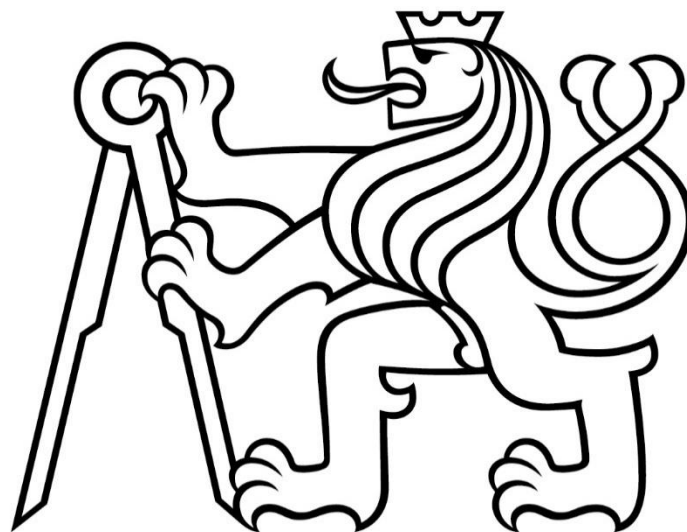


ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA STROJNÍ

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Hodnocení mechanických vlastností femurů v ohybu a šlach v tahu
u zvířecího modelu potkana

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Torkoniak** Jméno: **Mikuláš** Osobní číslo: **491520**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Teoretický základ strojního inženýrství**
Studijní obor: **bez oboru**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Hodnocení mechanických vlastností femurů v ohybu a šlach v tahu u zvířecího modelu potkana

Název bakalářské práce anglicky:

Evaluation of Mechanical Properties of Femurs in Bending and Tendons in Tension Using an Animal Model of a Rat

Pokyny pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na téma kostní tkáň, šlachy a jejich vlastnosti, způsob jejich zatěžování v těle.
2. Navrhněte metodiku pro analýzu mechanických vlastností potkaních femurů v ohybu a potkaních šlach v tahu.
3. Realizujte navržené experimenty a analyzujte mechanické vlastnosti kostí a šlach.
4. Zpracujte a interpretujte získané výsledky, formulujte závěry.

Seznam doporučené literatury:

1. ČIHÁK, Radomír. Anatomie. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-3817-8.
2. CURREY, JD 2006, Bones : Structure and Mechanics, Princeton University Press, Princeton. Available from: ProQuest Ebook Central.
3. MACHOVA URDZIKOVA, Lucia, Radek SEDLACEK, Tomas SUCHY, et al. Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat. BioMedical Engineering OnLine. 2014, 13(1). ISSN 1475-925X. Dostupné z: doi:10.1186/1475-925X-13-42
4. BROULÍK, P.D., J. ROSENKRANCOVÁ, P. RŮŽIČKA, R. SEDLÁČEK a T. ZÍMA. The Effect of Chronic Alcohol Administration on Bone Mineral Content and Bone Strength in Male Rats. Physiological Research. 599-604. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.931799

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Kristýna Kubášová odbor biomechaniky FS

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

Ing. Radek Sedláček, Ph.D. odbor biomechaniky FS

Datum zadání bakalářské práce: **12.04.2022** Termín odevzdání bakalářské práce: **14.08.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: _____

Ing. Kristýna Kubášová
podpis vedoucí(ho) práce

prof. Ing. Michael Valášek, DrSc.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

doc. Ing. Miroslav Španiel, CSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student bere na vědomí, že je povinen vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

Datum převzetí zadání

Podpis studenta

Anotační list

Autor: Mikuláš Torkoniak

Název práce: Hodnocení mechanických vlastností femurů v ohybu a šlach v tahu u zvířecího modelu potkana

Title of the thesis: Evaluation of Mechanical Properties of Femurs in Bending and Tendons in Tension using an Animal model of a Rat

Akademický rok: 2021/2022

Zadávací ústav: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

Studijní program: Teoretický základ strojního inženýrství

Studijní obor: bez oboru

Vedoucí práce: Ing. Kristýna Kubášová

Konzultant: Ing. Radek Sedláček, Ph.D.

Bibliografické údaje:	počet stran	53
	počet obrázků	43
	počet tabulek	14

Klíčová slova: mechanické vlastnosti, potkaní femur, potkaní šlacha, 4MU

Keywords: mechanical properties, rat femur, rat tendon, 4MU

Anotace: Cílem této práce je srovnat mechanické vlastnosti potkaních femurů a Achillových šlach po léčbě míšního poranění. Metodika testu se skládá z tříbodového ohybu femurů a tahové zkoušky šlach. Celkem bylo testováno 56 kostí a 58 šlach z 29 zvířat. Analýza srovnávala vyhodnocené parametry u čtyř skupin. Dvě skupiny potkanů byly léčeny inhibátorem perineuronálních sítí (4MU) zbylé dvě nebyly a sloužily jako kontrolní vzorky. Vyhodnocená data byla statisticky analyzována.

