsledky stupně hojení kožní rány (Gürgen et al., 2013)*

Výsledky stupně hojení	Re-epitelizace	Ústup granulace	Uzavírání rány
KS	+	+	+
XS	+++	+++	++++
PS	++	++	++
PI	+	+	++

*Tabulka 5.3.1.1* zobrazuje výsledky histopatologických změn ve stupních. Skupina XS, léčená pomocí elektrostimulace, je dominantní v porovnání s ostatními skupinami.

*Tabulka 5.3.1.2: Hladiny pro-zánětlivých cytokinů skupin (Gürgen et al., 2013)*

Pro-zánětlivé cytokiny (pg / mg)	0S	KS	XS	PS	PI
IL-1 $\beta$	0.75 $\pm$ 0.28	9.31 $\pm$ 5.10	3.77 $\pm$ 1.14 *	3.81 $\pm$ 1.40 *	8.22 $\pm$ 1.44
IL-6	5.39 $\pm$ 2.14	59.05 $\pm$ 8.56	8.82 $\pm$ 2.56 *	9.82 $\pm$ 3.42 *	27.72 $\pm$ 5.83 *
TNF- $\alpha$	0.05 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 0.14	0.11 $\pm$ 0.09 *	0.15 $\pm$ 0.12 *	0.56 $\pm$ 0.13 *

*Tabulka 5.3.1.2* zobrazuje střední hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky naměřených hladin pro-zánětlivých cytokinů. Hvězdičkou \* jsou označeny signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ) léčených skupin v porovnání s kontrolní skupinou. Toto porovnání není provedeno u neporaněné skupiny 0S.

## **Závěr**

Autoři potvrdili přímý hojivý účinek elektrické stimulace pro hojení kožních ran. TENS inhibovala pro-zánětlivé cytokiny a zvýšila tak stupeň re-epitelizace. TENS dále omezila tvorbu granulační tkáně a způsobila rychlejší přiblížení okrajů rány. Elektrostimulace byla mírně účinnější v porovnání s léčbou fyziologickým roztokem a násobně účinnější v porovnání s léčbou jodovaným povidonem.

## **Zhodnocení**

Design studie, rozdělení skupin a použité metody byly vybrány racionálně pro testování hojivého efektu. Chirurgická incize kůže dostatečně mimikuje porušení integrity kůže. Kromě hlavního závěru autorů, zda-li elektrostimulace navozuje hojení kůže, je přínosný i závěr porovnávací TENS s osvědčenými farmaceutickými léčivy. Ačkoli léčba probíhala pouze pět dní, byl to dostatečný čas pro naměření signifikantních výsledků. Co se parametrů elektrické stimulace týče, autoři uvádí pouze „nízkou“ použitou intenzitu, místo absolutní hodnoty. Autoři sami přiznávají, že ačkoli dosáhli pozitivního závěru, jejich studie nevysvětluje příčinu hojení dostatečně. Příčina hojení by byla odhalena při použití imunostainingu (markerů) kožních kmenových buněk a fibroblastů jakožto indikátorů.

Celkově studii hodnotím jako přínosnou, validní a relevantní pro účely mé bakalářské práce, protože správně a dostatečně testuje vliv elektrické stimulace pro hojení kožních ran. Studie však neobsahuje imunohistologické ověření regenerace či reparace pro osvětlení příčiny hojení.

### **5.3.2 Studie ABEDIN-DO et al. (2021)**

*“Effect of Electrical Stimulation on Diabetic Human Skin Fibroblast Growth and the Secretion of Cytokines and Growth Factors Involved in Wound Healing”*

Testování efektu elektrické stimulace autoři zaměřili na lidské diabetické kožní fibroblasty (DHSF – diabetic human skin fibroblast). Jedná se o studii in vitro, kdy DHSF byly odebrány z amputovaných končetin diabetických pacientů. Autoři vybrali tyto buňky, protože předpokládají jejich nedostatečnou proliferační aktivitu za příčinu chronicky nehojících se diabetických povrchových defektů, jako jsou například dekubity.

## **Parametry elektrické stimulace**

Stejnoseměrný proud o intenzitách 20, 40, 60, 80 nebo 100 mV byl použit pro stimulaci buněčné kultury po dobu šesti nebo 24 hodin. Stimulace buněčných kultur byla umožněna pomocí vodivých membrán. Kontrolní skupina byla stimulována nulovou intenzitou.

## **Indikátory**

DHSF's byly podrobeny následujícím měřením: MTT Assay – míra metabolické aktivity fibroblastů, LDH Activity – míra cytotoxicity, míra buněčná adheze na experimentálních membránách, velikost buněčné populace (počet fibroblastů), míra sekrece cytokinů (měřeno pomocí Milliplex Human Cytokine/Chemokine 48-plex kit) a míra sekrece růstového faktoru FGF-7 (měřeno pomocí ELISA kit).

## **Výsledky**

P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ . Pro přehlednost bakalářské práce jsem zvolil stručný slovní popis naměřených výsledků se zdůrazněním signifikantních rozdílů. Výsledky byly vyhodnocovány po šesti a 24 hodinách.

Intenzita 20 a 40 mV /mm se projevila jako nejvíce stimulační pro růst a proliferaci DHSF – signifikantně vyšší hodnoty byly naměřeny v porovnání s vyššími intenzitami a s kontrolní skupinou. Vyšší intenzity (80, 100 mV /mm) byly cytotoxické. Stimulace po dobu 6 hodin je produktivní – signifikantně vyšší hodnoty byly naměřeny v porovnání se skupinou stimulovanou 24 hodin, stimulace po dobu 24 hodin se prokázala jako cytotoxická (přežil menší počet buněk).

Adheze na experimentálních membránách proběhla kompletně u stimulované i kontrolní skupiny, nicméně stimulovaná skupina intenzitou 20 a 40 mV /mm prokázala signifikantně vyšší přežití DHSF po 6 i po 24 hodinové stimulaci.

Efekt elektrické stimulace na sekreci cytokinů byl měřen ihned po stimulaci a 48 hodin po stimulaci. Převažují signifikantně vyšší výsledky zvýšené sekrece u skupin stimulovaných 6 hodin intenzitou 20 mV / mm, naopak stimulace 24h sekreci cytokinů signifikantně snížila (průměrné výsledky).

Sekrece FGF-7 byla signifikantně vyšší při použití stimulace s intenzitou 20 mV / mm po dobu 6 hodin. Stimulace 40 mV mm nevyvolala signifikantní rozdíl v sekreci v porovnání s kontrolní skupinou, ale byla signifikantně nižší v porovnání se skupinou stimulovanou

intenzitou 20 mV / mm. 24 hodinová stimulace 20 i 40 mV / mm neměla na intenzitu sekrece téměř žádný vliv.

Elektrostimulované DHSF ze skupin 6 h a 24 h byly dále odebrány z experimentálních membrán a byly živené jako subkultury in vitro dalších 5 dní. I po 5 dnech vykazovaly tyto DHSF signifikantně intenzivnější růst a proliferaci v porovnání s kontrolní skupinou.

### **Závěr**

Autoři stanovili optimální parametry stejnosměrného proudu pro facilitaci proliferace lidských diabetických kožních fibroblastů a sekreci růstového faktoru FGF-7 a cytokinů. Nižší intensity napětí, 20 a 40 mV / mm po dobu šesti hodin vedly k pozitivním výsledkům množení fibroblastů. Vliv elektrické stimulace na proliferaci fibroblastů navíc v pokusných in vitro podmínkách přetrval i 5 dní po ukončení stimulace. Autoři závěrem navrhují využití elektrické stimulace pro léčbu povrchových, pomalu-hojících se poranění diabetických pacientů.

### **Zhodnocení**

V porovnání s předchozím hodnoceným článkem o efektu elektrické stimulace na hojení kůže nabízí tato in vitro studie pouze potenciální příčinu přímého hojení, ale ne výsledky samotného hojení. Fibroblasty produkující kolagen jsou příčinou hojení kůže, vazů, podkoží a příčinou reparace obecně. Proto facilitace množení fibroblastů je žádoucí pro urychlení hojícího procesu u chronicky problematických kožních defektů jako jsou například dekubity. Nicméně in vitro studie postrádá znázornění výsledku děje, který byl úspěšně experimentálně podpořen – stupeň hojení rány, re-epitelizace kůže, uzavírání kožní rány atd. Autoři používají dostatečné množství indikátorů k zformování přesvědčivého závěru. Přispívají i stanovením optimálních parametrů použité elektrostimulace.

