

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra myslivosti a lesnické zoologie



**Fakulta lesnická
a dřevařská**

**Neinvazivní osteologická replikace preparátů
vybraných druhů nižších obratlovců na základě CT
digitalizace**

Bakalářská práce

Bc. Alena Schützmeisterová

Ing. Klára Matějka Košinová, Ph.D.

2024

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bc. Alena Schützmeisterová

Konzervace přírodnin a taxidermie

Název práce

Neinvasivní osteologická replikace preparátů vybraných druhů nižších obratlovců na základě CT digitalizace

Název anglicky

Non-invasive osteological replication of specimens of selected lower vertebrate species based on CT digitization

Cíle práce

1. Vytvoření repliky kostry obojživelníka či plaza na základě digitalizace preparátů provedené pomocí CT scanneru
2. Stanovení základní metodiky pro neinvasivní replikaci koster z preparátů dle digitalizace provedené CT scannerem
3. Digitalizace vybraných preparátů pro účely archivace

Metodika

Na základě získaných vzorků bude provedena digitalizace jednotlivých preparátů pomocí CT scanneru Siemens Somatom Scope. Rekonstrukce bude cílená na získání digitalizované kostry preparátu. Při digitalizaci budou použity vzorky různých druhů zakonzervovaných odlišným způsobem. Digitalizovaná kostra bude exportována do formátu STL, dále upravena v programu GOM Inspect a následně bude proveden tisk objektu prostřednictvím 3D tiskárny Stratasys F370.

Harmonogram zpracování

Literární rešerše bude průběžně konzultována s vedoucím práce a zpracována nejpozději do 31. srpna 2023. Do konce října 2023 bude provedeno snímání a měření čelistí a výsledky budou zaznamenány do MS Excel a předány vedoucímu práce. První rukopis bakalářské práce bude předložen ke kontrole vedoucímu práce nejpozději do 31. ledna 2024. Dokončená bakalářská práce bude po předchozích konzultacích s vedoucím práce odevzdána na studijní oddělení FLD v termínu a dle pokynů studijního oddělení.

Doporučený rozsah práce

35 stran

Klíčová slova

osteologie, nižší obratlovci, CT scanner, kostra, preparát

Doporučené zdroje informací

- Abou-Madi, N., Scriveri, P. V., Kollias, G. V., Hernandez-Divers, S. M. (2004). Diagnosis of skeletal injuries in Chelonians using computed tomography. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35(2), 226–231. doi:10.1638/03-024
- Ferda, J., Baxa, J.; Ferdová, E., Kreuzberg, B. (2010). CT s Duální Energii Záření: Zobrazení Muskuloskeletálního Systému. *Česká Radiol.* 64, 37–43.
- Gribel, B.F., Gribel, M.N., Frazão, D.C., McNamara, J.A., Manzi, F.R. (2011). Accuracy and Reliability of Craniometric Measurements on Lateral Cephalometry and 3D Measurements on CBCT Scans. *Angle Orthod.* 81, 28–37. <https://doi.org/10.2319/032210-166.1>.
- Gumpenberger, M., Henninger, W. (2001). The use of computed tomography in avian and reptile medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10(4), 174–180. doi:10.1053/saep.2001.24674
- Lowie, A., De Kegel, B., Wilkinson, M., Measey, J., O'Reilly, J.C., Kley, N.J. (2022) Regional differences in vertebral shape along the axial skeleton in caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Journal of Anatomy*, 241, 716–728. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.13682>
- Lynneruo, N., Hjalgrim, H., Nielsen, L. R., Gregersen, H., Thuesen, I. (1997). Non-invasive Archaeology of Skeletal Material by CT Scanning and Three-dimensional Reconstruction. *International Journal of Osteoarchaeology*, 7(1), 91–94. doi:10.1002/(sici)1099-1212(199701)7:1<91::aid-ia309>3.0.co;2-t
- Macaluso, L., Villa, A., Pitruzzella, G. (2020). Osteology of the Italian endemic spectacled salamanders, *Salamandrina* spp. (Amphibia, Urodela, Salamandridae): selected skeletal elements for palaeontological investigations. *Journal of Morphology*. 281: 1391–1410. <https://doi.org/10.1002/jmor.21254>
- Nyakatura, J. A., Allen, V. R., Lauströer, J., Andikfar, A., Danczak, M., Ullrich, H.-J., Fischer, M. S. (2015). A Three-Dimensional Skeletal Reconstruction of the Stem Amniote *Orobates pabsti* (Diadectidae): Analyses of Body Mass, Centre of Mass Position, and Joint Mobility. *PLOS ONE*, 10(9), e0137284. doi:10.1371/journal.pone.0137284
- Rieppel, O. (1993). Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). *Journal of Zoology*, 231(3), 487–509. doi:10.1111/j.1469-7998.1993.tb01933.x
- Sanchez, S., de Ploëg, G., Clément, G., & Ahlberg, P. E. (2010). A new tool for determining degrees of mineralization in fossil amphibian skeletons: The example of the Late Palaeozoic branchiosaurid *Apteaon* from the Autun Basin, France. *Comptes Rendus Palevol*, 9(6-7), 311–317. doi:10.1016/j.crpv.2010.07.004

Předběžný termín obhajoby
2023/24 LS – FLD

Vedoucí práce
Ing. Klára Košinová

Garantující pracoviště
Katedra myslivosti a lesnické zoologie

Konzultant
Ing. Jiří Synek, Ph.D.
Ing. Jiří Turek

Elektronicky schváleno dne 4. 5. 2023

doc. Ing. Vlastimil Hart, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 28. 7. 2023

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 14. 03. 2024

1906

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Neinvazivní osteologická replikace preparátů vybraných druhů nižších obratlovců na základě CT digitalizace vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila, a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědoma, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědoma, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych poděkovala především Ing. Kláře Matějce Košinové, Ph.D. za vedení této bakalářské práce. Dále děkuji Ing. Jiřímu Turkovi za odborné konzultaci v rámci radiologie. Též bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Synkovi, PhD. za pomoc s uchopením tématu. Dále si velmi vážím prof. RNDr. Oldřicha Sychry a prof. MVDr. Pavla Širokého za laskavé zapůjčení preparátů z univerzitních a soukromých sbírek. Stejné uznání si zaslouží RNDr. Jiří Moravec, CSc. za zapůjčení vzorků z depozitářů Národního muzea. V neposlední řadě si mé poděkování zaslouží mí brněnští přátelé za zpříjemnění cest pro exempláře a můj přítel David za podporu a pomoc při psaní práce i kuchařský um.

Neinvazivní osteologická replikace preparátů vybraných druhů nižších obratlovců na základě CT digitalizace

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením základní metodiky pro neinvazivní osteologickou replikaci nižších obratlovců, digitalizaci koster a vytvoření repliky vybraných preparátů. Snímané preparáty byly zástupci obojživelníků (ocasatí a žáby), ještěřů, hadů a želv staré 15-100 let. Pro digitalizaci bylo použito skenování exemplářů na multidetektorovém výpočetním tomografu. Nasnímaný materiál byl pomocí radiologického programu převeden do formátu .stl, tyto 3D modely byly v programu Gom Inspect finálně připraveny pro tisk replik na 3D tiskárně. Digitalizací byly získány kvalitní snímky jedinců skenovaných mimo skladovací nádobu, u jedinců ve skleněných nádobách byla kvalita o něco nižší. Tištěno bylo celkem 5 jedinců, kdy velmi dobře dopadla replikace chameleona a želv, méně uspokojivý byl pak výsledek u chřestýše a ropuchy. Digitalizovaný a replikovaný materiál může být užitečným nástrojem pro výuku, ale i výzkum například na poli evoluční biologie, ale i jiných oborů, a to zejména u druhů, které jsou obtížně dostupné.

Klíčová slova: osteologie, nižší obratlovcí, CT scanner, kostra, preparát

Non-invasive osteological replication of specimens of selected lower vertebrate species based on CT digitalization

Abstract

This bachelor thesis deals with the establishment of a basic methodology for non-invasive osteological replication of lower vertebrates, digitization of skeletons and the creation of replicas of selected specimens. The specimens taken were representatives of amphibians (tailed and frogs), lizards, snakes and turtles aged 15-100 years. Scanning of specimens on a multidetector computed tomograph was used for digitization. The scanned material was converted to .stl format using a radiology program, and these 3D models were finally prepared in Gom Inspect for printing replicas on a 3D printer. The digitization produced high quality images of the specimens scanned outside the storage container, while the quality of the specimens in glass containers was slightly lower. A total of 5 specimens were printed, with very good replication of chameleon and turtles, but less satisfactory results for rattlesnake and toad. The digitized and replicated material can be a useful tool for teaching, but also for research, for example in the field of evolutionary biology, but also in other disciplines, especially for species that are difficult to access.

Keywords: osteology, lower vertebrate, CT scanner, skeleton, mount

Obsah

1	Úvod	12
2	Cíl práce	13
3	Literární rešerše	14
3.1	Výpočetní tomografie – CT	14
3.1.1	DECT – dual energy CT.....	15
3.1.1.1	Analýza dat z DECT	15
3.1.2	Siemens Somatom Scope Power.....	16
3.1.3	Využití CT v medicíně plazů.....	16
3.1.4	Využití CT v archeologii.....	17
3.2	3D tisk	18
3.2.1	Historie	18
3.2.2	Základní metody tisku	19
3.2.2.1	FDM/FFF tiskárny	19
3.2.2.2	SLA tiskárny.....	19
3.2.2.3	SLS tiskárny	19
3.2.3	Základní tiskové materiály – FDM tisk.....	20
3.2.3.1	ASA	20
3.2.3.2	ABS.....	20
3.2.3.3	PLA.....	20
3.2.4	Tiskárna Stratasys F370	21
3.2.5	Pračka SCA3600 Oryx	22
3.3	Kapalinové preparáty	23
3.3.1	Fixační tekutiny	24
3.3.1.1	Ethanol	24
3.3.1.2	Formaldehyd.....	24
3.3.1.3	Další chemické látky	25
3.3.2	Postup fixace.....	25
3.4	Nižší obratlovci	28
3.4.1	Obojživelníci (<i>Amphibia</i>)	28
3.4.1.1	Ocasatí (<i>Caudata</i>).....	29
3.4.1.2	Žáby (<i>Anura</i>)	30
3.4.2	Plazi (<i>Reptilia</i>).....	30
3.4.2.1	Šupinatí (<i>Squamata</i>).....	32

3.4.2.2	Želvy (<i>Testudines</i>)	32
4	Metodika	33
4.1	Materiál.....	33
4.1.1	Preparáty	33
4.1.1.1	Depozitář Národního muzea	34
4.1.1.2	Veterinární univerzita Brno	35
4.1.1.3	Sbírka p. prof. Širokého	36
4.1.2	Přístroje.....	37
4.1.3	Ostatní použitý materiál	37
4.2	Metodický postup.....	37
4.2.1	Příprava.....	37
4.2.2	CT snímání.....	38
4.2.3	Extrakce snímků.....	39
4.2.4	3D tisk	39
4.2.4.1	Příprava	39
4.2.4.2	Tisk	40
4.2.4.3	Následné zpracování	40
4.2.5	Digitální modely	41
5	Výsledky	42
5.1	Replikace koster.....	42
5.2	Základní metodika neinvazivní replikace digitalizovaných koster.....	44
5.3	Digitalizace	45
5.3.1	Preparáty ve skleněných nádobách	45
5.3.2	Stáří jedince	46
5.3.3	Obojživelníci.....	47
5.3.4	Ještěři.....	50
5.3.5	Hadi	52
5.3.6	Želvy.....	53
6	Diskuse	55
7	Závěr	58
8	Literatura.....	60

Seznam použitých zkratk a symbolů

cm – centimetr

CT – výpočetní tomografie

DECT – CT s duální energií

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HU – Hounsfieldovy jednotky

kg – kilogram

kV – kilovolt

mm – milimetr

ms – milisekunda

NM – Národní muzeum

RTG – rentgenové záření

UV – ultrafialové záření

VETUNI – Veterinární univerzita Brno

2D – dvourozměrný

3D – trojrozměrný

1 Úvod

Osteologická rekonstrukce řady živočichů může být velmi komplikovaným, někdy až téměř nerealizovatelným úkolem. Zejména v případě ohrožených či již vyhubených druhů, jejichž exempláře či preparáty jsou, kvůli početnosti, téměř nedostupné či je nemožné do preparátu dále zasahovat, bez jeho destrukce.

Exempláře nižších obratlovců jsou nejčastěji konzervovány jako kapalínové preparáty v ethanolu nebo roztoku formaldehydu nejčastěji ve skleněných nádobách. Tyto preparáty jsou často extrémně náchylné na manipulaci, a to zejména kvůli uložení ve skleněných kyvetách a způsobu připevnění v nich. Málodky je možné staré preparáty z kyvet vyjmout, jelikož bývají zapečetěny měchuřinou, kterou bez poškození nelze z nádoby sejmout. U novějších preparátů je možné vzorky z tekutiny vyjmout, ale jakékoliv další invazivní postupy nejsou žádoucí.

Pomocí CT snímání by mělo být možné tyto exempláře nasnímat do takové míry, aby byla možná replikace jejich kostry. CT skenování funguje na principu rentgenového záření a pokročilých počítačových algoritmů. Následné zobrazení je možné díky rozdílné denzitě různých tkání, ze které počítač dopočítá obraz. Ve finálním zobrazení je pak každá rozdílná denzita zastoupena jiným odstínem šedé. CT snímá tkáň po 1-5 mm a z těchto řezů je počítač schopný dopočítat trojrozměrné modely. Pomocí CT skenování by tedy mělo být možné získat snímky použitelné pro replikaci kostry i z preparátů, do kterých nelze nijak invazivně zasahovat.

Při 3D tisku dochází k vytváření modelu pomocí vrstvení materiálu. Největší rozmach této technologie přišel v 80. letech 20. století, kdy byla patentována stereolitografie, dalším přelomem bylo v roce 2005 zpřístupnění zdrojových kódů projektu RepRap, což vedlo k rozšíření technologie mezi hobby uživatele. Nejpoužívanějším typem jsou FDM/FFF tiskárny, kdy je model stavěn vrstvením roztaveného materiálu na podložku.

Tento způsob rekonstrukce by mohl být přínosem v získávání osteologických replik druhů, které již byly vyhubeny nebo jsou z dalších důvodů dostupné jen v omezeném počtu případně není konvenční osteologická preparace možná či žádoucí.