Abstract: The aim of this work is to compare the mechanical properties of the femurs and Achilles's tendons of rats after spinal cord injury treatment. The methodology of the experiment consists of a three-point bending test of femurs and tensile test of tendons. A total of 56 femurs and 58 tendons from 29 animals were tested. The analysis compared parameters evaluated from measurements of four groups of rats. Two of them were treated with perineuronal nets inhibitor (4MU) and the other two were untreated. The evaluated data were statistically analysed.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím citované literatury, jejíž seznam je uveden na jejím konci.

V Praze dne 1. 8. 2022

.....

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Kristýně Kubášové za velmi potřebnou pomoc všeho druhu a neuvěřitelnou pečlivost při kontrolách. Děkuji také panu Ing. Radku Sedláčkovi, Ph.D. za odbornou konzultaci, realizaci experimentů a možnost se jich zúčastnit. V neposlední řadě musím poděkovat kolegům Eduardu Černému, Miroslavu Říhovi a Matěji Mašatovi za mé setrvání na vysoké škole.

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Úvod	8
Teoretická část	9
1. Kosti	9
1.1. Mechanické vlastnosti	10
1.2. Napětí a deformace	11
1.3. Mechanické testy	13
1.3.1. Vybavení	13
1.3.2. Příprava vzorku	13
1.3.3. Metody testování	14
2. Šlachy	17
2.1. Mechanické vlastnosti	17
2.2. Reakce na mechanické zatěžování	19
2.3. Mechanické testy	20
2.3.1. Neinvazivní metody	20
2.3.2. Invazivní metody	21
Experimentální část	23
1. Hypotéza	23
2. Vzorky	23
3. Kosti	25
3.1. Metodika experimentu	25
3.1.1. Postup zkoušky	25
3.1.2. Vyhodnocované parametry	25
3.2. Metodika statistického vyhodnocení	28
3.3. Realizace experimentu	29
3.3.1. Princip	29

3.3.2.	Použitá zařízení.....	29
3.3.3.	Průběh zkoušky.....	30
3.4.	Výsledky.....	32
3.4.1.	Maximální síla	32
3.4.2.	Maximální ohybový moment.....	33
3.4.3.	Maximální ohybové napětí	34
3.4.4.	Tuhost vzorku	35
3.4.5.	Deformační energie.....	36
4.	Šluchy	37
4.1.	Metodika experimentu.....	37
4.1.1.	Postup zkoušky	37
4.1.2.	Vyhodnocované parametry	37
4.2.	Metodika statistického vyhodnocení.....	39
4.3.	Realizace experimentu	39
4.3.1.	Princip.....	39
4.3.2.	Použitá zařízení.....	40
4.3.3.	Průběh zkoušky.....	40
4.4.	Výsledky.....	43
4.4.1.	Maximální naměřená síla.....	43
4.4.2.	Maximální tahové napětí	44
4.4.3.	Tuhost	45
4.4.4.	Modul pružnosti v 5 % deformace.....	46
5.	Závěr.....	47
6.	Zdroje	48
7.	Seznam obrázků.....	50
8.	Seznam tabulek.....	52

Seznam použitých zkratek

<i>A</i>	[mm]	Hlavní osa vnější elipsy
<i>a</i>	[mm]	Hlavní osa vnitřní elipsy
<i>B</i>	[mm]	Vedlejší osa vnější elipsy
<i>b</i>	[mm]	Vedlejší osa vnitřní elipsy
<i>E</i>	[MPa]	Youngův modul pružnosti
<i>F</i>	[N]	Síla
<i>F_{max}</i>	[N]	Maximální naměřená síla
<i>l</i>	[mm]	Vzdálenost mezi podporami
<i>M_{omax}</i>	[N·mm]	Maximální ohybový moment
<i>p</i>	[mm]	Posuv
<i>S</i>	[N·mm⁻¹]	Tuhost
<i>t</i>	[mm]	Tloušťka stěny
<i>U</i>	[mJ]	Deformační energie
<i>W_o</i>	[mm³]	Průřezový modul v ohybu
<i>σ_{max}</i>	[MPa]	Maximální napětí v tahu
<i>σ_{omax}</i>	[MPa]	Maximální ohybové napětí
4MU		4-Methylumbelliferone
CT		Micro-computed tomography (výpočetní tomografie)
DEXA		Dual energy x-ray absorptiometry
MKP		Metoda konečných prvků
MRI		Magnetic resonance imaging (magnetická rezonance)
PNS		Perineuronální síť
SD		Standard deviation (směrodatná odchylka)

Úvod

Moderní medicína urazila v průběhu let dlouhou cestu a zažila velmi rychlou evoluci. I když dnešní medicína dokáže věci dříve nemyslitelné, stále se setkáváme s případy, na které nestačí. Jedním z těchto případů je poranění míchy. Naprostá většina míšních poranění je nevléčitelná a může vyústit ve ztrátu motorických funkcí. Pacienti se s následky potýkají do konce života.