Studii pokládám celkově za přínosnou a validní, protože svým postupem správně testuje přímý hojivý účinek elektrické stimulace pro hojení kůže. Studie přichází s pozitivním závěrem o efektu elektrické stimulace pro facilitaci množení buněk klíčových pro hojení.

### **5.3.3 Studie BRAVO et al. (2021)**

*„Microcurrent stimulates cell proliferation and modulates cytokine release in fibroblast cells“*

Cílem autorů bylo analyzovat efekt mikroproudové stimulace na in vitro kulturu animálních fibroblastů izolovaných z pojivové tkáně. Autoři porovnávají výsledky stimulací po použití různých intenzit.

#### **Parametry elektrické stimulace**

Skupiny byly rozděleny do pěti skupin dle výše intenzity: G60, G100, G500, G900 (G – group, číslovka značí počet  $\mu\text{A}$ ) a GC - kontrolní skupina, která nebyla podrobena žádné stimulaci. Frekvence stimulace byla nastavena na 600 Hz. Doba stimulace probíhala jednou denně po dobu tří minut. Skupiny byly dále rozděleny na stimulované jeden, dva a tři dny (1 – 3x stimulace). Elektrody byly ponořeny přímo do media v Petriho misce obsahující kulturu fibroblastů.

#### **Indikátor**

Jako jediný indikátor byl zvolen počet buněk po stimulaci, což se též dá označit velikostí populace, nebo buněčnou životností: „cell viability“ – poměr původního počtu buněk ku počtu zemřelých buněk odečteného od původního počtu buněk (kolik buněk přežije stimulaci, respektive kolik jich přibude). Indikátor byl determinován pomocí MTT Assay (metabolická aktivita).

#### **Výsledky**

Výsledky naměřené cell viability (dále CV) byly poměřovány s úplnou (100 %) kontrolní skupinou. Studie neobsahuje číselné hodnoty naměřených dat, jsou uvedena pouze grafická zobrazení středních hodnot  $\pm$  směrodatné odchylky a signifikance ( $p < 0,05$ ).

První den stimulace se skupiny G60 a G500 nezměnily, kdežto CV skupin G100 a G900 dokonce mírně poklesla.

Druhý den stimulace nastal u každé skupiny zvrát ve prospěch růstu CV. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u skupin G500 a G900 – dle mého odhadu z grafického zobrazení středních hodnot směrodatné odchylky vzrostla buněčná populace fibroblastů u těchto skupin o 12 %.

Poslední experimentální den, po třetí stimulaci, se opět velikosti populací víceméně vrátili původního stavu (100 %), což znamená úbytek populace. Nejmenší populace byla u skupiny G500, která spadla na 90 % a v porovnání s 112 % v předešlém dni se tak jedná o signifikantní rozdíl.

## **Závěr**

Dle výsledků autorů se jako optimální intenzita mikroproudové stimulace pro proliferaci fibroblastů prokázala intenzita 500  $\mu$ A. Třiminutová stimulace dosáhla nejlepších výsledků druhý den, tzn. po druhé aplikaci. Úpadek po třetí aplikaci vysvětlují autoři jakožto důsledek buněčné konfluence – kontaktní inhibice způsobená přemnožením buněk v misce. Autoři dokázali, že mikroproudová stimulace má efekt na množení fibroblastů – klíčových buněk pro produkci kolagenu pojivových tkání.

## **Zhodnocení**

Zásadní limitace, které autoři sami připouští, je nízká variabilita parametrů stimulace: délka stimulace a frekvence. Delší doba aplikace a nižší frekvence se v předchozích hodnocených člancích prokázala jako efektivní. Statistická analýza výsledků je nedostatečně vysvětlená, ale její logiku lze odvodit z designu a hlavního indikátoru studie. Jedná se o studii, která svým designem zároveň odhaluje i optimální parametry pro stimulaci a dochází tak k finálnímu efektivnímu stimulačnímu protokolu. Životnost buněk jakožto jediný indikátor je plně dostačující k dosažení autory stanoveného cíle, ale stejně jako v předchozí studii (Abedin-Do et al., 2021) popisuje pouze potenciální příčinu hojení pojivových tkání bez zdokumentování následků (stupeň hojení kůže nebo vazů), což je pro studie in vitro charakteristické.

Studii pokládám celkově za přínosnou a validní, protože svým postupem správně, i když nepřímou, testuje přímý hojivý účinek elektrické stimulace pro hojení kůže. Studie přichází s pozitivním závěrem o efektu elektrické stimulace pro facilitaci množení buněk klíčových pro hojení.

### 5.3.4 Studie CHAO et al. (2007)

„Effects of Applied DC Electric Field on Ligament Fibroblast Migration and Wound Healing“

Cílem autorů je testovat efekt stejnosměrného proudu na intenzitu celulární migrace fibroblastů předního zkříženého vazů (dále ACL). Celulární migrace podpořená elektrickou stimulací se nazývá galvanotaxe. Autoři rozdělují dvě experimentální in vitro skupiny: skupina obsahující pouze fibroblasty, které byly odebrány z animálních ACL a následně kultivovány – buněčná skupina; a skupina, která obsahovala  $\sim 1 \text{ mm}^3$  narušené tkáň z ACL – hojící skupina. Buněčná skupina kromě fibroblastů obsahovala i kloubní chondrocyty.

#### Parametry elektrické stimulace

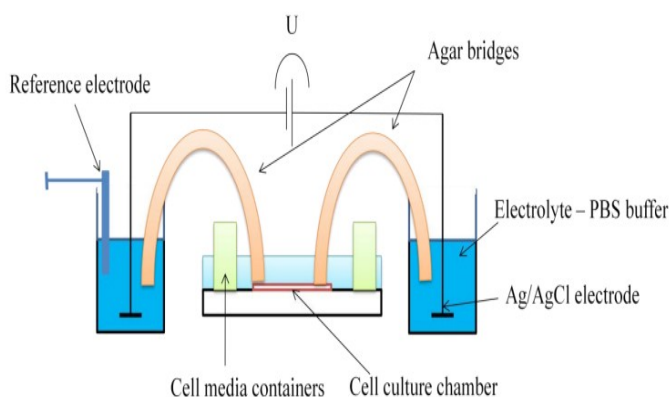
Autoři zvolili dva následující stimulační protokoly:

1) Stejnosměrný proud s intenzitou elektrického pole 0, 2 a 6 V/cm byl testován jednu hodinu pro subkonfluentní buňky (částečně pokrývající plochu skla) buněčné skupiny a tři hodiny pro hojící skupinu.

2) Pulzní stejnosměrný proud s intenzitou elektrického pole 2 V/cm byl testován s frekvencí 0,008 a 0,025 Hz.

V případech obou protokolů byla použita galvanotaxní komora (Obrázek 5.3.4.1) jakožto schéma rozložení elektrod a zároveň způsob stimulace k dosažení cíle autorů. Tento způsob stimulace je určený k rozdělení či přesunu buněk k jednomu z pólů a k určení rychlosti těchto procesů (Bengtsson, 2011).

Obrázek 5.3.4.1: Galvanotaxní komora (Bengtsson, 2011). Legenda k obrázku 5.3.4.1:



Reference electrode – referenční elektroda, Agar bridges – agarové mosty, Electrolyte: PBS buffer – elektrolyt: PBS pufr, Ag/AgCl electrode – Ag/AgCl elektroda, Cell media containers – nádoby s buněčným médiem, Cell culture chamber – komora s buněčnou kulturou

## Indikátory

Autoři zvolili následující indikátory: Rychlost celulární migrace ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) fibroblastů a chondrocytů a množství (%) buněk migrovaných ke katodě – tyto veličiny byly determinovány pomocí manuálního trackingu buněk při mikroskopickém zobrazení.

Dále byla měřena intenzita exprese kolagenu typu I (Col I/GAPDH) – měřeno pomocí vazby s označenými protilátkami); a rychlost uzavírání rány u hojící skupiny ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) – vypočítáno pomocí počítačového programu a mikroskopického zobrazení mezery mezi okraji rány.