2 Cíl práce

1. Vytvoření repliky kostry obojživelníka či plaza na základě digitalizace preparátů provedené pomocí CT scanneru
2. Stanovení základní metodiky pro neinvazivní replikaci koster z preparátů dle digitalizace provedené CT scannerem
3. Digitalizace vybraných preparátů pro účely archivace

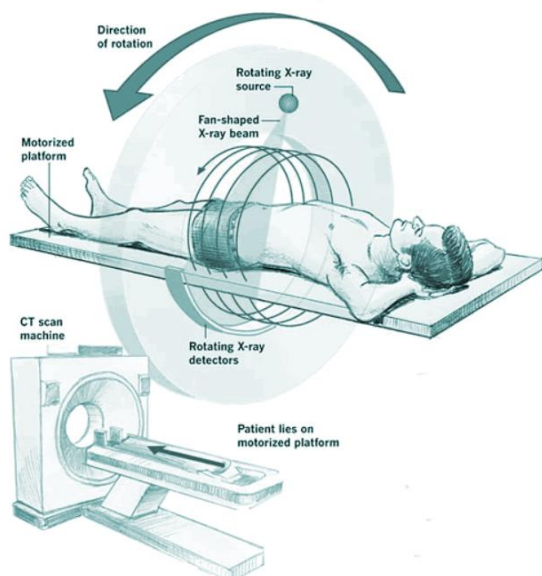
3 Literární rešerše

3.1 Výpočetní tomografie – CT

Výpočetní tomografie – computed tomography (dále CT) – je zobrazovací metoda, která funguje na principu rentgenového záření a pokročilých počítačových algoritmů (Kymplová 2008). První CT zařízení bylo představeno Godfreyem Hounsfieldem v roce 1972. V té době snímání jednoho průřezového obrazu trvalo 4-5 minut, nyní jedna otočka trvá méně, než vteřinu (Gumpenberger, Henninger 2001). Zobrazení je možné, díky rozdílným denzitám skenované tkáně. Skenovaný objekt je uložen na posuvném lehátku, které prochází skenovacím stojanem (gantrou), kde je na jedné straně umístěna rentgenka-vysílač rentgenového záření, a na druhé straně řada detektorů. U nejmodernějších přístrojů tvoří detektory úplný prstenec kolem pacienta a pohybuje se jen rentgenka, u starších se pohybují naproti sobě (Obrázek 1). Záblesk rentgenky trvá 1-4 ms, záření prostupuje objektem, kde je část záření absorbována, což závisí na denzitě materiálu/tkáně, detektory poté zachytí zbytek dopadajícího záření a pomocí počítačových algoritmů je dopočítán výsledný obraz (Kymplová 2008). Skeny bývají prováděny v příčné rovině a to po 1-5 mm, z těchto řezů je pak počítač schopen dopočítat 3D (trojrozměrné) modely (Gumpenberger, Henninger 2001).

Výpočetní tomografie je skvělá metoda pro zobrazení osifikovaných a kalcifikovaných tkání, a to díky vysokému absorpčnímu potenciálu vápníku, méně vhodná je pro zobrazení měkkých tkání (např. svaly, šlachy, vazy, chrupavky). Zvýšit zobrazitelnost těchto tkání je možné aplikací jodové kontrastní látky, avšak je to možné jen u tkání dobře prokrvených, jako jsou svaly a hypervaskularizované nádory (Ferda et al. 2010).

Výsledný obraz je poskládán z odstínů šedé, kdy každý odstín zastupuje rozdílnou denzitu. Odstíny šedé jsou počítány v Hounsfieldových jednotkách (HU), kdy voda je rovna 0 HU, vzduch -1000 HU a kosti 1000 HU (Gumpenberger, Henninger 2001).



Obrázek 1 Diagram CT snímání (Wardeh 2016)

3.1.1 DECT – dual energy CT

Při použití DECT – výpočetní tomografie s duální energií – jsou tkáně současně ozařovány dvěma zdroji RTG záření, které je detekováno dvěma soustavami detektorů. Jednotlivé zdroje mají rozdílné napětí na rentgenové trubici a to 140 kV a 80 kV, z těchto dvou sad dat je poté složen jeden obraz, dopočítaný počítačovým algoritmem do hodnoty běžně používané energie 120 kV a to v poměru 3:1 (140 kV:80 kV) (Ferda et al. 2010).

3.1.1.1 Analýza dat z DECT

Analýza dat probíhá ve speciálním softwaru, který používá různé algoritmy, na základě požadované analýzy. Vždy jsou k analýze použity dvě sady dat – vyšší a nižší energie záření. Existují dva základní typy algoritmů dvou a tří materiálový. Abychom oddělili prvky s vysokým atomovým číslem, je použit tří materiálový algoritmus se dvěma uzlovými body, který využívá charakteristik těchto tkání – tuk, měkké tkáně a kalcium/jód. Při chemické analýze měkkých tkání je použit dvou materiálový algoritmus s jedním uzlovým bodem. Pomocí této analýzy dojde ke kalkulaci map koncentrací analyzovaného materiálu (Ferda et al. 2010).

3.1.2 Siemens Somatom Scope Power

Tento přístroj byl sestaven pro použití v lidské medicíně. Záření je snímáno 16 řadami detektorů, které by díky použitému materiálu (Ultra Fast Ceramics) měly přinášet vysoce kvalitní obraz a vyfiltrovat velkou část šumu. Gantra je široká 70 cm a dá se naklonit až o 30° (SIEMENS MEDICAL SOLUTIONS USA, INC. ©2024).

3.1.3 Využití CT v medicíně plazů

Vyšetření plazů je limitováno schránkou či šupinami na povrchu těla, proto pro určení diagnózy bývají užívány zobrazovací metody jako radiografie, ultrasonografie, výpočetní tomografie nebo magnetická rezonance. Při využití CT na nižších obratlovcích dochází k výbornému zobrazení velikosti, tvaru, struktury a hustoty schránek a kosterní soustavy a jejich poškození či zranění, nejvýrazněji při skenování v sagitální rovině nebo sestavení 3D modelu. Také je možné využití pro skeny fosilií nebo zkamenělých vajec dinosaurů, což pomáhá zvýšit vědění o historii (Gumpenberger, Henninger 2001). Klinické projevy u plazů nebývají specifické, což znesnadňuje lokalizaci problému. Při použití klasického rentgenového vyšetření může být diagnóza stále nemožná, právě z důvodu kostěných tkání v schránkách živočichů (osteodermu, krunýř), ale i přítomnosti velké hmoty tuku okolo viscerálních orgánů. Také při 2D zobrazení nemusí být patrné některé zlomeniny, které se při použití CT prokáží. Výpočetní tomografie umožňuje detailnější zobrazení a lepší lokalizaci problému, což vede k přesnějším zacílení léčby a konkrétnějším prognózám (Mackey et al. 2008).

Například při vyšetření zranění u řádu želvy (*Testudines*) obyčejné rentgenové vyšetření nebývá úspěšné, jelikož kosterní systém je překryt kostěným krunýřem (srůstajícím s páteří), žaberními oblouky či pletencem pánevním a nemusí tedy dojít ke správné projekci a diagnóze poškození kostí ale i dalších vnitřních struktur. Je však důležité tyto snímky vždy porovnat i s 2D snímáním, aby nebylo nic přehlédnuto (například zlomený obratel, může být viditelný jen při 2D zobrazení). Pro tato vyšetření nebývají zvířata sedována nebo uváděna do celkové anestezie, bývá postačující jim zakrýt oči, případně zafixovat končetiny páskou k podkladu (Abou-Madi et al. 2004).

Výpočetní tomografie je také používána pro zjištění počtu a stáří vajec v samici, kdy pomocí radiografie a ultrazvuku dojde často jen k potvrzení přítomnosti bez dalších informací. Používáno je i pro diagnózu poruch v dýchací soustavě (Mackey et al. 2008). Zobrazovací metody jsou využívány i pro determinaci pohlaví u plazů (Di Ianni et al. 2015).

3.1.4 Využití CT v archeologii

Při skenování fosilií je jedním z velkých cílů výzkum ontogenetického vývoje jedinců vedoucí k většímu poznání o evoluci, kdy informace získané jen z dospělých jedinců nám toto poznání neposkytují. Stupeň osifikace tkáně lze rozpoznat díky rozdílným denzitám zmineralizovaných kostí oproti denzitě zvápenaté chrupavky. Lze skenovat i živočichy, kteří jsou stále uvězněni v kameni, a pomocí srovnání s dalšími technikami (histologie, skeletochronologie) můžeme zjistit přibližný vývoj a podmínky života daného jedince (Sanchez et al. 2010).

V jiné studii dánští vědci, využili CT skenování a stereolitografii (druh 3D modelace) pro rekonstrukci zhruba 7000 let staré kostry. Kosti, které byly poměrně roztržštěné, byly ponechány v kostce zeminy, pro transport dále obalené v sádře a vlně a takto v celku přesunuté do nemocnice, kde byly podrobeny CT skenování. Následné zpracování jednotlivých řezů bylo základem pro model, který byl poté zhotoven pomocí vytvrzování polymerové pryskyřice laserovými paprsky (Lynnerup et al. 1997).

Kombinace CT s 3D tiskem využili i němečtí archeologové, kdy došlo k nasnímání bloku sprašové hlíny. V tomto bloku byly nalezeny části štítu, u něhož bylo možné určit stáří a další detaily, před vyjmutím z bloku, které je náročné. Naskenované snímky pak byly upraveny a domodelovány pro 3D tisk a vytisknuty. Díky tomuto postupu bylo možné objekt dále zkoumat, bez dalšího poškození materiálu (Frohwerk et al. 2023).

3.2 3D tisk

3D tisk je aditivní způsob výroby 3D objektů – ty jsou tedy vytvářeny vrstvením materiálu, nikoliv jeho odebíráním z bloku materiálu (Savini A., Savini G. G. 2015).

3.2.1 Historie

Největšího rozvoje této technologie bylo dosaženo v 80. letech, kdy probíhalo mnoho pokusů a byly vymyšleny různé druhy 3D tisku. V roce 1980 chtěl japonský doktor Hideo Kodama patentovat první metodu vytvrzování materiálu jedno paprskovým laserem, nicméně kvůli nedostatku financí tento patent nakonec nebyl uznán (Sculpteo 2017).

V roce 1984 Charles Hull vytvořil pomocí stereolitografie kalíšek o výšce 5 cm, výroba takto malého objektu v té době trvala řádově měsíce (Savini A., Savini G. G. 2015).

Mezi lety 1984 a 1986 pracovali na dalších pokusech 3 francouzští vědci, kdy monomer byl vytvrzován na polymer v místě, kde se protnul paprsky dvou laserů a vyrobili tak první prototyp „3D tiskárny“, první vytvořený objekt bylo točité schodiště. Na tento postup (stereolitografie) získali patent v lednu 1986. Kvůli tomu, že je nikdo nebral vážně, však neměli finance na to ve výzkumu pokračovat a museli se projektu vzdát (Sculpteo 2017).

V roce 2005 Adrian Bowyer založil projekt RepRap a zpřístupnil k němu všechny zdrojové kódy, díky tomu došlo k velkému rozšíření mezi hobby nadšence a dalšímu rozvoji celé technologie 3D tisku. Nejrozšířenější technologie 3D tisku je FDM/FFF, kdy je model stavěn z vrstev roztaveného plastu – filamentu. Nevýhodou může být, že na vytištěném modelu, pokud není po tisku díle upravován, jsou vidět jednotlivé vrstvy nanášení materiálu. Tiskárnu FDM/FFF typu je možné pořídit od asi 3 000 Kč až po miliony za tiskárny profesionální (Stříteský et al. 2019).

3.2.2 Základní metody tisku

3.2.2.1 FDM/FFF tiskárny

Tento typ tiskáren dále rozlišujeme podle pohybu extruderu prostorem na kartézskou (pohyb po lineárních osách), delta (extruder je zavěšen na 3 ramenech) a polar (extruder na 2 ramenech + pohyblivá podložka) (Stříteský et al. 2019).

Tiskárny se skládají z těchto komponent: extruder (tisková hlava, nanáší tiskové vrstvy), vyhřívaná podložka, rám nosné konstrukce, motory a řídicí jednotka (Stříteský et al. 2019).

Čas výroby je delší než například u SLA metody. Funguje natavováním materiálu, který je vytlačován tryskou a nanášen na tiskovou podložku (Fakulta strojní ČVUT Praha (b)).

Mezi FDM tiskárny patří i tiskárna Stratarys F370.

3.2.2.2 SLA tiskárny

SLA – stereolitografie – je nejstarší metoda 3D tisku. Běžná tloušťka vrstvy je 0,05-0,25 mm. Tisková hlava se pohybuje přes tiskovou plochu, na které je nanášena fotopolymerová pryskyřice, a ozařuje ji na určených místech, po dokončení vrstvy se podložka posune o úroveň níže a postup se opakuje. Jsou používány akrylátové, epoxidové nebo plněné pryskyřice (Fakulta strojní ČVUT Praha (a)).

3.2.2.3 SLS tiskárny

Polymer je do tiskárny vložen v podobě prášku, tento prášek je následně spékán pomocí laseru. Nejběžnějším materiálem je nylon, dále elastomery, polystyren a další polyamidy. Tento typ tisku je často využíván pro prototypování dílů (Fakulta strojní ČVUT Praha c)).

3.2.3 Základní tiskové materiály – FDM tisk

3.2.3.1 ASA

ASA (acrylic styrene acrylonitrile) je materiál, který je poměrně UV a teplotně (do 93 °C) odolný. Je rozpustný v acetonu. Při tisku je doporučována teplota trysky 260 °C a podložky 105-110 °C. I přes své nevýhody silného kroucení a uvolňování jedovatého styrenu při tisku je považován za nástupce ABS filamentů (© Prusa Research a.s.)

3.2.3.2 ABS

ABS (acrylonitrile butadiene styrene) má jakožto předchůdce ASA materiálu, podobné vlastnosti. Oproti ASA dochází k výraznějšímu kroucení, větší koncentraci jedovatých výparů při tisku a také je méně odolný proti UV záření. Teplota trysky by měla být 255 °C a podložka 80-110 °C podle velikosti tištěného objektu (© Prusa Research a.s.)

3.2.3.3 PLA

PLA (polylactic acid) je oblíbeným materiálem začátečníků zejména pro tisky, které nevyžadují vysokou odolnost výtisku. Jedná se o rostlinný polyester, který je odbouratelný v průmyslových kompostárnách. Tryska by měla dosahovat teploty 210-215 °C, podložka nemusí být vyhřívána (© Prusa Research a.s.).

3.2.4 Tiskárna Stratasys F370

Velikost prostoru pro tisk je 355 x 254 x 355 mm, celková velikost přístroje je 162,6 x 86,4 x 71,1 cm a váží 227 kg. Filamenty, které je možné použít jsou: ABS-M30, ASA, PC-ABS, PLA a FDM TPU 92A. Tisk probíhá s přesností na +/- 0,2 mm nebo 0,002 mm/mm (Stratarys 2016).

Tiskárna Stratarys F370 (Obrázek 2) používá 3 typy software. První z nich je Insight, který slouží pro přípravu souborů STL, software automaticky stanoví řezy a vygeneruje pomocné struktury i cesty vytlačování materiálu. Takto vygenerovaná data je možné prohlédnout a případně upravit podle vlastních specifických potřeb. Dalším typem je Control center, který slouží pro komunikaci uživatele s tiskárnou, řízení práce a její monitoring. Posledním typem je GrabCAD Print, ten slouží k zjednodušení a zrychlení práce – organizuje fronty tisku, stav materiálu i práce (Stratarys 2016).



Obrázek 2 Univerzitní tiskárna Stratarys F370 (Fakulta lesnická a dřevařská 2022).

3.2.5 Pračka SCA3600 Oryx

Pračka SCA3600 Oryx (Obrázek 3) je průmyslovým prostředkem k odstranění podpůrných materiálů použitých při 3D tisku. Pro toto praní je kompatibilní jak s vodou, tak různými žíravými roztoky. Před spuštěním je možné si navolit žádanou teplotu a dobu mytí, které probíhá v nádrži z nerezové oceli. Rozměry této vymývací nádrže jsou 40,6 x 40,6 x 35,6 cm. Možné teplotní programy dosahují 50, 60, 70 a 85 °C (Oryx Additive, Inc.).



Obrázek 3 Pračka SCA3600 Oryx (Fakulta lesnická a dřevařská 2022).

3.3 Kapalinové preparáty

Při fixaci biologického materiálu je účelem denaturace bílkovin, což zabraňuje autolýze a napadení mikroorganismy a houbami (Brachtl 2015).