V posledních několika letech probíhá výzkum látky 4-Methylumbelliferone (4MU), která by mohla vyřešit problém s regenerací míchy. Po přerušení spojení mezi neurony v důsledku zranění se toto místo obalí perineuronálními sítěmi (PNS). PNS mají za úkol zapouzdřit a ochránit poraněné neurony. Bohužel tato bariéra zamezí zpětnému obnovení neuronových spojení nebo navázání spojení nových. 4MU inhibuje syntézu hyaluronu, což je základní stavební kámen PNS, a tudíž znemožňuje tvorbu PNS. Bez PNS se otevře okno regenerace a neurony se mohou volně navázat [1].

Cílem této práce je porovnat mechanické vlastnosti stehenních kostí (femurů) a Achillových šlach potkanů po míšním poranění. Vyhodnocovalo se několik parametrů z tříbodového ohybu femurů (maximální síla, maximální ohybové napětí, tuhost a deformační energie) a tahové zkoušky u šlach (maximální naměřená síla, tahové napětí, tuhost a modul pružnosti v 5 % deformace). Celkem bylo testováno 56 kostí a 58 šlach z 29 zvířat. Byly porovnávány mechanické vlastnosti vzorků z potkanů, kterým bylo podáno léčivo 4MU s těmi, kteří léčeni nebyly, bylo jim podáváno placebo.

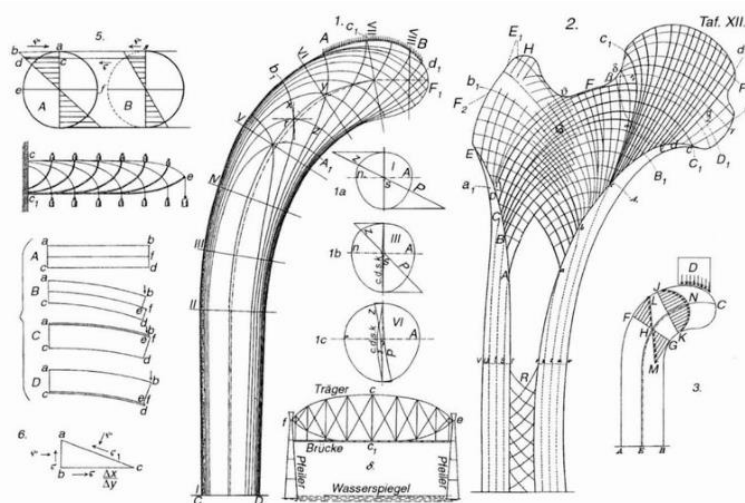
Teoretická část

1. Kosti

Primární funkce kosti, jakožto neustále se měnící tkáně, je mechanická opora pro svalovou aktivitu, což zajišťuje ochranu orgánů a měkkých tkání. Pro tělo jsou kosti zásobárnou důležitých minerálů a přispívají k jejich rovnováze. Výsledná kosterní struktura je ovlivněna mechanickými zásadami, které jsou jak omezeními, tak i hnací silou pro vytvoření jejich architektury. Právě vztah formy a funkce ovlivňuje architekturu kostí během její evoluce. Díky této schopnosti se kostry všech živočichů dokázaly v průběhu let přizpůsobit různým životním podmínkám [2].

Už Galileo zjistil, že vnitřní struktura kostí není organizována pouze normálním zatížením, ale je také ovlivněna ontogenezí samotnou, při které jsou kosti zatěžovány každodenním pohybem. Z tohoto vyplývá, že je kostra evolučně adaptována a zároveň je schopná se přetvořit na základě změn v každodenní aktivitě. Vztah struktury a funkce mezi kostí a mechanickou zátěží byl poprvé popsán v devatenáctém století a je znám jako Wolffův zákon (viz Obrázek 1). Wolff stanovil, že trámčové struktury v kosti reagují na zatížení změnou jejich strukturní konfigurace během života daného jedince [2].

Abychom mohli porozumět pohybu kostry nebo jak kost zareaguje například na náraz, musíme si uvědomit, že mechanické vlastnosti kostí určují kosterní odpovědi na fyziologickou a mechanickou zátěž [2].