## Výsledky

P-hodnota signifikance byla stanovena  $p < 0,05$ . Autoři neuvádějí číselná data naměřených výsledků. Studie obsahuje slovní popis jevů a naměřených signifikantních, respektive nesignifikantních rozdílů mezi skupinami, a také grafická zobrazení s popisy.

Rychlost migrace fibroblastů byla signifikantně vyšší než rychlost migrace chondrocytů i při nulové intenzitě stimulace ( $0 \text{ V} / \text{cm}$  – kontrolní, placebo stimulace). Po hodinové stimulaci elektrickým polem o intenzitě  $6 \text{ V} / \text{cm}$  se zvýšila rychlost migrace ke katodě u obou typů buněk signifikantně. Při testování různých intenzit stimulace se však prokázala intenzita elektrického pole  $2 \text{ V} / \text{cm}$  jako signifikantně efektivnější v porovnání s intenzitou  $6 \text{ V} / \text{cm}$ .

Procentuální množství buněk migrujících ke katodě se signifikantně zvýšilo po hodinové stimulaci elektrickým polem o intenzitě  $6 \text{ V} / \text{cm}$  v porovnání s  $0 \text{ V} / \text{cm}$ , a sice až o 40 % v případě obou skupin. Stimulace  $6 \text{ V} / \text{cm}$  vyvolala pohyb signifikantně většího množství buněk v porovnání se stimulací intenzitou  $2 \text{ V} / \text{cm}$ , a sice až o 30 %.

Intenzita exprese kolagenu typu I u stimulované skupiny se zdvojnásobila po tříhodinové stimulaci pulzním polem o intenzitě  $2 \text{ V} / \text{cm}$  a frekvenci  $0,025 \text{ Hz}$  v porovnání s kontrolní, nestimulovanou skupinou – jedná se o signifikantní rozdíl. Byla měřena i exprese kolagenu u stimulace statickým polem po dobu dvou hodin, kde exprese se zvýšila o cca 40 %. Stimulace s frekvencí  $0,025 \text{ Hz}$  zároveň zachovala srovnatelnou rychlost celulární migrace fibroblastů jako u buněčných populací stimulovaných statickým polem. Stimulace s frekvencí  $0,008 \text{ Hz}$  nevedla k srovnatelné rychlosti buněčné migrace a proto nebyla testována pro intenzitu exprese kolagenu typu I.



U hojící skupiny s  $\sim 1 \text{ mm}^3$  tkáně z ACL obsahující ránu (narušení integrity kolagenních vláken na mikroskopické úrovni) bylo pozorováno pomalejší zacelování rány u stimulovaných skupin v porovnání s nestimulovanou skupinou. Pulzní elektrické pole o intenzitě  $2 \text{ V / cm}$  sice projevilo závislost na frekvenci – frekvence  $0,008 \text{ Hz}$  vedla k signifikantně rychlejšímu uzavírání rány v porovnání s frekvencí  $0,025 \text{ Hz}$ , ale i přesto statické i pulzní elektrické pole mělo signifikantně inhibiční vliv na uzavírání rány.

### **Závěr**

Závěrem autorů je prokázání pozitivního efektu elektrické stimulace o daných parametrech pro intenzitu (rychlost a množství buněk) celulární migrace a intenzitu exprese kolagenu migrujících fibroblastů. Uzavírání rány narušeného vzorku ACL tkáně bylo stimulací stejnosměrným i pulzním proudem inhibováno.

### **Zhodnocení**

Design i výběr indikátorů této studie byl nastaven k dostatečnému vysvětlení možné příčiny i následků hojení vazivové tkáně. Přestože autoři potvrdili pozitivní efekt elektrické stimulace pro intenzitu buněčné migrace fibroblastů a expresi kolagenu typu I v buněčné, příčinné studii, nedosáhli očekávaného a analogického pozitivního výsledku v případě hojící studie. Tento rozporuplný závěr může omezit realizaci testování se stejnými parametry stimulace in vivo.

Výběr stejnosměrného proudu je pro testování hojivého efektu menšinový mezi články spadající do mé systematické rešerše, nicméně je racionální pro záměry autorů způsobit galvanotaxi. Jedině tak může dojít k ovlivnění směru a determinování intenzity přesunu buněk k pólu. Z důvodu ojedinělosti takového typu testování nemohu porovnat a hodnotit parametry stimulace použité autory této studie.

Celkově studii hodnotím jako přínosnou, validní a relevantní pro účely mé bakalářské práce, protože správně a dostatečně testuje efekt elektrické stimulace na přímé hojení vazivové tkáně formou ovlivnění intenzity celulární migrace fibroblastů. Studie přichází s pozitivním závěrem ohledně efektu elektrické stimulace pro intenzitu celulární migrace klíčových buněk pro reparaci vazivové tkáně. Tyto klíčové buňky, fibroblasty, navíc produkovaly více kolagenu při podpoře elektrickou stimulací. Studie ale přichází s negativním závěrem ohledně efektu stimulace statickým i pulzním stejnosměrným proudem na rychlost zacelení narušené integrity vazivové tkáně.

### 5.3.5 Souhrn výsledků studií elektrické stimulace pro hojení kůže a vazů

Odbornou literaturu zkoumající účinek elektrické stimulace na hojení kůže a vazů jsem se rozhodl sjednotit do jedné kategorie z důvodu podobného principu fyziologické příčiny hojení, a sice principu facilitace fibroblastů.

Dohromady jsem do rešerše zařadil čtyři odborné články, z toho tři popisující efekt stimulace pro hojení kůže a jedna pro hojení vazů. Pouze jedna studie je animální, zbylé tři jsou studie in vitro. Autoři dvou in vitro studií odebírají fibroblasty animálním subjektům, zbylá in vitro studie odebírá fibroblasty z lidské diabetické kůže. Všechny čtyři články přichází s pozitivním závěrem. Došlo k podpoře přímého hojení vlivem elektrické stimulace (v případě studie in vivo), dále došlo k facilitaci proliferace fibroblastů, klíčových buněk pro hojení zmíněných tkání, a také k podpoře celulární migrace fibroblastů.

Parametry elektrické stimulace jsou opět různorodé. Pouze Gürgen et al. použili pro svou in vivo studii známý elektroléčebný protokol TENS. V případě in vitro studií nelze elektrickou stimulaci nazývat elektroterapií, protože se jedná o pokusné protokoly, které zohledňují možnosti in vitro testování: intenzita i schémata rozložení elektrod jsou z pochopitelných důvodů specifická pro stimulaci buněčné kultury v Petriho misce. Dvě studie testují střídavý proud, zbylé dvě stejnosměrný. Dále však z důvodu naprosté různorodosti typů a designů studií nemůžu blíže metanalyticky shrnout další společné znaky použitých stimulačních protokolů.

Dohromady tři hodnocené články týkající se kůže zahrnují mnoho podstatných indikátorů objasňující možnou příčinu hojení (proliferace fibroblastů vlivem elektrické stimulace u in vitro studií) i výsledný stav rány. Žádná ze tří studií však neobsahuje měření potenciální fyziologické příčiny hojení na buněčné úrovni v kombinaci s měřením výsledných změn rány. Testované elektrostimulační protokoly pro hojení kůže mají pozitivní efekt pro přímé hojení svalové tkáně.

Studie zabývající se hojením vazů byla analyzována pouze jedna. Přichází s pozitivním závěrem: elektrické stimulace podpořila celulární migraci klíčových buněk pro přímé hojení vazivové tkáně; a negativním závěrem: elektrická stimulace inhibovala rychlost uzavírání rány narušeného vzorku ACL tkáně.

## 6 Diskuze

### 6.1 Diskuze nad tématem bakalářské práce

Hojení strukturálně poraněných měkkých tkání je umožněno regenerativními a reparačními mechanismy lidského těla. Ne vždy je však přirozený hojivý proces dokonalý, rychlý či z jiného hlediska dostatečný. Proto se různé obory jako jsou například regenerativní medicína, farmakologie, ale i fyzikální terapie snaží navrhnout efektivní řešení těchto situací. Z hlediska fyzioterapie je žádoucí, aby k hojení měkkých tkání docházelo v co nejkvalitnější míře. Chronicky se hojící poranění, či poranění zhojená rozsáhlou vazivovou tkání tvořící adheze, negativně ovlivňuje řadu aspektů dynamiky i statiky lidského těla. A jelikož fyzioterapie disponuje přístupy fyzikální léčby jako je právě elektroterapie, směřoval jsem svou rešeršní činnost právě na efekt elektrické stimulace pro facilitaci hojivých procesů svalové a šlachové tkáně, dále kůže a vazů.