Tento typ konzervace organického materiálu byl hojně užíván od poloviny 19. století, lze tak zachovávat organické vzorky od botanických exemplářů, přes houby a bezobratlé až po menší obratlovce. Postup fixace v ideální fixační tekutině umožňuje zachování anatomie a morfologie vzorku. Nepříznivým efektem naopak může být ztráta původní barvy, často nefyziologická poloha nebo vysychání a náchylnost na manipulaci a skladovací podmínky. Metoda není vhodná pro preparaci velkých exemplářů, kvůli obtížné manipulaci s preparátem, ale i vysoké náročnosti samotné fixace (Mourek, Lišková 2010).

K vyblednutí barev dochází zejména při použití nevhodného fixačního roztoku nebo rozpadu pigmentů při častém a dlouhodobém vystavení preparátu dennímu světlu (Altmann 1966).

Fixace kapalinového preparátu (Obrázek 4) probíhá zpravidla ponořením exempláře na 48 hodin do 4% roztoku formalínu a poté vzestupnou alkoholovou řadou, která slouží pro dehydrataci. Pro nástřik dutin bývá pak používán 10% formalín či 70% ethanol. V současnosti se pak upouští od užívání formaldehydu z důvodu toxicity a celý proces je prováděn za použití pouze ethanolu (Frišhons et al. 2017).

Konzervace by měla začít co nejdříve po smrti živočicha (ideálně ihned). Jelikož plazí povrch těla je velmi málo prostupný, je vždy nutné fixační tekutinu injektovat do břišní dutiny, a to nezávisle na velikosti jedince. Vhodné je fixační tekutinu vpravit i do svalů končetin a ocasu (Gotte et al. 2016). Při pouhém ponoření exempláře do fixační tekutiny by objem této tekutiny měl být 10-100x vyšší než objem fixované tkáně a v rámci několika hodin či dní by měl být alespoň 1x vyměněn (Brachtl 2015).



Obrázek 4 Lihový preparát – Národní muzeum (foto autor)

3.3.1 Fixační tekutiny

3.3.1.1 Ethanol

Etanol je druhý nejnížší alkohol se vzorcem $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, je to bezbarvá tekutina s ostrým charakteristickým zápachem a štiplavou chutí. Je často využíván jako antiseptický prostředek nebo polární rozpouštědlo. Pro nervovou soustavu je toxický a může působit teratogenně (PubChem 2023a).

Fixace ethanolem je částečně reverzibilní pomocí opětovné rehydratace, proto pokud koncentrace ethanolu v preparátu příliš klesne může docházet k hnití vzorků (Gotte et al. 2016).

3.3.1.2 Formaldehyd

Je nejjednodušším aldehydem se vzorcem CH_2O , bezbarvý, štiplavě páchnoucí nebezpečný plyn. Akutně způsobuje podráždění, je potvrzeným karcinogenem a je možné i poškození plodu. Je používán při výrobě hnojiv, překližky, lepidla, jako konzervační látka pro potraviny (v Evropské unii je použití v potravinách zakázáno), má

antiseptické účinky, lze ho najít v kosmetice a medicíně, jeho vodný roztok (formalín) se používá pro konzervaci biologických materiálů (PubChem 2023b).

Při smíchání 10% formalínu s vhodnými pufrů je získán roztok s pH přijatelnějším pro fixaci materiálu – při příliš vysoké hladině pH dochází k zprůhlednění vzorků, při příliš nízkém k dekalifikaci (Gotte et al. 2016). Optimální hladina je okolo 6,8-7,2, při výrazně rozdílném pH dochází k rozpadu některých buněčných struktur (Brachtl 2015).

Fixace formaldehydem probíhá pomocí jeho navázání na aminoskupiny proteinů. Mimo bílkoviny reaguje v tkáni i s lipidy (Brachtl 2015). Preparáty, fixované formaldehydem, jsou velmi křehké, kvůli vytvrzení bílkovin, což lze omezit přidáním glycerinu (na 3 díly formalínu 1 díl glycerinu) (Altmann 1966).

Formaldehyd není vhodný pro fixaci tkání, které obsahují CaCO_3 (kostra, vápenité schránky, krunýř raka...), jelikož formaldehyd se za působení UV záření mění na kyselinu mravenčí, která tyto tkáně narušuje. Tento problém lze ovšem omezit přidáním špetky sody na každý litr fixační tekutiny (Altmann 1966).

3.3.1.3 Další chemické látky

Pro zachování barev lze použít roztok složený z octanu draselného, dusičnanu draselného, formaldehydu a vody (Frišhons et al. 2017).

Pro zvýraznění cévní soustavy nebo dalších dutých prostor byly používány směsi vosku s kanadským balzámem, rumělkou, fermeží nebo šelak s berlínskou modří, rumělkou, karmínem nebo směsí želatiny s barvivem. V současnosti jsou používány průmyslově vyráběné barvené latexy a pryskyřice (Frišhons et al. 2017).

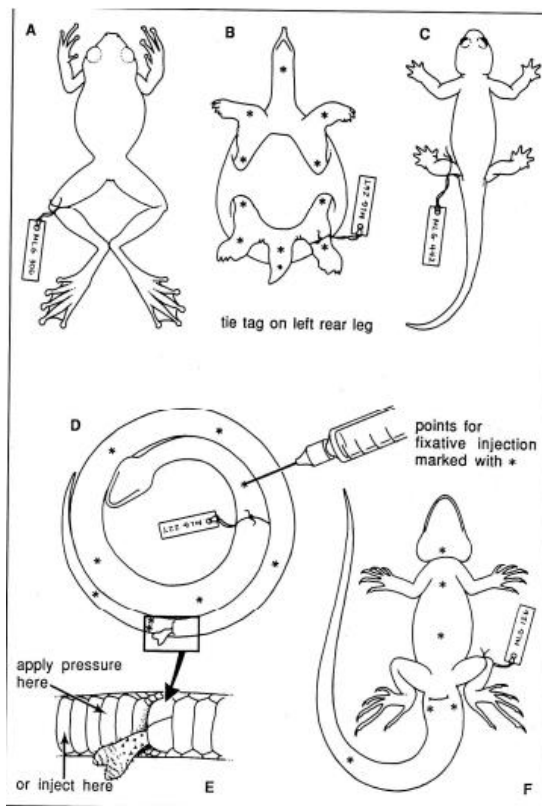
3.3.2 Postup fixace

Lihové preparáty jsou vhodnější u vzorků, které obsahují více vaziva, formaldehyd je žádoucí při vyšším obsahu vody. Při dlouhodobém uložení v ethanolu dochází k rozpadu lipidů, u formaldehydu se rozkládá DNA (Frišhons et al. 2017).

Štěpánek (1938, s. 34-35) popisuje preparaci obojživelníků ve formalínu takto: *„Po usmrcení je nutno u všech obojživelníků ostrým nožem naříznouti břicho (nikoliv jen kůži na břiše!) krátkým, ale hlubokým řezem, aby fixační tekutina pronikla do*

vnitřností. Jako fixáže užíváme dvou tekutin a sice formalinu, nebo alkoholu. Formalinu užíváme obvykle ve zředění 5-8 %. V této tekutině uchovají se materiály obojživelníků dosti vláčné a měkké části pokožky důležité při determinaci se nezdeformují. Bohužel však barvy, příkl. Zelená, zmizí obvykle nadobro a ustoupí během několika minut jednotvárnému šedavému nádechu. Krom toho materiál formalinový musíme úzkostlivě chrániti před slunečním světlem, neboť by nám během několika měsíců vybledl. “

K preparaci alkoholové Štěpánek (1938, s. 35) pak říká toto: „Dává lepší výsledky jak co se týče zachování barev, tak také pro práci s materiálem je daleko příjemnější. Při lihové fixáži musíme však postupovati velmi opatrně, neboť silnější alkohol vytáhne z těla zvířat rychle a násilně obsaženou vodu, čímž se materiál zdeformuje. Proto po usmrčení vložíme žáby nebo čolky do slabého maximálně 50% alkoholu a za jeden až tři dny teprve převedeme do alkoholu 70%. Tím zachováme přirozený měkký tvar těla obojživelníků a barvy jsou daleko věrnější než ve formalínu. “ Tyto postupy platí dodnes, pouze od použití formalínu je upouštěno kvůli karcinogenním účinkům a je preferována preparace ethanolem.



Obrázek 5 Návod pro fixaci ethanolem nebo formaldehydem (Khan 1996).

Obojživelníky vytvrdíme navlhčením na 6-12 hodin v 10% formalínu. U plazů je nutné kvůli nepropustnosti pokožky injektovat formalín do tělních dutin, případně pokožku naříznout na několika místech pro umožnění prostupu tekutin do těla (Obrázek 5). Poté se nechají vytvrdit na 6-24 hodin. Po vytvrzení jsou exempláře vloženy do skleněných nádob naplněných fixační tekutinou a uzavřeny tak, aby docházelo k co nejmenšímu odpařování (případně je nutné tekutinu doplňovat) (Khan 1996).

3.4 Nižší obratlovci

Taxonomické zařazení

- Říše – živočichové (*Animalia*)
- Kmen – strunatci (*Chordata*)
- Podkmen – obratlovci (*Vertebrata*)

Mezi obratlovce je řazeno zhruba 58 000 druhů živočichů, ze kterých přibližně polovina patří mezi ryby, druhá polovina pak mezi čtvernožce. Obratlovci jsou pohybliví živočichové, u kterých došlo k vývoji lebky a páteře, jež chrání centrální nervovou soustavu. Obojživelníci (*Amphibia*) patří do kladu *Lissamphibia*, blanatí (*Amnionta*) pak zahrnují čtvernožce včetně plazů (Hedges, Kumar 2009).

3.4.1 Obojživelníci (*Amphibia*)

Obojživelníci jsou monofyletická skupina se třemi řády – červoři (*Gymnophiona*), ocasatí (*Caudata*) a žáby (*Anura*) a jsou jakýmsi přechodem mezi primárně vodními a suchozemskými čelistnatci (Gaisler, Zima 2007). Většina druhů obojživelníků již dávno vymřela a do současnosti přežívá jen malá část původně se vyskytujících druhů. Počet recentních zástupců je zhruba 6 300 druhů, které se vyskytují na všech kontinentech kromě Antarktidy (Schoch 2014).

Vývoj vajec probíhá pouze v prostředí zabraňujícím jejich vyschnutí, jelikož zárodky nejsou chráněny zárodečnými obaly (Gaisler, Zima 2007). Obojživelníci kladou průhledná, slizem pokrytá, vejce do vody. Vyvíjející se embryo čerpá kyslík a většinu živin z okolního prostředí a do prostředí vypuzuje odpadní látky (Sues 2019). Larvy dýchají pomocí vnějších keříčkovitých žaber a v počátku vývoje nemají končetiny, ty postupně dorůstají a u žab zakrňuje ocas (Verhoef 2001).

Výskyt je vázán na vodu kvůli propustnosti pokožky, pomocí které přijímají i vodu. Na pokožce je mnoho slizových žláz, které pomáhají udržovat pokožku vlhkou, jedové žlázy a chromatofory (Papáček et al. 2000). K životu obojživelníků je nutná sladká voda, pouze pár druhů je schopno snášet vodu brakickou, ve slané nežijí nikdy (Gaisler, Zima 2007).

Většina dospělců dýchá plicemi a část plynů je vyměňována i přes pokožku (Gaisler, Zima 2007; Verhoef 2001). Ontogeneze vždy zahrnuje stadium akvatické larvy, která k dýchání používá keříčkovité žábry (Schoch 2014). Jelikož chybí uzavřený hrudní koš, k nadechování dochází hlavně pumpováním v ústní dutině, výdech je pasivní (Gaisler, Zima 2007)

Mezi apomorfní znaky patří: redukce počtu prstů na přední končetině na 4, alveolární slizové a jedové žlázy, zploštění lebky a ztráta některých jejích elementů (např. krycí kosti kožního původu), absence parietálního otvoru, bikuspidní zuby, bikondylní lebka, absence hrudního koše, střední ucho, oční víčka a slzný kanálek (Gaisler, Zima 2007; Papáček et al. 2000).

Končetiny mají stejnou stavbu jako u jiných čtvernožců, najdeme zde lopatkové a pánevní pásmo, na která jsou připojeny volné končetiny, u červorů kostra končetin chybí. Obojživelníci mají na zadních končetinách 5 prstů, na předních je počet redukován na 4 (Gaisler, Zima 2007). Žebra se plně vyvíjejí jen u ocasatých, u žab dochází k vývoji hrudní kosti, hrudník je otevřený (Papáček et al. 2000).

V mozku je oproti primitivnějším skupinám lépe vyvinutý koncový mozek a mezimozek, nejkompexnější je však střední mozek, a to zejména u žab (Gaisler, Zima 2007).

Obojživelníci jsou gonochoristé, u některých druhů pak dochází k výskytu intersexuálních nebo hermafroditických jedinců či populací například při výrazných teplotních výkyvech (Gaisler, Zima 2007).

3.4.1.1 Ocasatí (*Caudata*)

Jejich tělo má válcovitý tvar se 4 přibližně stejnými končetinami (Klimeš et al. 2013). Živí se dravě v juvenilním i dospělém stadiu (Gaisler, Zima 2007). Vyskytují se převážně v holarktické oblasti (Klimeš et al. 2013).

U většiny druhů dochází k vnitřnímu oplození, a zvláště v době páření je výrazný pohlavní dimorfismus (samci bývají menší, štíhlejší, barevnější) (Gaisler, Zima 2007). Specifickým znakem je neotenie objevující se u některých ocasatých, u jiných skupin se nevyskytuje vůbec. Neoteničtí jedinci dosahují pohlavní dospělosti před

proběhnutím metamorfózy (k metamorfóze nemusí během života u neotenických jedinců dojít vůbec) (Schoch 2014).

Na lebce dochází k výrazné redukci krycích kostí, čelní a temenní kost nejsou srostlé (Gaisler, Zima 2007). Nemají vyvinuté střední ucho, přesto jsou vytvořené sluchové kůstky (Gaisler, Zima 2007; Klimeš et al. 2013).

3.4.1.2 Žáby (*Anura*)

Žáby jsou nejpočetnější skupina obojživelníků (Klimeš et al. 2013).

Tělo je v dospělosti zkrácené a zploštělé, nemají krk ani ocas, končetiny jsou silně přizpůsobené skákání a plavání, mimo jiné vznikem urostylu (Gaisler, Zima 2007; Schoch 2014). Žábry mají jen larvy, plynová výměna u dospělců probíhá pomocí plic a kůže (Gaisler, Zima 2007). Většina druhů má oplození vnější (amplexus), jsou vejcorodé s nepřímým vývojem. Larvy filtrují plankton a dospělci jsou sekundární karnivorní konzumenti (Gaisler, Zima 2007; Klimeš et al. 2013; Schoch 2014).

3.4.2 Plazi (*Reptilia*)

Blanatí

Mezi apomorfní znaky blanatých patří: vznik terestrického vejce s větším žloutkem a skořápkou, vznikají plodové obaly amnion a seróza, zvětšuje se alantois, dochází k vytvoření močového měchýře, zaniká metamorfóza a akvatická larva, na prstech se objevují drápy, na těle rohovinové šupiny, dochází k regionalizaci páteře, objevuje se tropibazická lebka, jsou redukovány horizontální svalové přepážky, vzniká 12 hlavových nervů, dochází k rozvoji šedé hmoty a mozkové kůry koncového mozku, je přítomná akomodace oka, mžurka, jedno nebo dvě slepá střeva, dokonalejší dělení srdce a tělního oběhu od plicního, primární produkt metabolismu je kyselina močová, samci mají nepárový pářící orgán, vývoj pánevního pletence je složitější, je přítomen Jacobsonův orgán (Gaisler, Zima 2007; Schoch 2014).