Obrázek 1 – Ukázka Wolffova zákona. Lze vidět, že se trámčové elementy tvoří ve směru zatěžování [3]

1.1. Mechanické vlastnosti

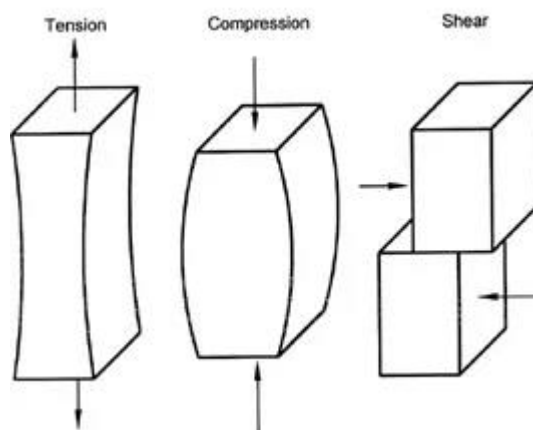
K testům mechanických vlastností musíme přistupovat ze dvou hladin. Je za potřebí odlišit, jestli děláme test materiálu nebo struktury kosti. Měli bychom brát v potaz směr trámek a mechanické zkoušky této skutečnosti přizpůsobit, abychom dosáhli co nejpodobnějšímu zatěžování *in vivo*. U komparativního testování je důležité dodržet stejný směr pro všechny vzorky. Při testování celých kostí bereme v potaz jejich strukturu a geometrii. Reakce kosti na síly *in vivo* může být pozorována na malých úsecích kosti (pro materiálové vlastnosti) nebo na celých kostech (pro strukturní vlastnosti) [2].

Stanovit mechanické vlastnosti lze na základě různých technik od neinvazivního snímkování přes mechanické zkoušky vyňatých vzorků částí kostí *in vitro* až po celé kosti. Přesnost jakéhokoli výsledku snímkování je velmi závislá na extrapolaci dat struktury kosti, která je proměnlivá a závislá na zatížení *in vivo*. Pomocí dnešních zobrazovacích metod jako je CT (Computed tomography) nebo MRI (magnetic resonance imaging) a modelů za použití MKP (metoda konečných prvků) lze dosáhnout mnohem přesnějších výsledků. Vibrační analýza, ultrazvukové vlny nebo DEXA (dual-energy x-ray absorptiometry) stanoví materiálové vlastnosti. Oproti tomu MRI, CT a MKP pracují s 3D modelem a určují strukturní vlastnosti kostí [2].

Během mechanických testů kostí je občas nejasné, kde je hranice mezi materiálem a strukturou. Je důležité rozlišit kosti spongiózní (trabekulární) a kortikální. Pokud je testována malá krychle vyňatá z obratle, je považována za tkáň (stejně vlastnosti ve všech směrech). I při sebemenší velikosti vzorku se mohou vlastnosti trámek projevit při určité orientaci vzorku během testů. Tudíž je možné, že vlastnosti, které byly přisuzovány tkáni, jsou vlastnostmi struktury kosti. Mechanické vlastnosti se budou měnit v závislosti na rozlišení testu. Například páteřní obratle podléhají creepu, což znamená, že deformace se zvětšuje, aniž by se zvětšovalo zatížení. Během creepu je možné pozorovat selhání jednotlivých trámčových elementů kosti, které mají průběh deformace spíše elastický. Tento jev je evidentní při frakturách kostí, když to, co se zdá být strukturním selháním, musí být doprovázeno selháním na tkáňové hladině. Fraktura je selháním na obou hladinách [2].

1.2. Napětí a deformace

Koncept napětí a deformace je pro mechaniku kosti naprosto zásadní. Napětí můžeme definovat jako sílu na danou plochu, takže má jednotku $\text{N/m}^2 = \text{Pa}$. Napětí může být v tlaku, v tahu nebo ve smyku (viz Obrázek 2). Ve většině případů se setkáváme s kombinací těchto tří druhů napětí. I při tlakovém zatížení se objeví napětí ve smyku pod 45° . Smyk je konečným selháním pro většinu materiálů [4] [5].