Elektroterapie se používá jakožto rehabilitační intervence pro tlumení bolesti pohybového aparátu, ovlivnění otoků, neurostimulaci a podobně. Tato práce však popisuje facilitační vliv elektrické stimulace na klíčové buňky a další faktory zprostředkovávající tkáňovou regeneraci či reparaci. Jinými slovy práce popisuje definovaný „přímý hojivý účinek“ rozličných stimulačních protokolů, které jsou potenciálně zařaditelné mezi ostatní elektroléčebné procedury.

V teoretickém přehledu práce jsem uvedl definiční rozdíl mezi přímým a nepřímým hojivým účinkem. Trofotropní účinek elektroterapie, pro účel mé bakalářské práce označený jako *nepřímý* hojivý účinek, je založený na principu způsobené vasodilatace cév a následném intenzivním přívodu živin lokálně do místa aplikace, to jest podpora lokálního metabolismu. Elektroprocedury s tímto již známým účinkem nebyly ovšem předmětem systematické rešerše.

K výběru tématu mě motivovala neprobádanost tématu na území České republiky a osobní zájem o metodiku léčby strukturálních sportovních poranění měkkých tkání, dále zájem o popsání potenciálně léčivého účinku fyzikální terapie – konkrétně elektroterapie.

## 6.2 Diskuze nad současným stavem výzkumu

Tři vyhledávací databáze byly použity pro získání relevantní odborné literatury: PubMed, ResearchGate a Web of Science. Patnáct článků z časového rozmezí od roku 2007 až 2022 bylo po screeningu relevance a dostupnosti zařazeno pro analýzu. Původní časové rozmezí mělo být stanoveno na posledních deset let, ale z důvodu nedostatku počtu potřebných odborných článků jsem jej musel rozšířit na patnáct let. Stádium výzkumu označuji objektivně za rané, z důvodu nalezení pouze animálních a in vitro studií splňující vyhledávací kritéria. Výzkum však probíhá nezávisle v mnoha zemích, což odvozuji dle afiliací autorů. Nejvíce odborných článků pochází z japonských a brazilských univerzit, dále z USA, Číny, Egypta, Itálie a Turecka.

Výzkum má zatím charakter experimentování s různými stimulačními protokoly ať už animálně či in vitro a autoři tak přináší originální studie, sice povětšinou s pozitivním závěrem a prokázáním terapeutického potenciálu, ale bez vzájemné návaznosti, natož přechodu do klinického výzkumu pro terapii pacientů. Odborná literatura tedy nabízí široké spektrum elektrostimulačních protokolů, jejichž parametry by mohly být v budoucnu aplikovány v klinických studiích. Autoři při animálním testování jdou naproti klinické realizaci ve smyslu časových možností potenciálního pacienta: například aplikace 30 minut, jednou až dvakrát denně. Ostatně ale autorům v současnosti jde spíše o fyziologické a histologické prokázání efektu, k čemuž je animální testování výhodné, protože umožňuje například odebrání části či celého svalu pro měření jeho stavu po aplikaci procedury. Dostupné jsou tedy veličiny, které z etického hlediska lze měřit pouze při animálních studiích, jako například hmotnost konkrétního svalu před vysušením a po vysušení (Fujiya et al., 2015; Yoshida et al., 2015). V případě in vitro studií autoři postupným zvyšováním intenzity elektrického proudu determinovali optimální stimulační parametry, respektive vyloučili příliš vysokou, cytotoxickou úroveň intenzity (Abedin-Do et al., 2021). To je výhoda a přínos in vitro studií – kontraproduktivní a nebezpečné parametry stimulace jsou známy před realizací klinických studií. Existují však naopak indikátory měřitelné pouze u lidských subjektů, jako je například funkce končetiny po poranění měkké tkáně.

Testování na pacientech a reálné užití elektrické stimulace k léčení strukturálně poraněných měkkých tkání je ale svízelné z mnoha důvodů. Jak bylo popsáno v teoretickém úvodu, intervence první volby při narušení integrity měkké tkáně je chirurgická operace (zejména tedy v případě ruptur šlach a svalů), jejímž cílem je sešít a přiblížit tak oddělené

konce poškozené struktury. Následně je postižený segment týdny až měsíce imobilizovaný a teprve potom pacient dochází na rehabilitační terapii. Rešeršovaná literatura však testuje a s pozitivním závěrem popisuje přímý hojivý efekt hlavně v akutní fázi poranění (Ahmed, Elgayed a Ibrahim, 2011; Wang, Qing-zhng a Dong-ming, 2021; Yoshida et al., 2015). Autoři nejspíše právě proto nazývají testovanou elektrickou stimulaci léčbou a ne prostředkem rehabilitace, či elektroterapií. Testování, či následné zařazení elektroléčby do pooperační péče, by obnášelo organizační změny dosavadních léčebných konvencí. Tento pooperační léčebný přístup by hypoteticky mohl vykonávat fyzioterapeut. Léčba poraněných tkání je v současnosti intenzivně studována oborem regenerativní medicíny, který přichází s odlišným přístupem, a sice importem externích kmenových buněk do místa poranění (O'brien, Barry, 2009). Tento výzkum je mnohonásobně rozšířenější, proto předpokládám, že se inovace v léčebných konvencích budou ubírat spíše tímto směrem. Facilitace aktivity tělu vlastních kmenových buněk, jako je popsána literaturou v této bakalářské práci, by hypoteticky mohl být pooperační léčebný přístup druhé volby, například z ekonomických důvodů.

### **6.3 Diskuze k efektivitě elektrické stimulace pro hojení měkkých tkání**

Šest z patnácti prezentovaných článků se zabývá efektem elektrické stimulace pro hojení svalové tkáně, pět článků se zabývá hojením šlach, tři hojením kůže a jeden hojením vazů. Třináct z patnácti analyzovaných článků přichází s pozitivním závěrem ve prospěch přímého hojení měkkých tkání. Za pozitivní závěr považuji jeden z následujících pěti závěrů: 1) Elektrická stimulace podpořila hojivé procesy strukturálně poraněných měkkých tkání formou facilitace regenerační či reparační aktivity tělu vlastních kmenových buněk, respektive fibroblastů. 2) Elektrická stimulace způsobila intenzivnější množení, diferenciaci a maturaci kmenových buněk a fibroblastů – klíčových buněk pro regeneraci, respektive reparaci. 3) Elektrická stimulace podpořila rychlost celulární migrace fibroblastů formou galvanotaxe. 4) Elektrická stimulace zlepšila výsledné histologické či biomechanické vlastnosti léčené měkké tkáně. 5) Elektrická stimulace urychlila hojivý proces – byl rychlejší v porovnání s nestimulovanou kontrolní skupinou.

Odborné články analyzované v této bakalářské práci se dají rozdělit dle pozorovaných indikátorů efektu a měřených veličin na studie objasňující podpořenou fyziologickou příčinu

hojení, studie prezentující histologické výsledky facilitovaného hojení, a studie které obsahly obě zmíněné kategorie.

Studie popisující potenciální fyziologickou příčinu přímého hojení podpořené elektrickou stimulací často uvádějí jako své indikátory markery, což jsou molekuly, které jakožto protilátky (antibodies) vytvoří vazbu s látkami, nejčastěji proteiny, korelujícími s aktivitou klíčových faktorů regenerace či reparace. Právě tyto proteiny jsou totiž buďto vylučovány klíčovými buňkami pro hojení během jejich aktivity, či slouží jako transkripční faktory doprovázející a umožňující kaskádu proliferačních, diferenciačních a maturačních dějů klíčových buněk. Pro znázornění těchto markerů používají autoři metodu immunostaining či jiné specializované postupy (assay kit). V rámci analýzy odborných článků zkoumajících vliv elektrické stimulace na hojení svalové tkáně byla tímto způsobem vysvětlena facilitovaná aktivita svalových satelitních buněk či myoblastů u všech šesti prezentovaných studií (Fujiya et al., 2015; Wang, Qing-zheng a Dong-ming, 2021; Zickri, 2014; Yoshida et al., 2015; Vadlamani et al., 2019; Bosutti et al, 2019). Autoři popisují vyšší proliferační, diferenciační aktivitu satelitních buněk v případě animálních studií či násobně větší velikost stimulované buněčné populace myoblastů a jejich pokročilejší maturaci v případě in vitro studií (Vadlamani et al., 2019; Bosutti et al, 2019).