Plazi

Plazi, stejně jako obojživelníci, patří mezi poikilotermní živočichy – teplota těla je závislá na teplotě okolí (Verhoef 2001). Společně s ptáky patří do stejné evoluční větve a samotných plazů lze nalézt zhruba 10 000 druhů (Sues 2019). Taxonomické

zařazení druhů se mění každým rokem, hlavně díky pokročilejším genetickým testům (Sues 2019). Plazi jsou vývojově první skupina živočichů, která je zcela přizpůsobena životu na souši (Papáček et al. 2000).

Limitní faktor výskytu plazů je zejména nízká teplota, naopak vysoká teplota pro ně není problém a v teplých suchých oblastech bývají nejčetnějšími živočichy (Gaisler, Zima 2007). Největší rozmanitost plazích druhů je v tropickém a subtropickém pásmu (Verhoef 2001).

Kosterní soustava čtvernožců se vyvinula do stovek rozdílných forem, ale všichni sdílejí podobnou stavbu těla a fylogenetické znaky. Jejich kostra může být z evolučního pohledu považována za modifikaci kostry ryb, která prošla výraznou transformací – redukce žaberní štěrbin, zpevnění lebky a snížení počtu lebečních kostí, oddělení prsní části od končetiny a výskyt článků prstů (Schoch 2014). Dochází k rozvoji svalů, které zpevňují páteř a svaly břišního lisu. Jsou vytvořeny mezižeberní svaly, které pomáhají dýchání (a u hadů i plazení), diferencuje se také svalovina krku a končetin (Gaisler, Zima 2007).

Díky zárodečným obalům (amnion, chorion, alantois) je možné vynechat vodní část vývoje a z vejce se líhne jedinec, který vypadá jako zmenšená verze dospělého (Sues 2019). Někteří plazi vejce nekladou, ale dochází k vejcoživorodosti, kdy se mládě líhne ještě v těle matky (Verhoef 2001).

Kůže bývá kryta šupinami, což umožňuje ochranu před vnějším prostředím a omezuje odpařování vody z těla, kvůli tomu je omezen i prostup plynů přes pokožku (Sues 2019). Zrohovatělou vrstvu kůže šupinatí periodicky svlékají (Papáček et al. 2000) u želv dochází k jejímu postupnému odlupování (Gaisler, Zima 2007). V pokožce se také často nacházejí osifikované části – tzv. osteoderm (Schoch 2014).

Hlavním centrem nervové soustavy je koncový mozek, střední mozek je také relativně velký, stejně tak vývoj mozečku je poměrně dobrý, dochází k rozvoji druhotné mozkové kůry. Z mozku vychází 12 párů hlavových nervů a speciální *nervus vomeronasalis* zajišťující inervaci Jacobsonova orgánu (Gaisler, Zima 2007; Papáček et al. 2000).

Obratle bývají procélní a u všech druhů (kromě hadů a beznohých ještěřů) se presakrální část dělí na krční, hrudní a bederní (Gaisler, Zima 2007). První 2 obratle –

atlas, axis – jsou stavbou rozdílné od zbylých a umožňují otáčení hlavy (Papáček et al. 2000).

3.4.2.1 Šupinatí (*Squamata*)

Šupinatí tvoří až 95 % zástupců plazů a jejich tělo je kryto taškovitě se překrývajícími šupinami (Gaisler, Zima 2007; Klimeš et al. 2013). Tvar šupin na různých částech těla může být rozhodujícím znakem při determinaci druhů (Gaisler, Zima 2007).

3.4.2.1.1 Ještěři (*Sauria*)

Taxonomie není zcela jasná, leguáni, chameleoni a agamy by měly tvořit monofyletickou skupinu linie *Iguana*, která je sesterská ostatním šupinatým (Gaisler, Zima 2007). Mají zpravidla 4 pětiprsté končetiny, u některých druhů dochází k jejich sekundárním redukci (Klimeš et al. 2013).

3.4.2.1.2 Hadi (*Serpentes*)

U hadů došlo k úplné ztrátě končetin (u některých druhů lze nalézt kosterní rudimenty), mají jen pravou plíci, chybí močový měchýř (Gaisler, Zima 2007; Klimeš et al. 2013). Lebka je diapsidní, chybí jařmové oblouky a je extrémně kinetická (Klimeš et al. 2013). Všechny druhy jsou karnivorní, některé druhy jsou extrémně specializované na určitý typ potravy – vejcožrouti, šnekožrouti... (Klimeš et al. 2013).

3.4.2.2 Želvy (*Testudines*)

Mezi plesiomorfni znaky želv patří zvláštní „anapsidní“ lebka, absence Jacobsonova orgánu, podélná kloakální štěrbina, nepárový penis s otevřenou semennou rýhou a kladení vajec. Vejce mořských a některých sladkovodních jsou jen pergamenovou tenkou skořápkou, naopak u suchozemských a zbytku sladkovodních je skořápka velmi silně kalcifikována (Gaisler, Zima 2007).

4 Metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Preparáty

Preparáty použité pro experiment byly zapůjčeny z depozitáře Národního muzea (Tabulka 1), ze školních sbírek Veterinární univerzity Brno (Tabulka 2) a také ze soukromé sbírky pana prof. MVDr. Pavla Širokého, Ph.D (Tabulka 3).

Celkem bylo nasnímáno 44 exemplářů, z toho 2 zástupce želv nebylo možné určit do rodu. Vzhledem k tomu, že přesná determinace taxonomického zařazení není cílem práce, byly i tyto vzorky použity při snímání. V rámci všech exemplářů bylo zastoupeno 10 obojživelníků, 11 ještěřů, 8 hadů a 15 želv. 34 jedinců bylo adultních, 4 subadultní a 6 juvenilních.

4.1.1.1 Depozitář Národního muzea

Vzorky (18 ks) zapůjčené od Národního muzea byly staré 30-50 let. Fixační tekutinou byl líh. Pouze 2 vzorky *Python regius* byly fixovány formaldehydem a poté vloženy do lihu.

Tabulka 1 Exempláře – Národní muzeum

ID	EXEMPLÁŘ	ČESKÝ NÁZEV	VĚK
1	<i>Bufo bufo</i>	ropucha obecná	adult
2	<i>Bufo bufo</i>	ropucha obecná	adult
3	<i>Emys orbicularis</i>	želva bahenní	juvenil
4	<i>Emys orbicularis</i>	želva bahenní	subadult
5	<i>Epicrates cenchria</i>	hroznýšovec duhový	subadult
6	<i>Eumeces sp.</i>	scink	juvenil
7	<i>Iguana iguana</i>	leguán zelený	juvenil
8	<i>Python regius</i>	krajta královská	adult
9	<i>Python regius</i>	krajta královská	adult
10	<i>Uromastyx sp.</i>	trnorepové	adult
11	<i>Vipera ammodytes</i>	zmije růžkatá	subadult
12	<i>Vipera ammodytes</i>	zmije růžkatá	subadult
13	<i>Xenopus laevis</i>	drápatka vodní	adult
14	<i>Xenopus laevis</i>	drápatka vodní	adult
15	<i>Xenopus laevis</i>	drápatka vodní	adult
16	<i>Xenopus laevis</i>	drápatka vodní	adult
17	<i>Xenopus laevis</i>	drápatka vodní	adult
18	<i>Xenopus laevis</i>	drápatka vodní	adult

4.1.1.2 Veterinární univerzita Brno

Vzorky zapůjčené od Veterinární univerzity (8 ks) byly staré více než 70 let, nejstarší exempláře pak z roku 1921 (*Ambystomatidae*) a 1926 (*Lissotriton vulgaris*). U nejstarších vzorků by fixační tekutinou měl být formaldehyd, vyloučit nebo potvrdit to však nebylo možné u těchto ani ostatních exemplářů. U některých vzorků došlo při manipulaci při výuce k poškození, v tomto případě byly doplňovány ethanolem. Kvůli stáří a nejasné historii však nebylo možné zjistit, jaká fixační tekutina/směs byla, pro který vzorek použita. Všechny tyto exempláře byly skenovány ve skleněných válcích z důvodu nemožnosti otevření nádob a manipulace se vzorky bez jejich poškození.

Tabulka 2 Exempláře – Veterinární univerzita

ID	EXEMPLÁŘ	ČESKÝ NÁZEV	VĚK
1	<i>Ambystomatidae sp.</i>	axolotl	adult
2	<i>Chamaeleo sp.</i>	chameleon	adult
3	<i>Lissotriton vulgaris</i>	čolek obecný	adult
4	<i>Natrix natrix</i>	užovka obojková	adult
5	<i>Tarentola mauritanica</i>	gekon zední	adult
6	<i>Testudo hermanni</i>	želva zelenavá	adult
7	<i>Tiliqua rugosa</i>	scink uťatý	adult
8	<i>Timon lepidus</i>	ještěrka perlová	adult

4.1.1.3 Sbíрка p. prof. Širokého

Vzorky zapůjčené od p. prof. Širokého byly staré zhruba 15 let. Tyto vzorky byly pouze konzervovány ethanolem a nebyly nijak dál preparovány, exempláře byly pouze ponořené do ethanolu.

Tabulka 3 Exempláře-p. prof. Široký

ID	EXEMPLÁŘ	ČESKÝ NÁZEV	VĚK
1	<i>Centrochelys sulcata</i>	želva ostruhatá	juvenil
2	<i>Crotalus molossus</i>	chřestýš černoocasý	adult
3	<i>Cuora amboinensis</i>	želva amboinská	adult
4	<i>Cuora mouhotii</i>	želva hranatá	adult
5	<i>Cuora mouhotii</i>	želva hranatá	adult
6	<i>Eumeces sp.</i>	scink	adult
7	<i>Geomyda spengleri</i>	želva Spenglerova	juvenil
8	<i>Graptemys pseudographica</i>	želva mississippská	juvenil
9	<i>Hoesemys spinosa</i>	želva ostnitá	adult
10	<i>Mauremys rivulata</i>	želva tmavobřichá	adult
11	<i>Phrynosoma sp.</i>	ropušník	adult
12	<i>Sacalia quadriocellata</i>	želva čtyřoká	adult
13	<i>Trioceros montium</i>	chameleon horský	adult
14	<i>Trionychidae sp.</i>	kožnatkovití	adult
15	<i>Uromastyx sp.</i>	trnorepové	adult
16	<i>Vipera kaznakovi</i>	zmije kavkazská	adult
17	<i>Testudines</i>	želva	adult
18	<i>Testudines</i>	želva	adult

4.1.2 Přístroje

Pro skenování preparátů byl použit výpočetní tomograf Siemens Somatom Scope power. Pro 3D tisk byla použita tiskárna Stratasys F370 a pro následné vyprání modelů pračka SCA3600 Oryx.

Pro další práci s naskenovaným materiálem byly použity osobní počítače běžící v systému MacOS a Windows.

4.1.3 Ostatní použitý materiál

Byly použity nitrilové ochranné rukavice pro bezpečnou manipulaci se vzorky, které byly vyjmuty z fixační tekutiny. Dále byla použita strečová folie pro ochranu výpočetního tomografu před fixačními tekutinami. Při praní vytisknutých modelů byl použit roztok WaterWorks P400 Soluble Concentrate. Pro finální dočištění vytisknutých modelů byly použity chirurgické nůžky a pinzeta. Pro dolepení vytisknutých modelů bylo použito kyanoakrylátové lepidlo.

4.2 Metodický postup

4.2.1 Příprava

Před použití CT pro skenování preparátů bylo pojízdné lehátko obaleno strečovou folií, aby se zamezilo kontaktu fixačních tekutin ze skenovaných vzorků s výpočetním tomografem.

Následně byly jednotlivé vzorky rozdílně připraveny pro samotné skenování:

- Sběrka prof. Širokého – preparáty byly vyjmuty z fixační tekutiny a napolohovány na pojízdné lehátko, případně pěnový polštářek, a to podle velikosti exempláře.
- Národní muzeum – postup byl u většiny vzorků stejný jako u sbírky prof. Širokého. Pouze *Iguana iguana*, byl skenován ve skleněném válci. Válec byl pomocí polštářku napolohován do úhlopříčné polohy, aby nehrozilo zvrhnutí nádoby a rozlití fixační kapaliny.
- VETUNI – všechny vzorky zapůjčené z Veterinární univerzity byly skenovány v původní nádobě. Vzhledem ke stáří a způsobu uzavření

(měchuřina) bylo zajištění polohy nejsložitější, opět bylo voleno úhlopříčné zajištění válců pomocí pěnových polštářků a různých velikostí plastových krabic.

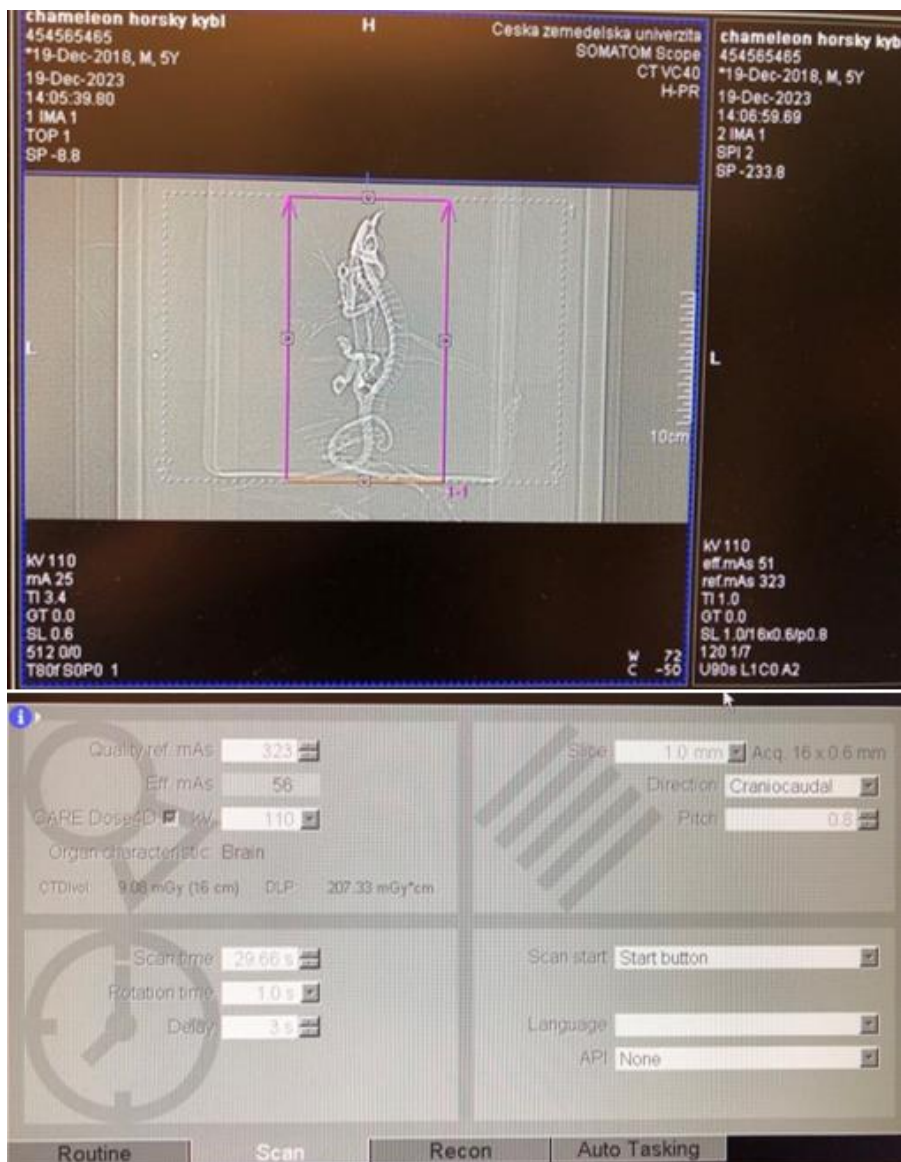
Po napolohování exempláře bylo, pomocí posouvání lehátka, provedeno zaměření CT na správné místo. Před začátkem skenování je pak nutné odejít do samostatné místnosti odstíňující RTG záření.