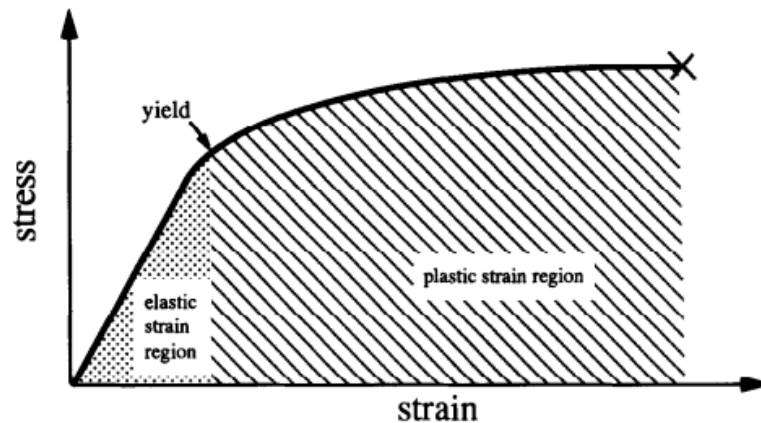


Obrázek 2 – Zleva: tah, tlak, smyk [6]

Poměrná (relativní) deformace je definována jako procentuální změna v daném rozměru. Pokud je materiál natažen na 101 % svojí původní délky, poměrná deformace má hodnotu 0,01 neboli 1 %. Pokud je kost deformována v délce, mění se i její šířka. Poměr těchto deformací se nazývá Poissonovo číslo. Kortikální kost má Poissonovo číslo od 0,28 do 0,45, což znamená, že 1 % deformace v axiálním směru vyvolá 0,28% až 0,45% deformaci ve směru radiálním [4] [5].

Průběh diagramu napětí v závislosti na deformaci (viz Obrázek 3), také známý jako pracovní diagram, může být rozdělen na dvě oblasti. V první oblasti je elastická deformace a v druhé je deformace plastická. Elastická deformace není trvalá, kost můžeme v této části teoreticky přirovnat k pružině, je zde lineární závislost mezi napětím a deformací. Po odlehčení se kost vrací do svých původních rozměrů. Ve skutečnosti se kost nechová jako ideální pružina. Uvnitř kosterní matice jsou tekutiny, které disipují část energie vynaložené na deformaci. V další oblasti diagramu není přirovnání k pružině úplně přesné, protože kost je křehký materiál a charakteristickou plastickou deformací je křehký lom, který se u pružiny nevyskytne. Sklon křivky v elastické části pracovního diagramu je znám jako Youngův

modul pružnosti a popisuje vnitřní pevnost materiálu. Sklon křivky v lineární oblasti diagramu síla-posuv reprezentuje tuhost kosti. Větší kosti mají obecně vyšší tuhost. Pokud porovnáme kosti sumo zápasníka a gymnastky, tak kosti zápasníka budou mít mnohem vyšší tuhost, ale Youngův modul pružnosti mají téměř stejný jako kosti gymnastky, protože se jedná a totožný materiál [4].



Obrázek 3 – Diagram závislosti relativní deformace (x) na napětí (y) [4]

Bod, který rozděluje pracovní diagram na elastickou a plastickou část, se nazývá mez kluzu (yield). Mez kluzu je mez, za kterou je deformace plastická neboli trvalá. Plastická deformace může vznikat smykem na hranici cementových zrn, trámčovými mikrofrakturami, růstem prasklin anebo kombinace předešlých. Protože kost není příliš houževnatý materiál, tak za mezí kluzu už mnoho napětí nevydrží. Plocha pod křivkou diagramu napětí a poměrné deformace je deformační energie. Deformační energie je energie potřebná k porušení kosti, pokud diagram končí v selhání. Deformační energie je ekvivalent houževnatosti. Čím je kost houževnatější, tím je menší riziko fraktur. S věkem houževnatost klesá [4] [5].

Youngův modul lze také určit ultrazvukovými vlnami, protože je závislý na rychlosti šíření zvuku v materiálu a jeho hustotě: $V = \sqrt{E / \rho}$. Bohužel lze tuto metodu použít hlavně pro izotropní materiály, takže nelze s velkou přesností použít pro spongiózní kost. Výhoda ultrazvuku je, že se dá v některých případech použít *in vivo* a za pomoci mnohem složitějších rovnic lze dosáhnout přesnějších hodnot [4] [5].

U spongiózní kosti je pevnost velmi špatně definovatelná. Vzhledem k tomu, že je tvořena jednotlivými trámci, tak u ní můžeme definovat dvě různé pevnosti: pevnost jednotlivého trámce, což je materiálová pevnost, a strukturální pevnost pospojovaných trámců jako celku. Častěji se měří strukturální pevnost, protože u jednotlivých trámců je to velmi

obtížné. Strukturální vlastnosti jsou závislé na oblasti kosti a její hustotě a orientaci trámčů, což je anatomicky podmíněná veličina [4] [5].