Studie zabývající se přímým hojivým efektem u strukturálních patologií šlach uvádí jako kauzální indikátor hojení hustotu kolagenu typu I a III vyprodukovaného fibroblasty v signifikantně zvýšené míře po léčbě elektrickou stimulací (Casagrande et al., 2021). Elektrická stimulace dále přispěla k zmírnění zánětlivé odpovědi po poranění a k lepšímu uspořádání kolagenních vláken (Ahmed, Elgayed a Ibrahim, 2011).

Potenciální fyziologickou příčinu hojení kůže podpořenou elektrickou stimulací vysvětlují in vitro studie (Abedin-Do et al., 2021; Bravo et al., 2021). Tyto dvě studie prokázaly pozitivní vliv elektrické stimulace na velikost buněčné populace fibroblastů. Kromě toho Abedin-Do et al. prokázali signifikantně intenzivnější sekreci růstového faktoru FGF-7 a cytokinů u stimulovaných subjektů. In vitro studie zkoumající rychlost celulární migrace fibroblastů ve vazivové tkáni došla k pozitivnímu závěru, že pomocí mechanismu galvanotaxe byla migrace fibroblastů pomocí elektrické stimulace akcelerována (Chao et al., 2007). Tyto fibroblasty navíc produkovaly více kolagenu při podpoře elektrickou stimulací.

Studie prezentující výsledné stavy hojivých procesů po histologické stránce si jakožto své indikátory a měřené veličiny volily mikroskopicky pozorovatelné změny morfologie,

biomechanické vlastnosti, či hmotnostní parametry. Hojící se svalová vlákna s podporou elektrické stimulace vykazovala větší velikost průřezu CSA a hmotnosti svalů před vysušením i po vysušení vykazovali větší hodnoty u léčených skupin v porovnání s neléčenými skupinami (Fujiya et al., 2015; Yoshida et al., 2015). Patologická (poraněná) svalová vlákna se u léčených skupin vyskytovala v signifikantně menší míře v porovnání s neléčenými skupinami (Fujiya et al., 2015; Yoshida et al., 2015, Zickri, 2014). Na rozdíl od šlachové tkáně, žádná ze studií týkající se svalové tkáně nezkoumá biomechanické vlastnosti jako by v případě svalů mohla být například síla kontrakce nebo rychlost kontrakce – jedná se tedy o jednu z limitací současného, animálního výzkumu. Šlachová tkáň léčená elektrickou stimulací v případě studií s pozitivním závěrem vykazovala signifikantně lepší následující biomechanické vlastnosti: pevnost v tahu, napěťová relaxace, tuhost, modul pružnosti a práce (Ahmed, Elgayed a Ibrahim, 2011; Chan, Fung a NG, 2007). Casagrande et al. uvádějí lepší Healing score dle Stolla (Stoll, 2011) u léčených šlach po čtvrtém a šestém týdnu léčby v porovnání s kontrolními subjekty.

Léčená poraněná kožní tkáň pomocí elektrické stimulace prokázala větší stupeň re-epitelizace, granulace a uzavření rány v porovnání s neléčenou skupinou a se skupinami léčenými farmakologickými přístupy (Gürgen et al., 2013). In vitro studie zabývající se hojením vazivové tkáně přichází s negativním závěrem: rychlost zacelení rány pomocí elektrické stimulace nebyla vyšší v porovnání s nestimulovanou skupinou (Chao et al., 2007).

Šest studií hodnotí jak potenciální příčinu hojivých procesů tak i výsledné morfologické změny a jsou to tak studie, kterým přisuzuji nejvyšší hodnotu. Parametry elektrických stimulací použitých v těchto článcích mají nejvyšší pravděpodobnost úspěšných výsledků při potenciální aplikaci pro lidské subjekty v klinických studiích. V případě hojení svalové tkáně do této kategorie patří články Fujiya et al., Yoshida et al. a Zickri. Šlachová tkáň byla z obou zmíněných hledisek hodnocena autory Casagrande et al. a Ahmed, Elgayed a Ibrahim. Jediná analyzovaná studie zabývající se hojením vazů sice obsahuje testování in vitro, klinické realizaci nejvzdálenější způsob výzkumu, ale hodnotí příčinu hojení i výsledný stav morfologie tkáně (Chao et al., 2007). Rešeršovaná literatura týkající se hojení kůže sice dohromady poskytuje všestranné a dostatečné informace, ale žádný z hodnocených článků nezkoumá příčinu hojení i jeho morfologické výsledky dohromady.

Dvě z patnácti analyzovaných studií přichází s negativním závěrem. Obě tyto studie zkoumají účinek elektrické stimulace pro hojení šlach. Negativní výsledky těchto studií, jak podrobněji popisují v analytickém prezentování jednotlivých článků, byly dle autorů nejspíše způsobeny některými nevhodně zvolenými metodami testování: příliš krátká doba testování a nevhodné rozložení elektrod (Rampazo et al., 2016), či příliš krátká doba aplikované stimulace (Beretta et al., 2009).

## **6.4 Diskuze nad vedlejšími přínosy výzkumu**

V neposlední řadě bych rád uvedl vedlejší přínosy plynoucí ze závěrů zanalyzované literatury. Z naměřených výsledků konkrétních animálních studií s delší dobou experimentální léčby vyplývá, že elektrická stimulace při léčbě poraněných měkkých tkání přispívá k intenzivnějšímu hojení převážně v akutní fázi poranění (Ahmed, Elgayed a Ibrahim, 2011; Wang, Qing-zheng a Dong-ming, 2021; Yoshida et al., 2015). Autoři těchto studií tedy přisuzují hlavní potenciální benefity elektrické stimulace v prvním až třetím týdnu po operaci.

Ahmed, Elgayed a Ibrahim přispívají svými poznatky o vlivu polarity elektrod na hojení. Zjistili, že katodální stimulace místa poranění přispěla k přímému hojení převážně v časném stádiu poranění šlachy, kdežto anodální stimulace byla efektivnější v pozdním období hojení. Přestože se jednalo o stimulaci střídavým proudem, autoři se domnívají, že rozdíl byl způsoben efektem galvanotaxe katody na makrofágy, které hrají zásadní roli v akutní fázi zánětu. Analogicky Chao et al. došel k obdobnému závěru: stejnosměrný proud způsobil pohyb fibroblastů vazivové tkáně ke katodě.

Dalšími poznatky přispěly studie porovnávací léčivý efekt elektrické stimulace s jinými terapeutickými či léčivými přístupy. Yoshida et al. testují elektrickou stimulaci na poraněnou svalovou tkáň v kombinaci s ledováním. Ačkoli elektrická stimulace podpořila hojivý proces, aditivní účinek ledování ve smyslu dalšího urychlení hojení nebyl prokázán. Gürgen et al. pozorovali při porovnávání efektu běžně používaných farmakologických léčiv (fyziologický roztok a jodovaný povidon) kožních ran dominantní efekt elektrické stimulace pro hojení kůže.



## 6.5 Diskuze ohledně parametrů elektrické stimulace pro hojení měkkých tkání

Kvůli různorodosti stimulačních protokolů použitých autory prezentované odborné literatury je obtížné jednotlivé protokoly a jejich efektivnost porovnat metaanalyticky. Pouze Fujiya et al. a Yoshida et al. použili stejný stimulační protokol a dobu léčby, protože se jedná o výzkumné týmy s téměř stejným zastoupením autorů a jejich studie na sebe navazují. Navíc in vitro studie mají své limitované možnosti stimulování: způsob umístění elektrod i použité intenzity jsou specifické pro stimulaci buněčné kultury v Petriho misce, a stimulační parametry tak mají málo společného s parametry stimulací v animálních studiích. Je to kvůli odlišným cílům i podmínkám testování. Pakliže mám tedy identifikovat většinové a shodné znaky stimulační parametrů studií s pozitivním závěrem, musím se zaměřit pouze na animální studie.