4.2.2 CT snímání

Exempláře byly skenovány pomocí multidetektorového výpočetního tomografu Siemens Somatom Scope Power. Byla použita technika spirálního skenování se šířkou řezu 1 mm. Kolimace detektorů byla 16 x 0,6 mm a pitch faktor 0,8. Použitá energie záření byla 110 kV. U exemplářů skenovaných ve skleněných nádobách bylo nutné zvýšit energii na 130 kV, aby se zvýšila pronikavost záření skrz sklo, které silně pohlcuje rentgenové záření (Obrázek 6).

Následně byly rekonstruovány řezy 0,75-1,5 mm pomocí High Resolution protokolu, který pomocí rekonstrukčního protokolu umožňuje zvýraznění denzitního rozhraní, a tedy rozlišení malých struktur. Čím je nižší šíře řezu při skenování, tím je poté možné dosáhnout kvalitnějšího, zejména multiplanárního, zobrazení.

Z těchto snímků pak byla provedena rekonstrukce do multiplanárního 3D zobrazení (axiální, sagitální a koronární rovina).



Obrázek 6 Parametry CT snímání (foto autor)

4.2.3 Extrakce snímků

Následná extrakce souborů z IMA formátu do snímků ve formátu .stl proběhla v radiologickém software Horos, který běží v operačním systému MacOS.

4.2.4 3D tisk

4.2.4.1 Příprava

Nejprve proběhl výběr vhodných exemplářů, podle kvality snímání a jejich vhodnosti k tisku. Za třídu obojživelníku byl vybrán exemplář *Bufo bufo*, zapůjčený

z depozitáře Národního muzea. Všechny vybrané exempláře plazů pak byly ze sbírky prof. Širokého. Za podřád ještěřů *Trioceros montium*, za hady *Crotalus molossus* a za řád želv *Cuora mouhotii* a kožnatá želva z čeledi *Trionychidae*.

Stl soubory těchto exemplářů byly upraveny v programu Gom Inspect, který slouží pro práci s 3D modely. V tomto programu bylo provedeno vyčištění artefaktů ze snímků a základní úprava modelu, tedy upravení přelísů a případné doplnění nenasnímaných částí.

4.2.4.2 Tisk

Chřestýš, kožnatka i chameleon byli umístěni na jednu tiskovou podložku, vzhledem k dostatečné rezervě v tiskovém objemu. Ropucha a želva hranatá pak byly tisknuty zvlášť.

Tisk proběhl s těmito parametry:

- stavební materiál – ASA
- podpůrný materiál – QSR
- tloušťka tiskové vrstvy – 0,25 mm
- síla stavebního materiálu – 1,016 mm
- způsob výplně hmoty – sparse fill

Časová a materiálová náročnost – chřestýš, kožnatka, chameleon

- čas tisku – 37 hodin a 59 minut
- objem použitého materiálu-modely – 68,151 cm³
- objem použitého materiálu-podpůrná struktura – 245,154 cm³

Časová a materiálová náročnost – ropucha, želva hranatá

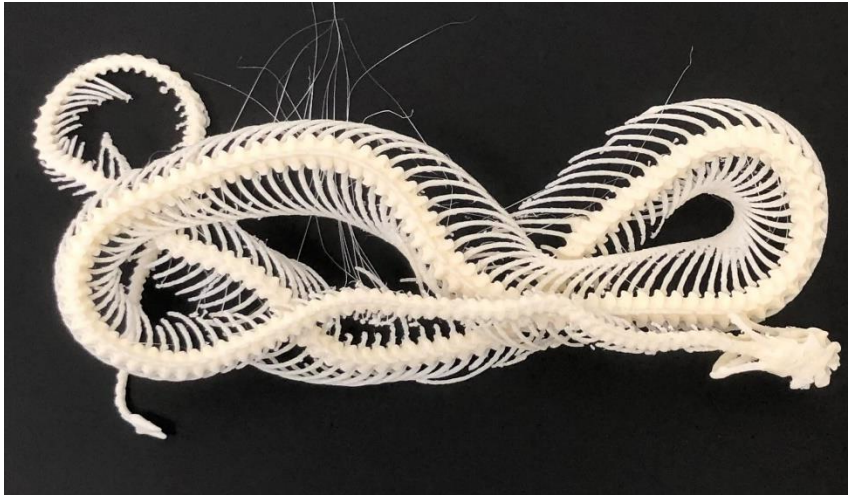
- čas tisku – 17 hodin a 27 minut
- objem použitého materiálu-modely – 81,874 cm³
- objem použitého materiálu-podpůrná struktura – 121,478 cm³

4.2.4.3 Následné zpracování

Podpůrný materiál byl po tisku vyčištěn pomocí pračky SCA3600 Oryx za použití roztoku přípravku WaterWorks P400 Soluble Concentrate. Doba praní byla 3 h.

Pokud na modelu i přes praní zůstávaly zbytky podpůrného materiálu (Obrázek 7), tak byl dále odstraněn ručně za použití drobných chirurgických nůžek a pinzety.

V případě, že došlo při praní k oddělení některých částí vytisknutého modelu, byly tyto dolepeny kyanoakrylátovým lepidlem.



Obrázek 7 Výtisk Crotalus molosuss po praní před finálním dočištěním (foto autor)

4.2.5 Digitální modely

Získání snímků ve 2D (koronární, sagitální a axiální rovina) a 3D zobrazení modelu kostní tkáně proběhlo v software Radiant.

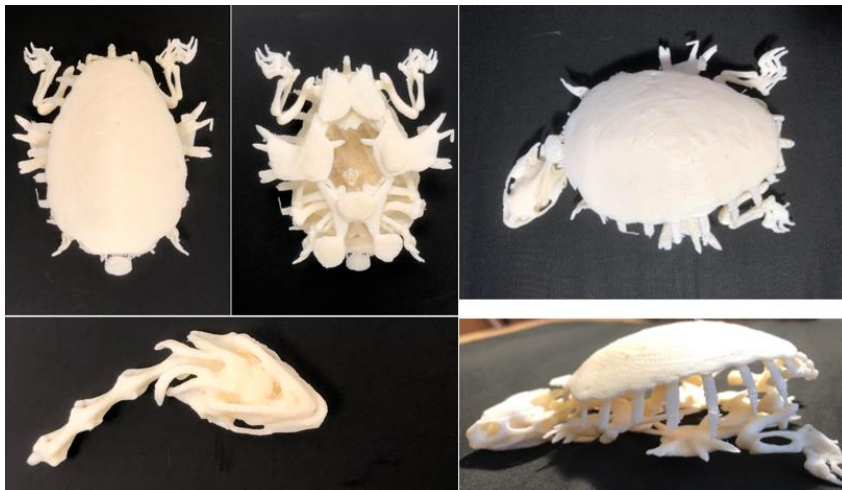
5 Výsledky

5.1 Replikace koster



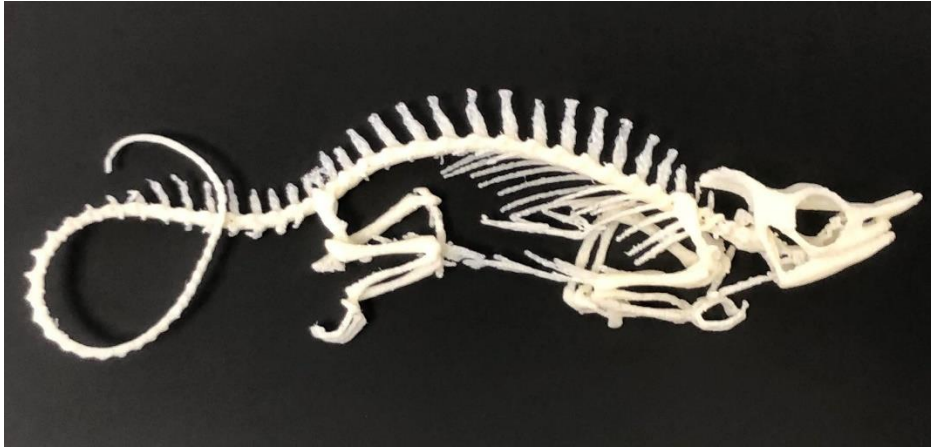
Obrázek 8 Výtisk *Crotalus molossus* (foto autor)

U tisku hada (Obrázek 8) byla, dle předpokladu, největším problémem křehkost žeber a jejich napojení na páteř. Tisk proběhl v pořádku, při následném odstraňování pomocného materiálu (praní i ruční dočištění) se mnoho žeber oddělilo od páteře. Lebka, kostěná část chřestidla i páteř jsou vytištěny kvalitně. Lepší soudržnost žeber s páteří by mohla být zajištěna doplněním hmoty na spoje při přípravě modelu v programu GomInspect či zvolením rozdílné tloušťky stěny zvolené pro tisk.



Obrázek 9 Výtisk *Trionychidae sp.* (foto autor)

Výtisk *Trionychidae* (Obrázek 9) je poměrně kvalitní, ale chybou v tisku nedošlo k vytištění části páteře přiléhající na karapax. Zbylé části kostry byly vytištěny správně a kvalitně.



Obrázek 10 Výtisk *Trioceros montium* (foto autor)

Díky nejjednodušší stavbě kostry byl nejpovedenějším výtiskem chameleon *Trioceros montium* (Obrázek 10). Nastal zde stejný problém jako u hada, tedy křehkost a špatné připojení žeber k modelu.



Obrázek 11 Výtisk *Cuora mouhotii* (foto autor)

Výtisk želvy hranaté (Obrázek 11) byl velmi povedený, včetně kvalitně vytištěných struktur vevnitř krunýře. Při praní došlo k oddělení končetin v kloubních spojeních, ty tedy byly zpětně dolepeny pomocí kyanoakrylátového lepidla.



Obrázek 12 Výtisk *Bufo bufo* (foto autor)

U ropuchy (Obrázek 12) byla kvalitně vytištěna centrální část kostry. Při praní však došlo k poškození některých kostí hrudních i pánevních volných končetin i kostí ramenního pletence. Kvůli tomuto nebylo možné sestavit kompletní kostru.

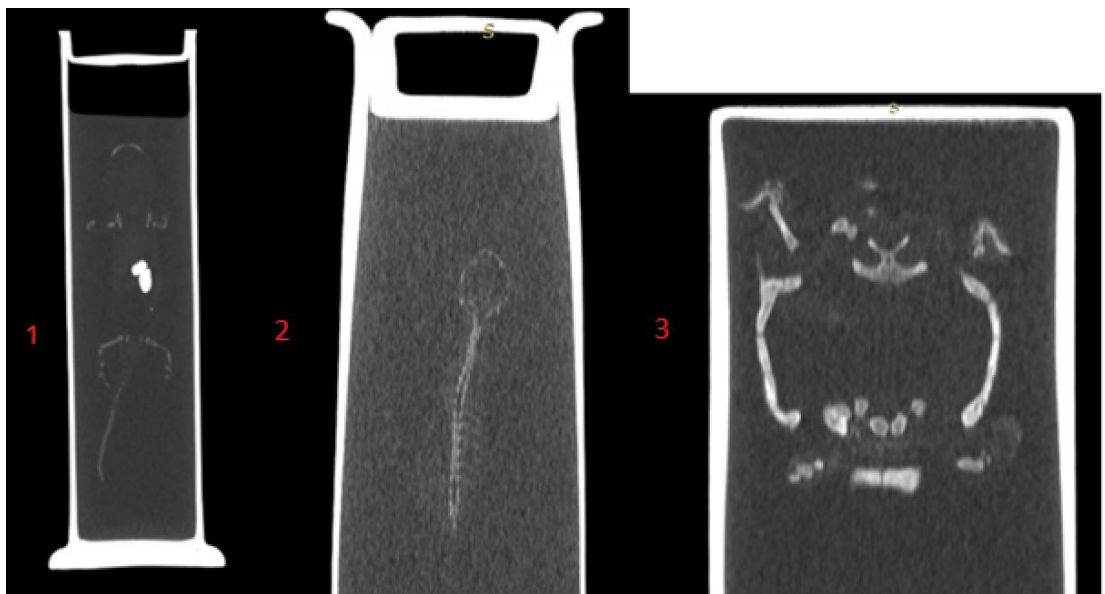
5.2 Základní metodika neinvazivní replikace digitalizovaných koster

1. Příprava výpočetního tomografu a preparátů
2. Příprava exemplářů – vyjmutí z fixační tekutiny a napolohování, případně pouze zajištění polohy při skenování v nádobě
3. Parametry skenování:
 - a. Spirální skenování se šířkou řezu 1 mm
 - b. Kolimace detektorů 16 x 0,6 mm, pitch faktor 0,8
 - c. Energie záření 110 kV, v případě skenování v nádobě 130 kV
4. Rekonstrukce řezů 0,75-1,5 mm pomocí High Resolution protokolu umožňující zvýraznění denzitního rozhraní
5. Rekonstrukce do multiplanárního zobrazení a extrakce snímků do formátu .stl (např. radiologický software Horos)
6. Příprava modelů pro 3D tisk (vyčištění artefaktů, úprava přelisů, doplnění nenasnímaných částí) v programu Gom Inspect
7. Tisk s následujícími parametry:
 - a. Stavební materiál ASA
 - b. Podpůrný materiál QSR

- c. Síla stavebního materiálu 1,016 mm
 - d. Tloušťka tiskové vrstvy – 0,25 mm
 - e. Způsob výplně hmoty – sparse fill
8. Vyplavení podpůrného materiálu za použití roztoku WaterWorks P400 Soluble Concentrate
 9. Ruční dočištění modelů od nežádoucího zbytku podpůrného materiálu.

5.3 Digitalizace

5.3.1 Preparáty ve skleněných nádobách



Obrázek 13 Sken preparátů ve skleněném válci (foto autor) Zleva: *Ambystomatidae* (VETUNI, 1921), *Iguana Iguana* (NM), *Testudo hermanni* (VETUNI).

Vzhledem k hustotě skla ($\approx 2500 \text{ kg/m}^3$) a její podobnosti k hustotě tkáni kostní ($\approx 2000 \text{ kg/m}^3$), je detekce kostní tkáně velmi ztížena.

Na Obrázek 13, vzorek 2 (*Iguana iguana*) je juvenilní jedinec, jehož kostra není zcela osifikována, tudíž by plná kostra nebyla vidět v žádném případě. Nicméně i na obou ostatních obrázcích adultních jedinců (Obrázek 13, vzorek 1 a 3) je vidět, že část kostry v zobrazení splývá s okolním prostředím. Nejvýrazněji v zobrazení vystupuje na vzorku 1 cizí objekt v trávicí soustavě s výrazně vyšší hustotou hmoty. Tento způsob je tedy pro následný tisk v tomto případě nevhodný.