Uvnitř kosti, jako i v jiných biologických materiálech, můžeme mluvit o anizotropním chování. Kvůli této vlastnosti se Youngův modul mění v závislosti na směru. Například v podélném směru ve středu (diafýza) dlouhé kosti má Youngův modul hodnotu 17 Gpa a ve směru příčném 12 Gpa. [4] [5]

1.3. Mechanické testy

1.3.1. Vybavení

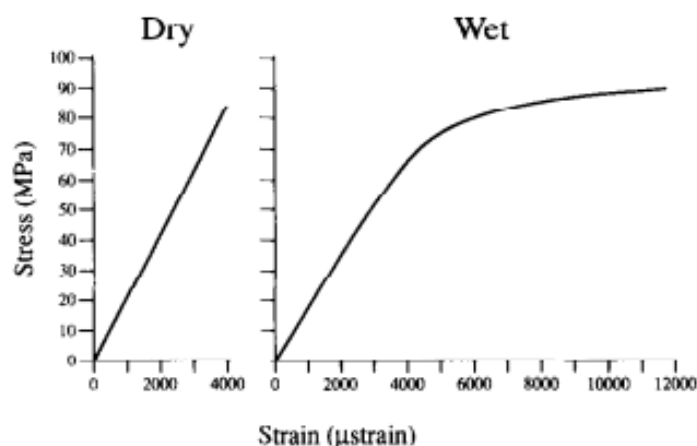
Mezi základní vybavení pro realizaci mechanických testů kostí patří mechanický testovací stroj, siloměry a systém zaznamenávající naměřená data. Testovací stroje mohou fungovat na principu pohybového šroubu, mohou být pneumatické, ale nejuniverzálnější jsou hydraulické. Jejich velkou výhodou je přesné nastavení různých parametrů. Silové rozpětí se pohybuje od setin po desítky tisíc newtonů. Většina testovacích zařízení je multifunkční. Výměnou přípravku, senzorů nebo jiných doplňků lze stroj použít pro jiné mechanické testy. Výstupem ze systému je grafická závislost síly a posuvu v dané ose [4] [5].

1.3.2. Příprava vzorku

Mechanické vlastnosti kostí se mění v závislosti na druhu kosti, stáří kosti, anatomické lokaci a proměnných v testovacích podmínkách. Právě podmínky, ve kterých testy probíhají, jsou občas zanedbávány a přehlíženy. Velice důležité je skladování, hydratace a teplota vzorku. Autolýza tkáně začíná několik hodin po odebrání z těla a je pravděpodobné, že nepříznivě ovlivní mechanické vlastnosti kosti. Aby se předešlo degradaci vzorku je možné ho naložit do směsi ethanolu a solného roztoku, formaldehydu, ale nejvhodnější metodou je zmrazení při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [4] [5].

Hydratace kosti zapříčiňuje snížení Youngova modulu a pevnosti, ale zvýší její houževnatost. Suchá kost je křehčí než hydratovaná, takže absorbuje méně energie do selhání (viz Obrázek 4). Evans a Lebow (1952) dokázali 17% zvýšení Youngova modulu lidského femuru, 31% nárůst pevnosti v tahu, ale 55% snížení houževnatosti po vysušení.

Pro nejpřesnější výsledky je vhodné testovat kosti hydratované. Hydrataci vytvoříme podmínky blízké podmínkám *in vivo* [4] [5].



Obrázek 4 – Srovnání vysušené (vlevo) a hydratované (vpravo) kosti v diagramu napětí-deformace [4]

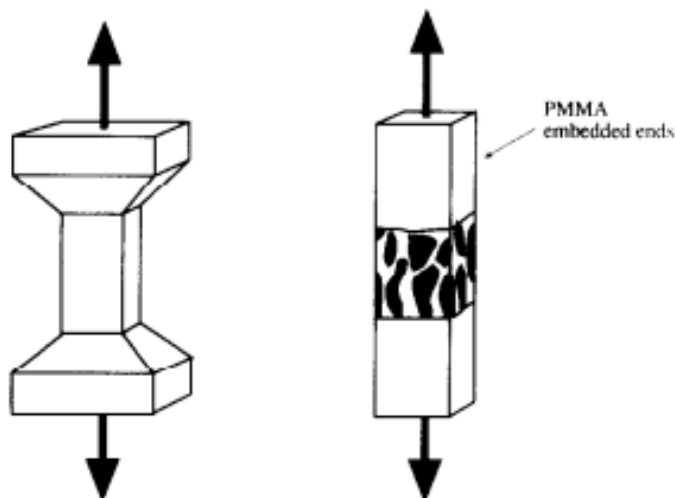
Teplota, ve které probíhá testování, je důležitá pro to, abychom napodobili podmínky v tělním prostředí. Pro přesné měření by teplota měla být 37 °C, ale to je ve většině případů nepraktické. Testy při pokojové teplotě (23 °C) zvyšují Youngův modul o 2–4 % v porovnání s testy ve 37 °C. Změna není velká, ale je za potřebí kontrolovat teplotu při měření a snažit se o srovnatelnost výsledků. Protože pro komparativní měření je důležité dodržet stejné podmínky [4].