V rámci kategorií měkkých tkání jsem již nastínil určité společné znaky efektivních stimulačních protokolů v kapitole analýzy odborné literatury. Vyjma studie Chao et al. zabývající se účinkem stejnosměrného proudu pro ovlivnění celulární migrace fibroblastů, je hlavním společným znakem prezentovaných studií užití stimulace střídavým proudem o relativně velmi nízkých frekvencích. Tyto testované stimulační protokoly mají frekvenční rozsah od 0,3 Hz po 20 Hz. Autoři nejspíše volili nízké frekvence testovacích stimulací z důvodu podobného frekvenčního rozsahu motorických jednotek pomalých červených vláken kosterní svaloviny (Zhang et al., 2010). Intenzita použitých stimulací se pohybovala v rozsahu desítek mikroampérů až jednoho miliampéru. Jedná se však o parametr, jehož hodnota je přizpůsobená tělesné konstituci drobných animálních subjektů a tudíž ho nelze považovat za pevně stanovený. Více vypovídající je určení subjektivní intenzity dle pozorovatelné kontrakce svaloviny, například Wang, Qing-zhng a Dong-ming pro testování své elektroléčby určili intenzitu jako prahově-motorickou. Doba aplikovaných stimulací byla v rozmezích desítek minut, s minimem 15 min a maximem 60 min. Aplikace probíhaly jednou až dvakrát denně, většinou každý den či třikrát až šestkrát týdně. Doba testování (doba léčby) je jeden z velmi různorodých faktorů. Nejkratší čas úspěšné léčby byl v případě pětidenní stimulace kožní tkáně (Gürgen et al., 2013), oproti tomu nejdelší doba léčby byla osmitýdenní stimulace poraněné Achillovy šlachy (Ahmed, Elgayed a Ibrahim, 2011).

## **6.6 Argumentace pro strukturu kapitoly teoretických východisek**

Jelikož výsledky mé rešerše obsahují odbornou literaturu týkající se převážně efektu elektrické stimulace na hojení svalové tkáně a šlach, je největší prostor teoretického přehledu věnován těmto dvěma tkáním. Naopak literatura týkající se stejného efektu pro kůži a vazivo je v rešerši zastoupena menšinou, proto jsou tyto tkáně popsány méně podrobně.

## 7 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo shrnout dostupné informace o současném stavu výzkumu efektivity elektrické stimulace pro hojení měkkých tkání. Tohoto cíle jsem dosáhl zpracováním systematické rešerše aktuální odborné literatury. Pomocí vyhledávacích databází a následnému třídění relevantních zdrojů jsem do své bakalářské práce zařadil patnáct odborných článků týkajících se efektu elektrické stimulace pro hojení strukturálně poraněných měkkých tkání. Odborná literatura byla následně podrobena analýze použitých postupů, naměřených dat a výsledným závěrům. Články byly dále hodnoceny z pohledu validity a relevance pro účel mé bakalářské práce. Mezi články podrobené rešeršní činnosti byly zařazeny studie zkoumající potenciální fyziologickou podstatu hojení ovlivněného elektrickou stimulací a výsledný histopatologický obraz poranění. Současný stav výzkumu je ve fázi testování rozličných elektrostimulačních protokolů pro ovlivnění aktivity kmenových buněk či fibroblastů, což jsou klíčové buňky zodpovědné za regenerační, respektive reparačních děje měkkých tkání. Výzkumné testování má v současnosti podobu převážně animálního testování a v druhé řadě testování in vitro.

Díky analýze odborné literatury jsem byl schopný zjistit zda a za jakých podmínek je elektrická stimulace pro hojení měkkých tkání efektivní. Třináct z patnácti studií přichází s pozitivním závěrem ve prospěch efektivity elektrické stimulace pro hojení měkkých tkání. Mezi těchto třináct studií patří studie potvrzující facilitační vliv elektrické stimulace na proliferaci, diferenciaci a maturaci svalových satelitních buněk a fibroblastů, dále studie popisující výsledný stav této podpořené aktivity zmíněných buněk: rychlejší obnova svalových vláken a jejich růst, lepší biomechanické vlastnosti šlach a rychlejší uzavírání kožní rány.

Za přínos mé bakalářské práce pokládám prezentování výzkumu léčivého a terapeutického potenciálu elektrické stimulace pro strukturální poranění měkkých tkání. Většina analyzované literatury popisuje efektivitu elektrické stimulace pro podporu regeneračních a reparačních dějů, což nabízí nové možnosti léčebného přístupu měkkých tkání. Je však potřebná realizace klinických studií na lidských subjektech pro definitivní potvrzení efektivity.

## 8 Seznam literatury

ABEDIN-DO, Atieh et al. Effect of Electrical Stimulation on Diabetic Human Skin Fibroblast Growth and the Secretion of Cytokines and Growth Factors Involved in Wound Healing. *Biology* [online]. 2021, 10, 641 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2079-7737. Dostupné z: doi: 10.3390/biology10070641.

ADAMS, Gregory, HADDAD, Firas a Kenneth BALDWIN. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. *Journal of applied physiology* [online]. 1999, 87, 1705-1712 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1522-1601. Dostupné z: doi: 10.1152/jappl.1999.87.5.1705.

AHMED, Amal, ELGAYED, Sherein a Ibrahim IBRAHIM. Polarity effect of microcurrent electrical stimulation on tendon healing: Biomechanical and histopathological studies. *Journal of Advanced Research* [online]. 2011, 3, 109-117 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 20901232. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jare.2011.05.004.

ALARCIN, Emine et al. Current Strategies for the Regeneration of Skeletal Muscle Tissue. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22, 1-30 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1422-0067. Dostupné z: doi: 10.3390/ijms22115929.

ALESSANDRINO, Francesco a Giuseppe BALCONI. Complications of muscle injuries. *Journal of Ultrasound* [online]. 2013, 16, 215-222 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1876-7931. Dostupné z: doi: 10.1007/s40477-013-0010-4.

ALFARO, Leslie et al. CD34 Promotes Satellite Cell Motility and Entry into Proliferation to Facilitate Efficient Skeletal Muscle Regeneration. *Stem cells* [online]. 2011, 29, 2030-2041 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1549-4918. Dostupné z: doi: 10.1002/stem.759.

BÁRTOVÁ, Jarmila. *Přehled patologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2015. 227 s. ISBN: 978-80-246-2745-8.

BENGTSSON, Katarina. Design of a galvanotaxic track for cells, using polymer electrodes. [Design of a galvanotaxic track for cells, using polymer electrodes] Linköping, 2011. 45 s. Diplomová práce (Msc). Linköping University, Department of Physics, Chemistry and Biology.

BERETTA, Daniel et al. Effects Of Electric Stimulation On The Healing Of Tendon Of The Gastrocnemius Muscle In Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Ciência Animal Brasileira* [online]. 2009, 10(3), 879-886 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1809-6891.

BIGLIARDI, Paul et al. Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *International Journal of Surgery* [online]. 2017, 44, 260-268 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1743-9159. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijssu.2017.06.073.

BOSUTTI, Alessandra et al. A “noisy” electrical stimulation protocol favors muscle regeneration in vitro through release of endogenous ATP. *Experimental Cell Research* [online]. 2019, 381, 121-128 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1090-2422. Dostupné z: doi: 10.1016/j.yexcr.2019.05.012.

BRABCOVÁ, Soňa. *Péče o rány*. 1. vyd. Praha: Grada, 2021. 184 s. ISBN: 978-80-271-3133-4.

BRAVO, Mariana et al. Microcurrent stimulates cell proliferation and modulates cytokine release in fibroblast cells. *Journal of Wound Care* [online]. 2021, 30, 151-159 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 0969-0700. Dostupné z: doi: 10.12968/jowc.2021.30.Sup9a.III.

BURNS, Patricia, ROHRICH, Rod a Kevin CHUNG. The Levels of Evidence and Their Role in Evidence-Based Medicine. *Plastic and reconstructive surgery* [online]. 2011, 128, 305-310 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1529-4242. Dostupné z: doi: 10.1097/PRS.0b013e318219c171.

CASAGRANDE, Sharbo et al. Histological evaluation of the effect of low-frequency electric stimulation on healing Achilles tendons in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* [online]. 2021, 36(1) [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1678-2674. Dostupné z: doi: 10.1590/acb360103.