5.3.2 Stáří jedince

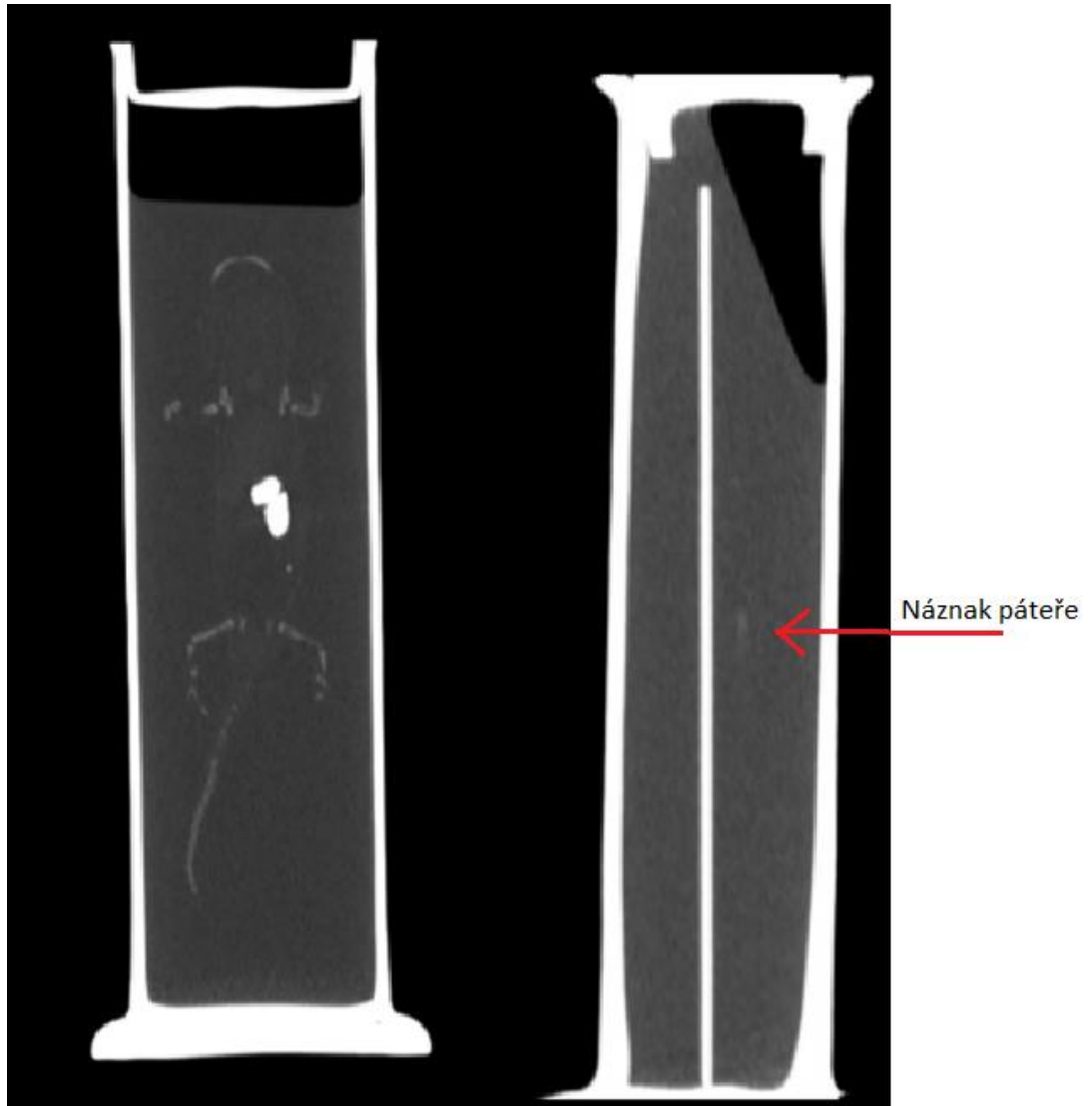


Obrázek 14 Porovnání juvenilního, subadultního a adultního jedince (foto autor), Zleva: *Centrochelys sulcata* (juvenil), *Emys orbicularis* (subadult), *Testudines* (adult)

Na Obrázek 14 vidíme želvy různého stáří. U juvenilního jedince (Obrázek 14, vzorek 1) lze vidět kostru v nízkém stupni osifikace – plastron není vůbec srostlý v jednotnou plochu navazujících štítků, karapax je také vyvinutý pouze částečně, srůsty nejsou dokončeny ani v kostře volných končetin a kostí lebky. Na subadultním jedinci (Obrázek 14, vzorek 2) vidíme už téměř dokončený vývoj kosterní soustavy, stále ale například nejsou plně srostlé švy plastronu. Adultní jedinec (Obrázek 14, vzorek 3) pak je plně osifikován.

5.3.3 Obojživelníci

Celkový počet skenovaných obojživelníků byl 10 exemplářů. Z toho počtu šlo o *Ambystomatidae sp.* a *Lisstoriton vulgaris* zapůjčených od VETUNI. Dále bylo skenováno 6 kusů *Xenopus laevis* a 2 kusy *Bufo bufo*, obojí z depozitáře Národního muzea.



Obrázek 15 Obojživelníci VETUNI (foto autor) Zleva: *Ambystomatidae* (VETUNI, 1921), *Lisstoriton vulgaris* (VETUNI)

Na Obrázek 15 jsou zobrazeny exempláře obojživelníků z VETUNI, jejichž kvalita nasnímání je nízká kvůli nutnosti setrvání ve skleněné kyvetě (viz kapitola 5.3.1).



Obrázek 16 Xenopus laevis (NM) (foto autor)

Skenováním drápatek vodních byly získány poměrně kvalitní snímky (Obrázek 16). Zvláštním úkazem je zde neúplné zobrazení kostí prstů u končetin ramenního pletence, problémem by neměla být velikost kostí (na snímcích jsou patrné i menší kosti) ani stupeň osifikace (jedinci byli plně adultní). Kvůli této komplikaci byly tyto exempláře vyřazeny z tisku, jelikož replikace by nebyla úplná.

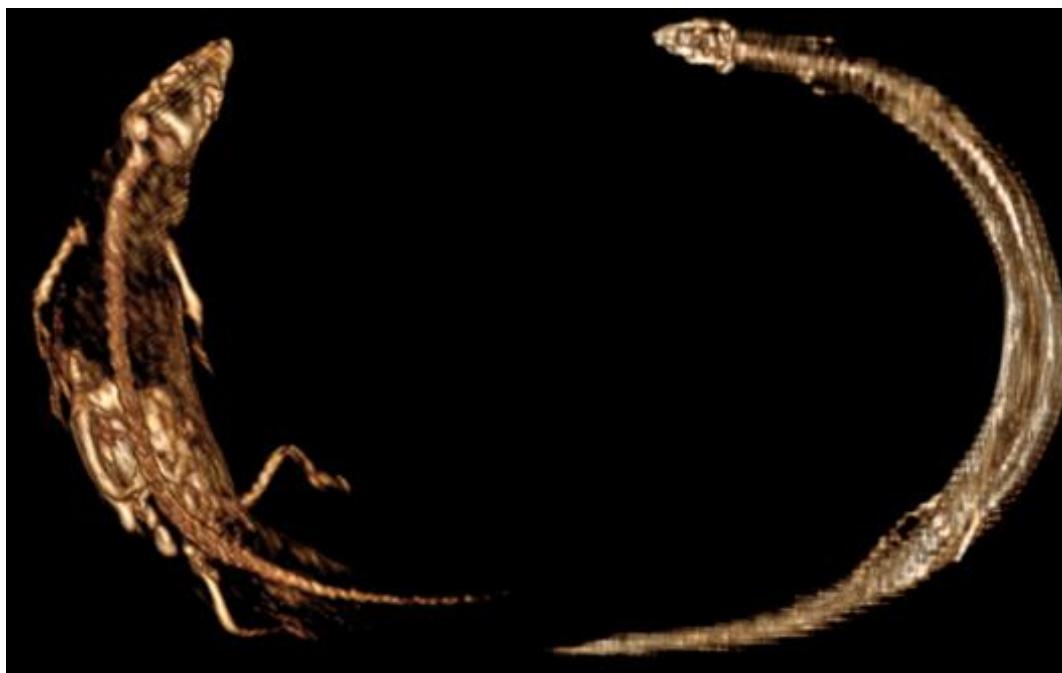


Obrázek 17 Bufo bufo (NM) (foto autor)

Nejlepšího výsledku skenování u obojživelníků bylo dosaženo u ropuch obecných. Jak je patrné na snímcích (Obrázek 17), v obou exemplářích byly přítomné osifikované fragmenty v oblasti tělních dutin. Jde pravděpodobně o zbytky potravy, kdy velcí jedinci jsou schopni spolknout i malé obratlovce. Jedinec vlevo byl pak vybrán pro replikaci 3D tiskem.

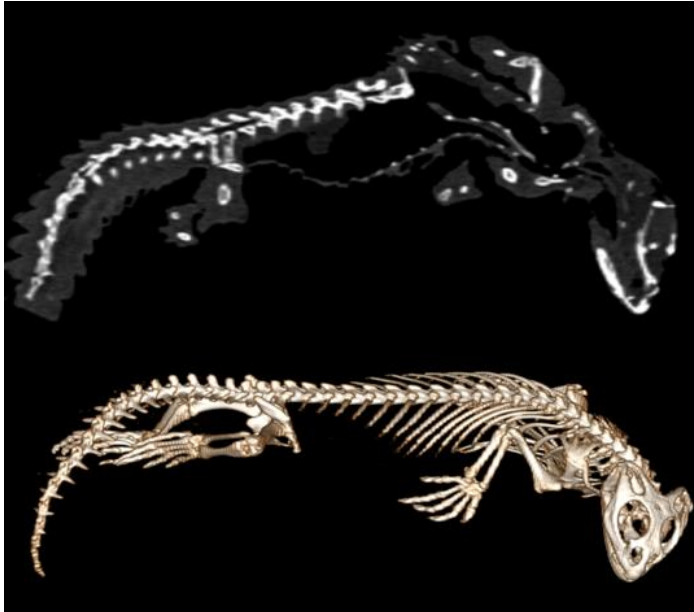
5.3.4 Ještěři

Celkem bylo skenováno 11 zástupců z podřádu ještěřů. Z tohoto počtu bylo 5 exemplářů skenováno ve skleněných válcích (výsledky viz kapitola 5.3.1) a to: *Iguana iguana* (NM), *Chamaeleo sp.* (VETUNI), *Tarentola mauritanica* (VETUNI), *Tiliqua rugosa* (VETUNI) a *Timon lepidus* (VETUNI).



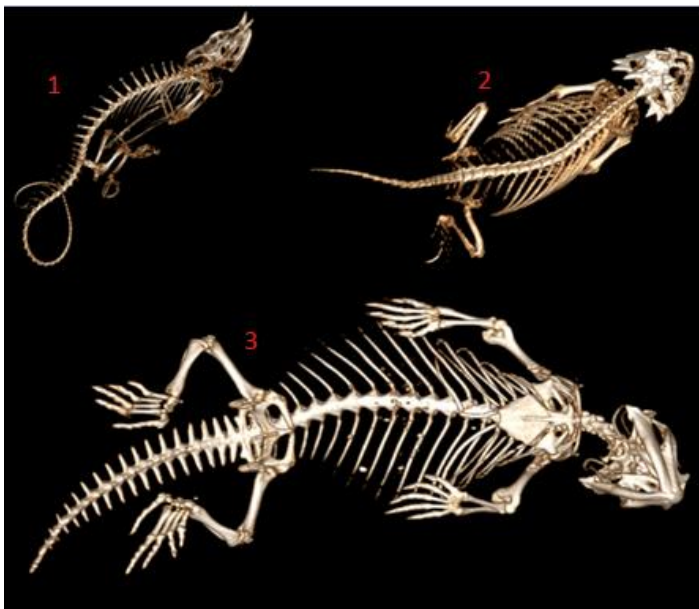
Obrázek 18 *Eumeces sp.* (vlevo NM, vpravo prof. Široký) (foto autor)

Dalšími skenovanými exempláři byli dva jedinci rodu *Eumeces*. Bohužel jak vidět na Obrázek 18, ani jeden ze skenů nebyl v dostačující kvalitě. Pravděpodobným důvodem je špatně zvolený protokol vůči velikosti jedince při CT snímání.



Obrázek 19 *Uromastyx Sp.* (Široký) (foto autor)

Na Obrázek 19 vidíme jedince rodu *Uromastyx* v 2D a 3D zobrazení. Ve vhodném software (např. RadiAnt) je možné procházet jednotlivé vrstvy (tloušťka řezu je závislá na nastavení při skenování) ve 2D zobrazení a to ve 3 rovinách – koronární, axiální a sagitální. V 3D zobrazení je zobrazen model kostní tkáně.



Obrázek 20 Ještěři (foto autor), Zleva: *Trioceros montium* (Široký), *Phrynosoma sp.* (Široký), *Uromastyx sp.* (NM).

Z ještěřů byl nejkvalitněji nasnímán *Trioceros montium* (Obrázek 20, vzorek 1), který byl dále použit pro 3D tisk. Nicméně i u ostatních jedinců šlo o kvalitní zobrazení.

5.3.5 Hadi

Z podřádu hadů bylo skenováno celkem 8 jedinců.



Obrázek 21 Hadi (foto autor). 1. *Epicrates cenchria* (NM), 2. *Python regius* (NM), 3. *Crotalus molossus* (Široký), 4. *Vipera ammodytes* (NM), 5. *Natrix natrix* (VETUNI)

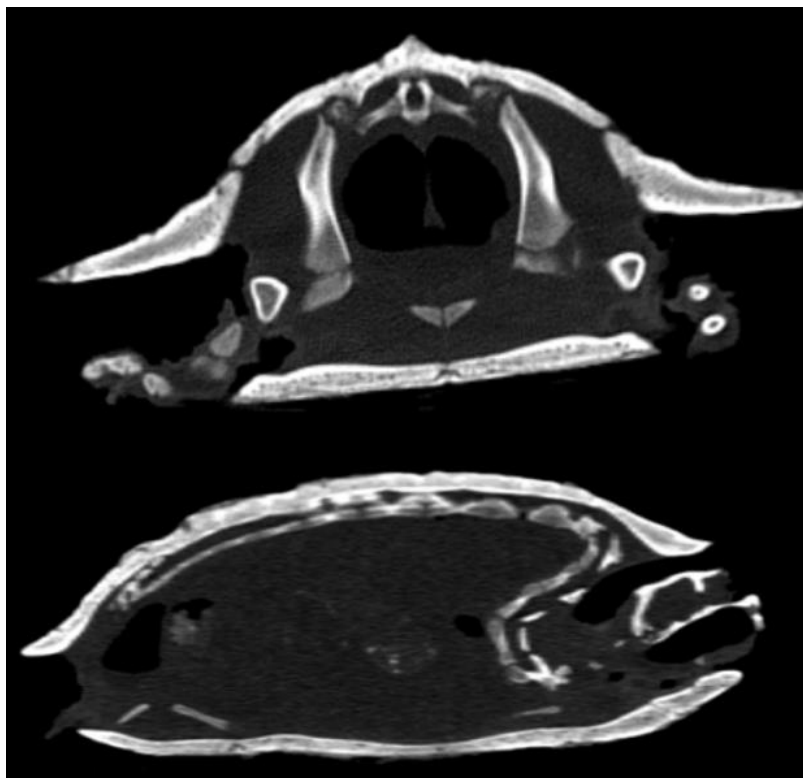
Python regius (Obrázek 21, vzorek 2) byl část doby existence preparátu fixován ve formaldehydu. Při porovnání s ostatními jedinci, kteří byli fixováni pouze v ethanolu, není patrná žádná změna v zobrazení kostní tkáně.

V trávicí dutině *Natrix natrix* (Obrázek 21, vzorek 5) byla nalezena kostra neidentifikované žáby.

Ze skenovaných hadů byl pro 3D tisk vybrán jedinec *Crotalus molossus* (Obrázek 21, vzorek 3), vzhledem ke kvalitě snímku i poloze exempláře.