1.3.3. Metody testování

Metody testování se ve velké části případů používají takové, aby při nich byly kosti zatěžovány podobným způsobem jako v těle. Struktura kosti je totiž velmi ovlivněna životem zvířete. Používá se více typů mechanických testů, ale nejčastěji zkouška tahová, tlaková a ohybová. Mezi další využívané typy zkoušek řadíme krut, microtesty (mechanické vlastnosti jednotlivých trámčů a vzorků kolem 200 μm), stříh, ultrazvukové testování nebo například únavové testy [4] [5].

Tahová zkouška může být jedním z nejpřesnějších testů pro určování vlastností kostí, ale vzorky musí být relativně velké a opatrně a precizně očištěné. Vzorky jsou vytvarovány tak, že většina deformace nastane uprostřed (viz Obrázek 5). Měření deformace může být pomocí extenzometru připojeného ke středu vzorku. Za předpokladu, že se během tahové zkoušky nevytvoří ohybový moment, získáme velmi přesná data o mechanických

vlastnostech kosti. Tahová zkouška se však příliš často nevyužívá, protože se tahové namáhání kostí v těle vyskytuje velice zřídka [4] [5].

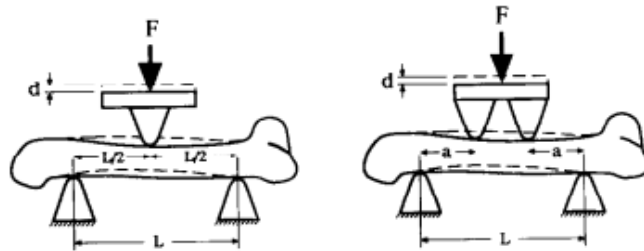


Obrázek 5 – Vzorky pro tahovou zkoušku kortikální kosti (vlevo) a spongiózní kosti (vpravo) [4]

Tlaková zkouška se používá pro spongiózní kosti, protože mohou být použity malé vzorky. Tlakové zkoušky bývají méně přesné než zkoušky tahové. Pokud je vzorek ve tvaru malé krychle a jeho strany nejsou rovnoběžné se zatěžovací deskou, tak vznikají koncentrace napětí, což vede k snížení jak Youngova modulu, tak i pevnosti. Měření deformace na začátku vzorku je nepřesné, protože trámce nejsou z jedné strany propojeny s ostatními, takže je deformace mnohem větší. Ve středu vzorku je přesnost měření deformace značně vyšší, proto se extenzometr připevňuje k prostřední části vzorku. I když je tlaková zkouška méně přesná než tahová, má řadu výhod. Vzorky mohou být menší, výroba vzorků není tak náročná a pro kosti, které jsou *in vivo* zatěžovány tlakem (páteřní obratle) lépe simulují jejich skutečné zatížení [4] [5].

Ohybová zkouška je praktická pro měření mechanických vlastností kostí hlodavců a dalších malých zvířat. Takto malé kosti je velmi náročné obrobřit do tvaru pro tahovou nebo tlakovou zkoušku. Během ohybové zkoušky je zatěžována celá kost až do selhání. Napětí v kosti lze spočítat rovnicí pro ohyb nosníku. Ohyb vytváří tahové a na opačné straně kosti i tlakové napětí. Ohybová zkouška může být realizována buď tříbodovým nebo čtyřbodovým ohybem (viz Obrázek 6). Výhoda čtyřbodového ohybu je minimalizování smykových napětí ve středu kosti oproti tříbodovému a mezi dvěma zatěžovacími body je konstantní ohybový moment. Bohužel je u čtyřbodového ohybu důležité, aby síly byly rovnoměrně rozloženy mezi oběma body zatěžování, což je téměř nemožné, protože se testují celé kosti a ty nemají dokonalý tvar jako obrobené vzorky. Zároveň se, v případě menších kostí, na celém vzorku

nenachází neovlivněná oblast, kde by se zamezilo vzniku smykových napětí. Z těchto důvodů se tříbodový ohyb používá častěji pro zjišťování mechanických vlastností kostí hlodavců. Pro testování větších kostí se dá použít přípravek s kloubem, aby se eliminovaly nepřesnosti způsobené zakřiveným povrchem kosti [4] [5].



Obrázek 6 – Tříbodový (nahore) a čtyřbodový (dole) ohyb [4]

2. Šlachy

Šlacha je jednoosá tkáň, která spojuje sval s kostí a slouží jako přenašeč svalem vytvořené síly. Následkem této síly je pohyb kolem kloubu, šlachy jsou tedy pasivní neelastické struktury schopné odolat velkým silám [7] [8].