CORTESE, Barbara et al. Influence of electrotaxis on cell behaviour. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* [online]. 2014, 6, 817-830 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1757-9694. Dostupné z: doi: 10.1039/c4ib00142g.

COSTA-ALMEIDA, Raquel et al. Tendon Stem Cell Niche. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine* [online]. 2015, 221-244 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2196-8993. Dostupné z: doi: 10.1007/978-3-319-21705-5\_10.

DEEPL. *DeepL* [online]. 2022 [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: <https://www.deepl.com>.

FERKO, Alexander et al. *Chirurgie v kostce*. 2. vyd. Praha: Grada, 2015. 512 s. ISBN: 978-80-247-1005-1.

FOLKER, Eric a Mary BAYLIES. Nuclear Positioning in Muscle Development and Disease. *Frontiers in physiology* [online]. 2013, 4, 363 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1664-042X. Dostupné z: doi: 10.3389/fphys.2013.00363.

FRIGO, Lucio et al. Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. *Photomed Laser Surg* [online]. 2010, 28, 151-156 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1557-8550. Dostupné z: doi: 10.1089/pho.2008.2475.

FUJIYA, Hiroto et al. Microcurrent electrical neuromuscular stimulation facilitates regeneration of injured skeletal muscle in mice. *Journal of sports science & medicine* [online]. 2015, 14(2), 297–303 [cit. 2022-04-04]. ISSN 1303-2968. Dostupné z: doi: 10.17264/stmarieng.6.159.

GÜRGEN, Seren G. et al. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) Accelerates Cutaneous Wound Healing and Inhibits Pro-inflammatory Cytokines. *Inflammation* [online]. 2013, 37 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 0360-3997. Dostupné z: doi: 10.1007/s10753-013-9796-7.

HENLE, Philipp et al. Dynamic Intraligamentary Stabilization (DIS) for treatment of acute anterior cruciate ligament ruptures: Case series experience of the first three years. *BMC musculoskeletal disorders* [online]. 2015, 16, 484 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1471-2474. Dostupné z: doi: 10.1186/s12891-015-0484-7.

HILL, Maria, WERNIK, A. a Geoffrey GOLDSPINK. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *Journal of Anatomy* [online]. 2003, 203(1), 89-99 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1469-7580. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.00195.x.

CHAN, Helen, FUNG, Dicky a Ng GABRIEL. Effects of Low-Voltage Microamperage Stimulation on Tendon Healing in Rats. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy* [online]. 2007, 37(7), 399-403 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1938-1344. Dostupné z: doi: 10.2519/jospt.2007.2412.

CHAO, Pen-hsiu G. et al. Effects of Applied DC Electric Field on Ligament Fibroblast Migration and Wound Healing. *Connective tissue research* [online]. 2007, 48, 188-197 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1607-8438. Dostupné z: doi: 10.1080/03008200701424451.

CHERNG, Shen, YOUNG, Jenny a Hongbao, MA. Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). *The Journal of American Science* [online]. 2008, 4(4), 7-9 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1545-1003.

CHOLOK, David et al. Traumatic Muscle Fibrosis: From Pathway to Prevention. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery* [online]. 2017, 82(1), 174-184 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2163-0763. 10.1097/TA.0000000000001290.

IBRAHIM, David et al. Classifications In Brief: The Tscherné Classification of Soft Tissue Injury. *Clinical Orthopaedics and Related Research* [online]. 2016, 475, 560-564 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1528-1132. Dostupné z: doi: 10.1007/s11999-016-4980-3.

JANURA, Miroslav. *Úvod do biomechaniky pohybového systému člověka*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. 84 s. ISBN: 80-244-0644-6.

JAKOBSEN, Rithamer Jens a MICHAEL Krogsgaard. The Myotendinous Junction—A Vulnerable Companion in Sports. A Narrative Review. *Frontiers in Physiology* [online]. 2021, 12, 1-13 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1664-042X. Dostupné z: doi: 10.3389/fphys.2021.635561.

JÄRVINEN, Tero et al. Muscle strain injuries. *Current opinion in rheumatology* [online]. 2000, 12, 155-61 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1531-6963. Dostupné z: doi:10.1097/00002281-200003000-00010.

KENDALL, Tim. *Wound healing – regeneration and scarring* [online]. University of Edinburgh, 2018 [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: <https://1url.cz/WrLJs>.

KOLÁŘ, Pavel et al. *Rehabilitace v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010. 713 s. ISBN: 9788072626571.

KREHER, Jeffrey a Jennifer SCHWARTZ. Overtraining Syndrome: A Practical Guide. *Sports health* [online]. 2012, 4, 128-138 [cit. 2022-04-04]. ISSN:1941-0921. Dostupné z: doi 10.1177/1941738111434406.

KUWADA, G. Classification of tendo Achilles rupture with consideration of surgical repair techniques. *The Journal of foot surgery* [online]. 1990, 29, 361-365 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 0449-2544. Dostupné z: PMID: 2229913.

LAUMONIER, Thomas a Jacques MENETREY. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *Journal of Experimental Orthopaedics* [online]. 2016, 3, 1-9 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2197-1153. Dostupné z: doi: 10.1186/s40634-016-0051-7.

LEPPER, Christoph, PARTRIDGE, Terry a Chen-Ming FAN. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* [online]. 2011, 138, 3639-3646 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1477-9129. Dostupné z: doi: 10.1242/dev.067595.

MAGRO, Gaetano et al. Practical approach to diagnosis of bland-looking spindle cell lesions of the breast. *Pathologica* [online]. 2019, 111, 344-360 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1591-951X. Dostupné z: doi: 10.32074/1591-951X-31-19.

MARSHALL, Clement et al. Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions. *Advances in Wound Care* [online]. 2016, 7, 29-45 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2162-1934. Dostupné z: doi: 10.1089/wound.2016.0696.

MESCHER, Anthony L. *Junqueirovy základy histologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2018. 558 s. ISBN: 978-80-7492-324-1.

MUELLER-WOHLFAHRT, Hans-Wilhelm et al. Terminology and classification of muscle injuries in sport: The Munich consensus statement. *British journal of sports medicine* [online]. 2012, 47, 342-350 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1473-0480. Dostupné z: doi: 10.1136/bjsports-2012-091448.



NAVRÁTIL, Leoš. *Fyzikální léčebné metody pro praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2019. 200 s. ISBN: 978-80-271-1098-8.

NICHOLS, Anne, BEST, Katherine a Alayna LOISELLE. The Cellular Basis of Fibrotic Tendon Healing: Challenges and Opportunities. *Translational Research* [online]. 2019, 209, 156-168 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1878-1810. Dostupné z: doi: 10.1016/j.trsl.2019.02.002.

O'BRIEN, Timothy a Frank BARRY. Stem Cell Therapy and Regenerative Medicine. *Mayo Clinic proceedings* [online]. 2009, 84, 859-61 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1942-5546. Dostupné z: doi: 10.1016/S0025-6196(11)60501-6.

OLIVA, Francesco et al. Surgical repair of muscle laceration: biomechanical properties at 6 years follow-up. *Muscle Ligaments and Tendons Journal* [online]. 2013, 3(4), 313-317 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2240-4554. Dostupné z: doi: 10.11138/mltj/2013.3.4.313.

PARK, Seung-Hwan et al. Treatment of Acute Achilles Tendon Rupture. *Clinics in Orthopedic Surgery* [online]. 2020, 12, 1-8 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2005-4408. Dostupné z: doi: 10.4055/cios.2020.12.1.1.

PATRULEA, Viorica et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2015, 97, 417-426 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1873-3441. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ejpb.2015.08.004.

PODĚBRADSKÝ, Jiří a Radana PODĚBRADSKÁ. *Fyzikální terapie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 218 s. ISBN: 978-80-247-2899-5.

POLAK, Anna, FRANEK, Andrzej a Jakub TARADAJ. High-Voltage Pulsed Current Electrical Stimulation in Wound Treatment. *Advances in wound care* [online]. 2014, 3, 104-117 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2162-1934. Dostupné z: doi: 10.1089/wound.2013.0445.

R&D SYSTEMS. Muscle Stem Cell Markers. *R&D Systems* [online]. 2022 [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: <https://1url.cz/EkyXS>.