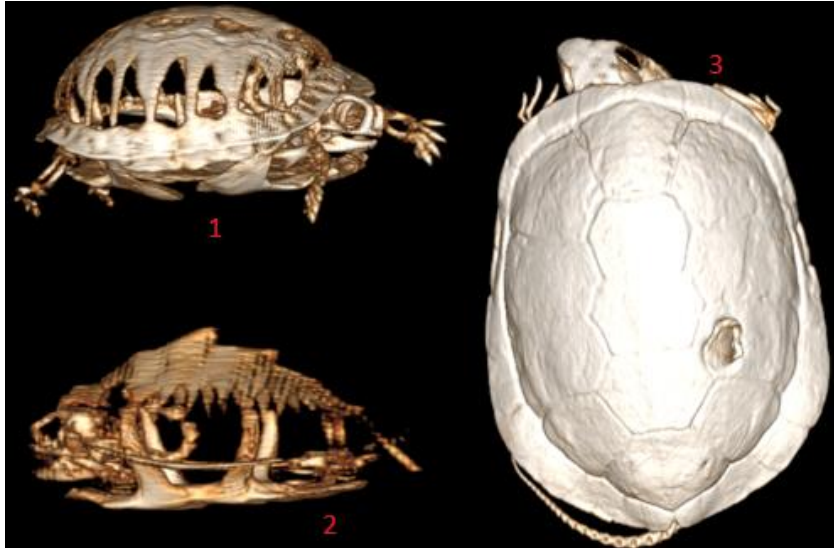
5.3.6 Želvy

Bylo naskenováno celkem 15 zástupců různých čeledí řádu želv.

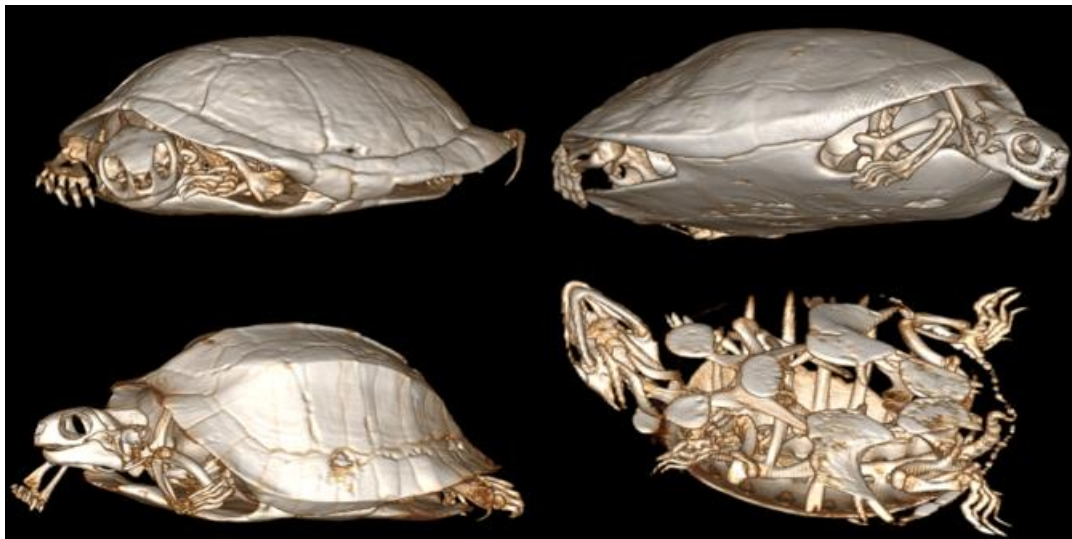


Obrázek 22 Hoesemys spinosa sagitální a axiální řez (Široký) (foto autor)

Obrázek 22 ukazuje 2D zobrazení v sagitální a axiální rovině na nichž je dobře patrné uložení kostí uvnitř krunýře.



Obrázek 23 Juvenilní želvy (foto autor). 1. *Centrochelys sulcata* (Široký), 2. *Graptemys pseudographica* (Široký), 3. *Emys orbicularis* (NM)



Obrázek 24 Zástupci skenovaných želv (foto autor) Zleva: *Emys orbicularis* (NM), *Sacalia quadriocellata* (Široký), *Cuora mouhotii* (Široký), *Trionychidae* sp. (Široký)

Na Obrázek 23 jsou skenované juvenilní exempláře želv, u vzorků 1 a 2 je patrná nižší kvalita obrazu, opět pravděpodobně z důvodu nesprávně zvoleného protokolu při skenování. U vzorku 3 však jde o kvalitní sken. Na Obrázek 24 jde pak o adultní zástupce různých čeledí.

6 Diskuse

Prvními kapalinovými preparáty, které byly snímány pomocí CT včetně nádoby, byly lidské ostatky s různými patologiemi umístěné v různých typech skleněných nádob. Výsledný obraz kosterní soustavy nebyl ovlivňován skenováním ve fixační tekutině (měkké tkáně však často nebylo možné odlišit od fixační tekutiny). Překážkou však byla skladovací nádoba, kdy sklo reagovalo s paprsky takovým způsobem, který výrazně ovlivňoval kvalitu výsledného obrazu, nejvíce pak u skleněných kvádrů, nejméně u plexiskla (Chhem et al. 2006). Na výsledných skenech v této studii jsou poměrně dobře, i když ne zcela ostře, vidět osifikované části vzorků, hůře pak kloubní hlavice a chrupavčitá hmota, měkké tkáně nejsou patrné vůbec. Tento výsledek odpovídá i mým výsledkům při skenování ve skleněných nádobách – při rekonstrukci byly na obrázcích patrné hlavně velké či hodně osifikované části kostí. Měkké tkáně, chrupavčité oblasti či ne plně osifikované části více či méně splývali s fixační tekutinou. U juvenilních jedinců byla patrná pouze centrální část kostry (lebka, páteř). Nejvýrazněji pak na jednom skenu vystupoval cizí objekt v trávicí soustavě s výrazně vyšší denzitou než kostní tkáň.

Chhem et al. (2006) dále popisuje rekonstrukci 3D modelu kostní tkáně. V rámci této rekonstrukce narazili na mnoho problémů například složité ruční odstraňování nádoby i tekutiny z obrazu či to že v místech na kterých se exemplář dotýkal skla ho nebylo možné rekonstruovat. I přes tyto překážky bylo možné 3D model pomocí postprocessingu získat, není však zcela jasné, zda by tento model byl dostatečně kvalitní pro provedení následné replikace. Vzhledem k náročnosti postprocessingu nebyla rekonstrukce exemplářů, skenovaných ve skleněných nádobách, součástí mé práce. Nicméně zmiňovaná studie dokazuje, že i replikace vzorků skenovaných ve skle by měla být možná.

Podobných výsledků dosáhl i Newton et al. (2018), byl pomocí CT skenování zkoumán ontogenetický vývoj embryí vakovlka tasmánského (*Thylacinus cynocephalus*), kdy jeden ze vzorků byl skenován ve skleněné nádobě, ostatní volně položené. Ze vzorku skenovaného ve skle bylo možné sestavit rekonstruovaný obraz, na kterém bylo možné pozorovat základní osifikované struktury. Nicméně obraz i po vyčištění obsahuje hodně šumu a rekonstrukce by v tomto případě pravděpodobně nebyla možná. Na druhou stranu ostatní vzorky (skenovaných bez nádoby) byly

rekonstruovány do replikovatelné podoby. V případě, kdy byl při skenování použit protokol pro měkké tkáně, by byla možná replikace i těch. V porovnání exempláře skenovaného ve skle v mé a v této zmiňované studii, bylo na výsledných skenech mých exemplářů více šumu v tekutině, přes tento šum je kosterní soustava zobrazena ostřeji než v případě vakovka, kdy šum silně zasahuje i do kosterní tkáně.

Využitím 3D výtisků, jako materiálu pro výuku anatomie, se zabývali v roce 2018 Garas et al. v pilotní studii. Jako výhody, při použití 3D výtisků jako výukových pomůcek, byly spatřovány: možnost se vzorků dotýkat a manipulovat s nimi (u kapalinových preparátů nelze), menší časová náročnost zpracování, větší přesnost výsledného „preparátu“, zdravotní nezávadnost, ale i etická stránka získávání zejména vzorků lidské tkáně. Výstupem bylo poznání, že 3D výtisky by mohly být efektivním nástrojem při výuce, často také studenty byly lépe přijímány než kapalinové nebo plastinované exempláře. I v případě mé práce se zdálo, že manipulace s výtisky je obecně snazší než s tradičními kapalinovými nebo osteologickými preparáty. Exempláře je také na rozdíl od kapalinových preparátů možné prohlédnout si z menší vzdálenosti a do větších detailů. Výhody nalézám i ve způsobu uskladnění, kdy je potřeba méně prostoru než u kapalinových preparátů, není potřeba doplňovat vypařující se tekutiny a údržba při skladování například v prašném prostředí je snazší než při péči o reálné osteologické preparáty. Díky neinvazivnosti metody je možné používat repliky, které by bylo velmi obtížné až nemožné pro výuku získat (ohrožené či vymřelé druhy apod.). Jako možná nevýhoda při použití výtisků se jeví rozdílné fyzikální vlastnosti – odlišná hmotnost či barva výsledného exempláře. Tyto zádrhele jsou však částečně řešitelné – pro dosažení podobnější hmotnosti zvolit při tisku určitý způsob výplně hmoty nebo následné dobarvování exemplářů pro přirozenější vzhled.

Replikace koster vyhynulých živočichů byla vyzkoušena v roce 2015 týmem Manzano et al. V tomto výzkumu byly skenovány a replikovány vzorky holuba stěhovavého (*Ectopistes migratorius*) a paprskoploutvé ryby přísavníka zaječího (*Moxostoma lacerum*). Důvod vytváření replikovaných vzorků byl zjednodušení identifikace kosterních úlomků těchto dvou druhů. Získat referenční materiál je často složité – dostupné bývají pouze části exemplářů z archeologického výzkumu, fotografie či kresby. Kromě tohoto využití (zjištění původního rozšíření druhu) na modelech lze pozorovat i například vliv environmentálních změn na anatomii druhu. Přestože tento

tým při výzkumu narazil na některé problémy (odstranění podpůrného materiálu, replikace drobných elementů), celkový výsledek byl pozitivní – možnost vytvoření referenční repliky kdekoliv na světě, virtuální měření a další výzkum bez invazivních zásahů do původního vzorku. Při vytváření replik v mé práci došlo k podobným problémům – při odstraňování podpůrného materiálu se některé spoje uvolnily a bylo nutné materiál opětovně spojit lepidlem, některé drobné exempláře se nepodařilo kvalitně naskenovat pro použití k replikaci a u žáby kvůli nízké kompaktnosti kostry byly některé části při vymývání podpůrného materiálu nenávratně poškozeny, tak že exemplář nebylo možné dát ve fyziologické podobě dohromady. Podobně jako ve zmiňované studii byl však celkový výsledek pozitivní, zejména pro možnost replikace po celém světě u exemplářů, které by byly jinak naprosto nedostupné.

V případě nemožnosti determinace druhu pomocí DNA testů (mumie, fosilie) je možné často druhy determinovat podle digitalizovaných CT snímků. Výzkumný tým Lemierre et al. roce 2021 zkoumal na přírodně vzniklé mumii *Bufo servatus* různé parametry kostry. Díky tomuto výzkumu byl pak tento druh přeřazen v taxonomickém stromu a přejmenován na *Thaumastosaurus servatus*, toto jméno více odpovídá novému taxonomickému zařazení. Kromě těchto determinačních znaků jsou na kostře dobře pozorovatelné některé autapomorfie (Porro, Richards 2017). U kapalinových preparátů je, zejména kvůli degradaci tkáně, ale i např. nemožnosti otevřít uskladňovací nádobu, složité získat vzorek DNA dostatečný pro determinaci tímto způsobem. Při naskenování a digitální rekonstrukci exemplářů, u kterých není jasná správná determinace vzorku či nejsou determinovány, je tedy možné, díky digitálnímu proměření exempláře, potvrdit či upřesnit správnou determinaci druhu. Jelikož determinace nebyla cílem mé práce, tyto rozměry u vzorků měřeny nebyly. Digitalizovaná data však jsou dostupná, není tedy problém ve vhodném radiologickém software tyto údaje zpětně doměřit a dále použít pro další výzkum.

7 Závěr

Jedním z cílů byla digitalizace preparátů. U většiny skenovaného materiálu byly výsledné 3D modely kvalitní. Nekvalitní skeny byly získány u preparátů rodu *Eumeces* a některých juvenilních želv, pravděpodobně chybou při skenování či zvolením špatného protokolu. Dále dle předpokladu bylo zobrazení nižší kvality u exemplářů, které zůstávaly ve skleněných nádobách, protože sklo pohlcuje velkou část rentgenového záření. Kosterní soustava byla však na většině z nich přijatelně patrná.

Dalším cílem byla replikace kostry z digitalizovaného materiálu. Ta proběhla nejlépe u preparátu chameleona a obou želv. U chřestýše (a částečně chameleona) byla problémem křehkost a napojení žeber. Napojení by bylo řešitelné detailnější úpravou modelu před tiskem (doplnění daných míst hmotou či zvýšení tloušťky tiskové vrstvy). Křehkost pak použitím jiného filamentu či způsobu tisku. Tento problém nastává i u klasických osteologických preparátů, bylo tedy očekávatelné, že by k němu mohlo dojít i u tohoto způsobu replikace. U replikace žáby došlo při praní k poškození některých částí, vytisknutý model tedy nebylo možné sestavit do fyziologické podoby. Kromě modelu žáby však ostatní exempláře byly povedené. Řadu těchto nedostatků by však bylo možné zmírnit či zcela eliminovat zvětšením tloušťky povrchu tištěného modelu i samotnou formou výplně modelu. Výsledné modely by pak byly hutnější a odolnější vůči poškození.

Posledním cílem bylo stanovení základní metodiky pro neinvazivní digitalizace a replikace koster nižších obratlovců. Stanovená byla metodika pouze pro exempláře vyndané z fixační tekutiny. U exemplářů v nádobách by byl postup velmi podobný, jen s rozdílem vyšší náročnosti postprocessingu. V tomto případě by bylo nutné ručně odstranit z digitálního modelu nádobu i fixační tekutinu a více se věnovat úpravě méně kvalitně naskenovaných částí.

Digitalizovaná data či 3D repliky nalézají další využití v mnoha přírodovědných oborech od zooarcheologie přes anatomii a taxonomii až po ekologii. Na replikách je například možné sledovat změny v rámci ontogeneze i fylogeneze – zajímavé může být i srovnání starších exemplářů se současnými populacemi kdy, pokud je dostupná technika, je poměrně snadné skenovat i živé jedince. V různých oborech jsou častí měřeny kraniometrické údaje digitalizovaných jedinců. Při využití pro replikaci fosilií je

nutné, oproti metodám uvedeným v této práci, věnovat více času postprocessingu při digitální přípravě modelu – posuny úlomků prostorem, často nutnost domodelování velké části hmoty. Pokud je však tato péče věnována mohou být i tyto repliky velmi zajímavým komparativním materiálem pro mnoho studií. O využití v ekologii pak mluví například Behm et al. (2018), kdy jsou vytištěné repliky celých těl používány například jako levnější a ekologičtější varianta návnady pro predátory při etologických studiích. Mezi výhody digitalizace patří neinvazivnost, nižší časová náročnost než u tradičních metod a neomezená možnost manipulace s virtuálními daty.

Významným využitím digitalizovaných dat je i vytváření databází s těmito skeny, buď přístupnými pouze vědecké obci nebo i široké veřejnosti. Jedním z nejvýraznějších projektů na této bázi je projekt The openVertebrate (oVert), o kterém píše například Blackburn et al. (2024). V rámci toho projektu bylo naskenováno na CT tisíce exemplářů a tato digitalizovaná data jsou volně přístupná na jeho stránkách.