RAMPAZO, Érika P. et al. High voltage pulsed current in collagen realignment, synthesis, and angiogenesis after Achilles tendon partial rupture. *Brazilian Journal of Physical Therapy* [online]. 2016, 20(4), 309-312 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1809-9246. Dostupné z: doi: 10.1590/bjpt-rbf.2014.0167.

REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA. Polarizace dvojlomem. *Encyklopedie Fyziky* [online]. 2022 [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: <https://1url.cz/hKybU>.

RIPPA, Alexandra, KALABUSHEVA, Ekaterina a Ekaterina VOROTELYAK. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*. 2019, 8, 607 [cit. 2021-04-04]. ISSN: 2073-4409. Dostupné z: doi: 10.3390/cells8060607.

ROBERTSON, Val et al. *Electrotherapy Explained: Principles and Practice*. 4. vyd. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2006. 568 s. ISBN: 978-0750688437.

RYCHLÍKOVÁ, Eva. *Manuální medicína*. 3. vyd. Praha: Maxdorf, 2004. 530 s. ISBN: 80-7345-010-0.

SALAMI, Ayodeji, IMOSEMI, Innocent a Olatunde OWOEYE. A Comparison of the Effect of Chlorhexidine, Tap Water and Normal Saline on Healing Wounds. *International Journal of Morphology* [online]. 2006, 24(4), 673-676 [cit. 2021-04-04]. ISSN: 0717-9502. Dostupné z: doi: 10.4067/S0717-95022006000500025.

SHAMROCK, Alan G. a Matthew VARACALLO. Achilles Tendon Rupture. *StatPearls* [online]. 2022 [cit. 2021-04-04]. OCLC: 1021256616. Dostupné z: doi: PMID: 28613594

SHARMA, Pankaj a Nicola MAFFULLI. Biology of tendon injury: Healing, modeling and remodeling. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* [online]. 2006, 6(2), 181-190 [cit. 2021-04-04]. ISSN: 1108-7161. Dostupné z: PMID: 16849830.

STOLL, Christiane et al. Healing parameters in a rabbit partial tendon defect following tenocyte/biomaterial implantation. *Biomaterials* [online]. 2011, 32, 4806-4815 [cit. 2021-04-04]. ISSN: 0142-9612. Dostupné z: doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.026.

TAKEO, Makoto, LEE, Wendy a Mayumi ITO. Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* [online]. 2015, 5 [cit. 2021-04-04]. ISSN: 2157-1422. Dostupné z: doi: 10.1101/cshperspect.a023267.

THOMOPOULOS, Stavros et al. Mechanisms of Tendon Injury and Repair. *Journal of Orthopaedic Research* [online]. 2012, 33, 832–839 [cit. 2021-04-04]. ISSN: 1554-527X. Dostupné z: doi: 10.1002/jor.22806.

VADLAMANI, Ram et al. Nanosecond pulsed electric field induced proliferation and differentiation of osteoblasts and myoblasts. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2019, 16 [cit. 2021-04-04]. ISSN: 1742-5662 Dostupné z: doi: 10.1098/rsif.2019.0079.

VOKURKA, Martin et al. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2012. 305 s. ISBN: 978-80-246-2032-9.

VYBÍRAL, Bohumil. *Mechanika pružného tělesa: Studijní text pro řešitele FO a ostatní zájemce o fyziku* [online]. [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: <https://1url.cz/BKyYn>.

WANG, Da-an, LI, Qing-Zheng a Dong-Ming JIA. Low-Frequency Electrical Stimulation Promotes Satellite Cell Activities to Facilitate Muscle Regeneration at an Early Phase in a Rat Model of Muscle Strain. *BioMed Research International* [online]. 2021, 1-8 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2314-6141. Dostupné z: doi: 10.1155/2021/4218086.

WANG, Zi-Ru a Guo-Xin NI. Is it time to put traditional cold therapy in rehabilitation of soft-tissue injuries out to pasture? *World Journal of Clinical Cases* [online]. 2021, 9, 4116-4122 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 2307-8960. Dostupné z: 10.12998/wjcc.v9.i17.4116.

WELLS, Linda, EDWARDS, Kevin A. a Sanford BERNSTEIN. Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *The EMBO journal* [online]. 1996, 15, 4454-4459 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 1460-2075. Dostupné z: doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00822.x.

YANG, Bicheng et al. Low Intensity Pulsed Ultrasound Influences the Myogenic Differentiation of Muscle Satellite Cells in a Stress Urinary Incontinence Rat Model. *Urology* [online]. 2018, 123 [cit. 2022-04-04]. ISSN: 0090-4295. Dostupné z: doi: 10.1016/j.urology.2018.09.020.

YOSHIDA, Atsuhiko et al. Regeneration of Injured Tibialis Anterior Muscle in Mice in Response to Microcurrent Electrical Neuromuscular Stimulation with or without Icing. *Journal of St. Marianna University* [online]. 2015, 6, 159-169 [cit. 2021-04-04]. ISSN: 2189-0277. Dostupné z: doi: 10.17264/stmarieng.6.159.

ZICKRI, Maha, B. Possible local stem cells activation by microcurrent application in experimentally injured soleus muscle. *International journal of stem cells* [online]. 2014, 7(2), 79–86 [cit. 2021-04-04]. ISSN 2005-5447. Dostupné z: doi: 10.15283/ijsc.2014.7.2.79.

## 9 Seznam zkratek

$\alpha$ -SMA – alpha smooth muscle actin

ACL – anterior cruciate ligament

ANOVA – analysis of variance

ATP – adenosin trifosfát

CSA – cross-section area

CTX – cardiotoxin

CV – cell viability

DHSF – diabetic human skin fibroblast

ES – elektrická stimulace

EMGstim – electromyographic stimulation

H&E – hematoxylin-eosin

HVPC – high-voltage pulsed current

IL – interleukin

LDH – lactate dehydrogenase

LFES – low-frequency electrical stimulation

LVMAS – low-voltage microamperage stimulation

MES – microcurrent electrical stimulation

MENS – microcurrent electrical neuromuscular stimulation

MRI – magnetic resonance imaging

NsPEF – nanosecond pulsed electric field

NSAID – Non-steroidal anti-inflammatory drugs

TENS – transkutánní elektrická neurostimulace

TES – transkutánní elektrická stimulace

TSC – tendon stem cells

## 10 Seznam obrázků

Obrázek 2.4.1: Fáze hojení svalových vláken.....	16
Obrázek 2.4.2: Centrální zóna.....	16
Obrázek 2.8.1: Klasifikace poranění ACL.....	24
Obrázek 3.2.1: PRISMA diagram.....	30
Obrázek 5.1.5.1: Výsledky velikosti populace myoblastů.....	51
Obrázek 5.1.6.1: EMGstim (a) a 1 Hz (b).....	53
Obrázek 5.2.3.1: Dvojlom.....	64
Obrázek 5.3.4.1: Galvanotaxní komora.....	79

## 11 Seznam tabulek

Tabulka 3.2.1: Výsledky po zadání vyhledávacích frází.....	29
Tabulka 4.1: Výsledky studií.....	32-34
Tabulka 5.1.1.1: Procentuální obsah poškozených svalových vláken.....	38
Tabulka 5.1.2.1: Expres proteinů MyoD a myogeninu 7 dní po poranění.....	41
Tabulka 5.1.2.2: Expres proteinů MyoD a myogeninu 14 dní po poranění.....	41
Tabulka 5.1.3.1: Výsledky měření obsahu atypických vláken, procentuálního obsahu $\alpha$ -SMA a procentuálního obsahu CD34.....	44
Tabulka 5.2.1.1: Výsledky naměřených vlastností šlach.....	58
Tabulka 5.2.2.1: Healing score experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden.....	60
Tabulka 5.2.2.2: Hustota kolagenu typu I experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden.....	61
Tabulka 5.2.2.3: Hustota kolagenu typu III experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden.....	61
Tabulka 5.2.2.4: Totální kolagen experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden.....	61
Tabulka 5.2.2.5: Maturitní index jizvy experimentální a kontrolní skupiny 2., 4., a 6. týden.....	62
Tabulka 5.2.3.1: Výsledky měřených indikátorů.....	64-65
Tabulka 5.3.1.1: Výsledky stupně hojení kožní rány.....	73
Tabulka 5.3.1.2: Hladiny pro-zánětlivých cytokinů skupin.....	73