Myslím si, že by využití replik mohlo být užitečným nástrojem při výuce ve všech stupních vzdělávání. Věřím, že na základním stupni, by výtisky mohly být užitečnou pomůckou pro vzbuzení zájmu žáků o přírodovědné předměty i názornější ukázky vyučovaných témat. Stejně tak by mohly být přínosem i v nejvyšších stupních vzdělávání při výuce například mediků či studentů veterinárních oborů, kteří by na replikách mohli pozorovat konkrétní struktury či patologie a při použití více typů preparátů (tisk, plastinát, kapalinový exemplář) lépe navnímat celkovou anatomii zkoumaného vzorku.

Pro další výzkum by mi přišlo zajímavé zaměřit se jen na preparáty skenované v nádobách a jejich postprocessing pro replikování, jelikož staré exempláře často nelze z nádob vyjmout bez poškození. Získání jejich digitálních modelů, případně replik, by tedy mohlo být významné, zejména u druhů, které již nejsou dostupné v jiné formě. Dalším zajímavým námětem by mohla být následná úprava výtisků, aby působily přirozeněji – například použití různých materiálů a tiskových postupů (hmotnost, křehkost) či možnosti dobarvení výtisku.

Zajímavým výstupem by mohlo být i zobrazení a replikace orgánových soustav společně s replikací kostry. Pro tento postup by však pravděpodobně vždy bylo nutné exemplář vyjmout z fixační tekutiny, aby nedocházelo ke splývání obrazu měkké tkáně s fixační tekutinou.

8 Literatura

1. ABOU-MADI, N., SCRIVANI, P. V., KOLLIAS, G. V., HERNANDEZ-DIVERS, S. M. (2004). Diagnosis of skeletal injuries in Chelonians using computed tomography. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35(2), 226–231. doi:10.1638/03-024
2. ALTMANN, A. Přírodniny ve vyučování přírodopisu a biologii : příručka pro posl. pedagog. a přírodověd. fakult. Státní pedagogické nakladatelství, 1966.
3. BARKER, D. G., BARKER, T. M., DAVIS, M. A. a SCHUETT, G. W. A review of the systematics and taxonomy of Pythonidae: an ancient serpent lineage. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2015, 157(1), 1-19. ISSN 1096-3642.
4. BEHM, J. E., WAITE, B. R., HSIEH, S. T. a HELMUS, M. R. Benefits and limitations of three-dimensional printing technology for ecological research. Online. *BMC Ecology*. 2018, roč. 18, č. 1. ISSN 1472-6785. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12898-018-0190-z>. [cit. 2024-04-01].
5. BLACKBURN, D. C., BOYER, D. M., GRAY, J. A., WINCHESTER, J., BATES, J. M. et al. Increasing the impact of vertebrate scientific collections through 3D imaging: The openVertebrate (oVert) Thematic Collections Network. Online. *BioScience*. 2024, roč. 74, č. 3, s. 169-186. ISSN 0006-3568. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/biosci/biad120>. [cit. 2024-04-01].
6. BRACHTL, M. Fixace biologických vzorků. Brno, 2012. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. 2015.
7. CHHEM, R.K.; WOO, J.K.H.; PAKKIRI, P.; STEWART, E.; ROMAGNOLI, C. et al. CT imaging of wet specimens from a pathology museum: How to build a “virtual museum” for radiopathological correlation teaching. Online. *HOMO*. 2006, roč. 57, č. 3, s. 201-208. ISSN 0018442X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchb.2006.03.003>. [cit. 2024-04-01]
8. DI IANNI, F.; VOLTA, A.; PELIZZONE, I.; MANFREDI, S.; GNUDI, G. et al. DIAGNOSTIC SENSITIVITY OF ULTRASOUND, RADIOGRAPHY AND COMPUTED TOMOGRAPHY FOR GENDER DETERMINATION IN FOUR SPECIES OF LIZARDS. Online. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2015,

- roč. 56, č. 1, s. 40-45. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/vru.12186>. [cit. 2024-03-23].
9. ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA, INC. Softshell turtle. Britannica [online]. 2024 [cit. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/animal/softshell-turtle>
 10. FAKULTA LESNICKÁ A DŘEVAŘSKÁ. 3D scanner ATOS Compact Scan 12M Essential Line: Tiskárna Stratasys F370. In: Fakulta lesnická a dřevařská [online]. 2021 [cit. 2024-03-02]. Dostupné z: <https://www.fld.czu.cz/cs/r-6826-veda-a-vyzkum/r-18133-vyzkumny-profil-fld/r-18140-pristrojove-vybaveni/r-18818-3d-tiskarny-skener/3-d-scanner-atos-3-d-tiskarna-stratasys-f-370-sca-3600-oryx.html>
 11. FAKULTA STROJNÍ ČVUT PRAHA (a). FDM. Fakulta strojní ČVUT Praha [online]. © 2014-2024 [cit. 2024-03-26]. Dostupné z: <https://www.fs.cvut.cz/ostatni/sekce-3dtisk/3dtisk/moznosti-3dtisk/rozdeleni-technologie-3dtisk/sla-3dtisk/>
 12. FAKULTA STROJNÍ ČVUT PRAHA (b). SLS. Fakulta strojní ČVUT Praha [online]. © 2014-2024 [cit. 2024-03-26]. Dostupné z: <https://www.fs.cvut.cz/ostatni/sekce-3dtisk/3dtisk/moznosti-3dtisk/rozdeleni-technologie-3dtisk/fdm-3dtisk/>
 13. FAKULTA STROJNÍ ČVUT PRAHA (c). SLA. Fakulta strojní ČVUT Praha [online]. © 2014-2024 [cit. 2024-03-26]. Dostupné z: <https://www.fs.cvut.cz/ostatni/sekce-3dtisk/3dtisk/moznosti-3dtisk/rozdeleni-technologie-3dtisk/sls-3dtisk/>
 14. FDM Printers and Materials. Online. In: © Stratasys. 2016. Dostupné z: <https://www.stratasys.com/siteassets/fdm-system/fdm-3d-printers-materials-spec-sheet.pdf>. [cit. 2024-02-07].
 15. FERDA, J., BAXA, J., FERDOVÁ, E., KREUZBERG, B. (2010). *CT s Duálními Energii Záření: Zobrazení Muskuloskeletálního Systému*. Česká Radiol. 64, 37–43.
 16. FROHWERK, E.; DÜRR, A. R.; FIEBICH, M.; ZOELLER, N. a MAHNKEN, A. H. Radiology meets archaeology: digital restoration and 3D printing using CT data. Online. 2023. Dostupné z: <https://doi.org/DOI10.1055/a-2206-5741>. [cit. 2024-03-23].

17. GAISLER, J., ZIMA, J. *Zoologie obratlovců*. 2. vyd. Praha: Academia, 2007. ISBN 978-80-200-1484-9.
18. FRIŠHONS, J., KRAJSA, J., KOČÍ, T. Zoologické preparáty pro výuku přírodovědy, přírodopisu a biologie 1. Tekutinové preparáty. *Živa*. 2017, (4), 99-101. ISSN 0044-4812.
19. GARAS, M., VACCAREZZA, M., NEWLAND, G., MCVAY-DOORNBUSCH, K., a HASANI, J. 3D-Printed specimens as a valuable tool in anatomy education: A pilot study. Online. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 2018, roč. 219, s. 57-64. ISSN 09409602. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.05.006>. [cit. 2024-04-01].
20. GOTTE, S. W.; JACOBS, J. F. a ZUG, G. Preserving reptiles for research: A Handbook of Techniques. Online. *Reptile Ecology and Conservation*. 2016, s. 77-86. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198726135.003.0006>. [cit. 2024-03-23].
21. GUMPENBERGER, M., HENNINGER, W. (2001). The use of computed tomography in avian and reptile medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10(4), 174–180. doi:10.1053/saep.2001.24674
22. HEDGES, S. B. a KUMAR, S. *The timetree of life*. New York: Oxford University Press, 2009. ISBN 0199535035.
23. KHAN, M. S. COLLECTION AND PRESERVATION OF AMPHIBIANS AND REPTILES FOR SCIENTIFIC STUDY. Online. Herpetological Laboratory 306 N. Morton Avenue, 1996. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Muhammad-Khan-426/publication/281455851_collection_and_preservation_of_amphibians_and_reptiles/links/55e8e2b908ae21d099c2dc4b/collection-and-preservation-of-amphibians-and-reptiles.pdf. [cit. 2024-03-23].
24. KLEINTEICH, T., STOCK, S. R., BECKMANN, F., HERZEN, J., SUMMERS, A. P. et al. Applying x-ray tomography in the field of vertebrate biology: form, function, and evolution of the skull of caecilians (Lissamphibia). Online. In: . 70780D-. Dostupné z: <https://doi.org/10.1117/12.795063>. [cit. 2024-04-01].

25. KLIMEŠ, J., ŠIROKÝ, P., SYCHRA, O., DOLEJSKÁ, M. BÁRTOVÁ, E., LITERÁK, I., NAVRÁTIL, S. a PALÍKOVÁ, M. Zoologie pro bakaláře: skripta. 2013.
26. KYMPLOVÁ, J. *Katalog metod v biofyzice* [online]. 2008 [cit. 2023-07-09]. Dostupné z: <https://portal.lf1.cuni.cz/clanek-793-katalog-metod-v-biofyzice>
27. LEMIERRE, A., FOLIE, A., BAILON, S., ROBIN, N. a LAURIN, M. From toad to frog, a CT-based reconsideration of *Bufo servatus*, an Eocene anuran mummy from Quercy (France). Online. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 2021, roč. 41, č. 3. ISSN 0272-4634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/02724634.2021.1989694>. [cit. 2024-04-01].
28. LYNNERUP, N., HJALGRIM, H., NIELSEN, L. R., GREGERSEN, H., THUESEN, I. (1997). Non-invasive Archaeology of Skeletal Material by CT Scanning and Three-dimensional Reconstruction. *International Journal of Osteoarchaeology*, 7(1), 91–94. doi:10.1002/(sici)1099-1212(199701)7:1<91::aid-oa309>3.0.co;2-t
29. MACKEY, E. B., HERNANDEZ-DIVERS, S. J., HOLAND, M. a FRANK, P. Clinical technique: Application of computed tomography in zoological medicine. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2008, 17(3), 198-209. doi: 10.1053/j.jepm.2008.05.007
30. MANZANO, Bruce L.; MEANS, Bernard K.; BEGLEY, Christopher T. a ZECHINI, Mariana. Using Digital 3D Scanning to Create “Artifictions” of the Passenger Pigeon and Harelip Sucker, Two Extinct Species in Eastern North America: The Future Examines the Past. Online. *Ethnobiology Letters*. 2015, roč. 6, č. 2, s. 232-241. ISSN 2159-8126. Dostupné z: <https://doi.org/10.14237/ebl.6.2.2015.368>. [cit. 2024-04-01].
31. MOUREK, J., LIŠKOVÁ, E. *Biologické sbírky – metody sběru, preparace a uchovávání: příručka k projektu Alma Mater Studiorum*. Praha: UK v Praze, Pedagogická fakulta, 2010. ISBN 978-80-7290-450-1.
32. NEWTON, A. H.; SPOUTIL, F. PROCHAZKA, J. BLACK, J. R., MEDLOCK, K. et al. Letting the ‘cat’ out of the bag: pouch young development of the extinct Tasmanian tiger revealed by X-ray computed tomography. Online. *Royal Society Open Science*. 2018, roč. 5, č. 2. ISSN 2054-5703. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsos.171914>. [cit. 2024-04-01].

33. ORYX ADDITIVE, INC. Sca3600. Online. Oryx additive. Dostupné z: <https://www.oryxadditive.com/products/sca3600>. [cit. 2024-03-12].
34. PAPÁČEK, M., MATĚNOVÁ, V., MATĚNA, J. a SOLDÁN, T. Zoologie. 3. upr. vyd. Praha: Scientia, 2000. ISBN 80-718-3203-0.
35. PORRO, L. B. a RICHARDS, Ch. T. Digital dissection of the model organism *Xenopus laevis* using contrast-enhanced computed tomography. Online. Journal of Anatomy. 2017, roč. 231, č. 2, s. 169-191. ISSN 0021-8782. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/joa.12625>. [cit. 2024-04-01].
36. PUBCHEM. COMPOUND SUMMARY Ethanol. Online. PubChem. 2023. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>. [cit. 2024-02-09].
37. PUBCHEM. COMPOUND SUMMARY Formaldehyde. Online. PubChem. 2023. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Formaldehyde>. [cit. 2024-02-09].
38. PRUSA RESEARCH A.S. Prusa Tabulka Materiálů. Online. Prusa Research. Dostupné z: <https://help.prusa3d.com/cs/materials>. [cit. 2024-03-23].
39. SANCHEZ, S., de PLOËG, G., CLÉMENT, G., & AHLBERG, P. E. (2010). A new tool for determining degrees of mineralization in fossil amphibian skeletons: The example of the Late Palaeozoic branchiosaurid *Apaton* from the Autun Basin, France. *Comptes Rendus Palevol*, 9(6-7), 311–317. doi:10.1016/j.crpv.2010.07.004
40. SAVINI, A. a SAVINI, G.G. A short history of 3D printing, a technological revolution just started. Online. In: *2015 ICOHTEC/IEEE International History of High-Technologies and their Socio-Cultural Contexts Conference (HISTELCON)*. IEEE, 2015, s. 1-8. ISBN 978-1-5090-0065-4. Dostupné z: <https://doi.org/10.1109/HISTELCON.2015.7307314>. [cit. 2024-03-31].
41. SCHOCH, R. R. Amphibian Evolution: The Life of Early Land Vertebrates. Wiley-Blackwell, 2014. ISBN 978-0-470-67178-8.
42. SCULPTEO. The history of 3d printer: from rapid prototyping to additive fabrication. *Sculpteo*. [online]. France: Capucine Lonjon, 2017 [cit. 2023-08-29]. Dostupné z: <https://www.sculpteo.com/blog/2017/03/01/whos-behind-the-three-main-3d-printing-technologies/>

43. SIEMENS HEALTHINEERS. SOMATOM Scope. SIEMENS MEDICAL SOLUTIONS USA, INC. ©2024. Siemens Healthineers [online]. 2024 [cit. 2024-01-20]. Dostupné z: <https://www.siemens-healthineers.com/en-us/computed-tomography/ecoline-refurbished-systems/somatom-scope>
44. STŘÍTESKÝ, O., PRŮŠA, J. a BACH, M. Základy 3D tisku s Josefem Průšou [online]. Praha: Petr Memory Dragoun, 2019, 62 s. [cit. 2024-03-21]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/ped/jaro2021/TI9009/111101390/zaklady-3d-tisku.pdf>
45. SUES, H. D. The Rise of Reptiles. Johns Hopkins University Press, 2019. ISBN 9781421428673.
46. ŠTĚPÁNEK, O. *Moderní preparace přírodnin*. Olomouc: R. Promberger, 1938.
47. VERHOEF, Esther. Encyklopedie volně žijících zvířat. Přeložil Ruben PELLAR. Dobřejovice: Rebo, 2001. ISBN 80-7234-213-4.
48. WARDEH, A. Brief Introduction to Imaging Methods. In: Ústav anatomie 2. lékařská fakulta Univerzita Karlova [online]. 2016 [cit. 2024-03-02]. Dostupné z: https://anatomie.lf2.cuni.cz/files/page/files/2020/introduction_to_imaging_methods.pdf
49. YASUKAWA, Y., HIKIDA, T. a HIRAYAMA, R. Phylogenetic Relationships of Geoemydine Turtles (Reptilia: Bataguridae). *Current herpetology*. 2001, 20(2), 105-133.