Šlachy se skládají z vláken z kolagenních fibril, které tvoří hlavně kolagen I. typu. Vláknata společně s fibroblasty (základní buňka vazivové tkáně) (viz Obrázek 7) jsou organizována do svazků rovnoběžných s dlouhou osou šlachy a jsou spojena pláští z řídké vazivové tkáně, čímž tvoří šlachu (viz Obrázek 8). Šlachy jsou také tvořeny řadou nekolagenních proteinů, které jsou zastoupeny v malých množstvích, ale mají velký význam pro mechanické vlastnosti [7] [8] [9].



Obrázek 7 – Fibroblasty [9]

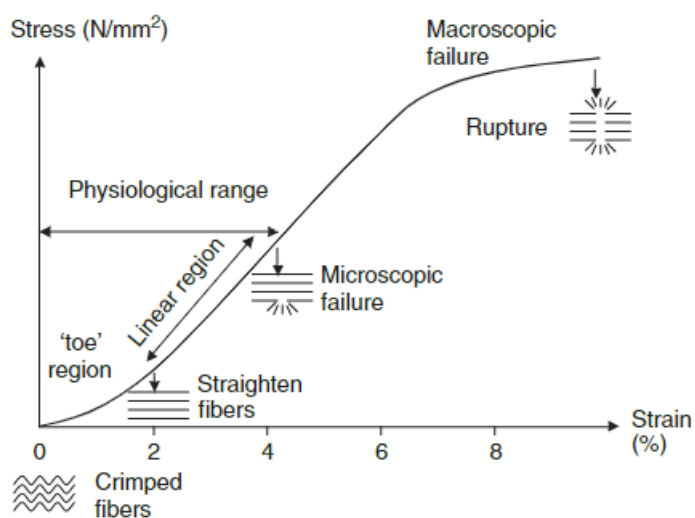


Obrázek 8 -Sstavba šlachy [9]

2.1. Mechanické vlastnosti

Pevnost a jiné mechanické vlastnosti většiny orgánů závisí na koncentraci a orientaci základního strukturního elementu, což je kolagen. Zastoupení a uspořádání kolagenových vláken v různých orgánech je velmi rozdílné. Může se pohybovat od několika procent s náhodným rozložením až po vysoká procenta (60 % hmotnosti šlach) s orientací v jednom směru v mohutných svazcích šlach. Například v kůži se setkáváme s ryze izotropním rozprostřením kolagenu, oproti tomu ve šlachách je rozložení kolagenu anizotropní, což má za následek velkou mechanickou pevnost pouze v jednom směru, a to ve směru os vláken [10] [11].

Šlachy *in vivo* jsou vystaveny dynamickému zatěžování, mají proto uspořádání vláken a viskoelastické charakteristiky, které se podílejí na jejich unikátním mechanickém chování. Typický diagram závislosti napětí na poměrné deformaci má počáteční fázi, kde se zvlněná vlákna šlachy narovnávají. Tato fáze končí zhruba ve 2 % poměrné deformace (viz Obrázek 9) [11].



Obrázek 9 – Diagram závislosti napětí na poměrné deformaci pro šlachu

V lineární části grafu už nejsou vlákna zvlněná. Směrnici tečny v lineární části nazýváme Youngovým modulem, který popisuje materiálovou pevnost šlach. Pokud je šlacha deformována přes 4 %, dochází u vláken k mikroskopickým trhlinkám. Při deformaci větší než 8–10 % se objevuje makroskopické poškození. Další deformace vyústí v selhání šlachy. Hodnoty maximálních deformací se velice liší v závislosti na metodice testu a vzorku. Moderními testovacími metodami bylo dokázáno, že některé šlachy se mohou elasticky prodloužit o 14 %. Je důležité rozlišovat, jaký vzorek je podroben mechanickým zkouškám. Pokud se jedná o spojení sval-šlacha-kost, bude dosahováno vyšších hodnot poměrné deformace, než když bude měřena pouze střední část šlachy. V prvním případě se bude deformace pohybovat mezi 13–32 %, pro střed šlachy se tyto hodnoty sníží na 5–16 % [11].

Průměrné maximální tahové napětí u šlach *in vivo* je zhruba 30 MPa, přičemž Achillova šlacha dosahuje napětí i přes 60 MPa. Pomocí speciálních měřících zařízení bylo zjištěno, že při chůzi je maximální napětí v tahu u Achillovy šlachy 59 MPa a při běhu dokonce 111 MPa, což z ní dělá nejzatěžovanější šlachu v lidském těle [12].

Mechanické vlastnosti *in vitro* se liší v závislosti na věku a fyzické kondici jedince. Johnson (1994) u lidské patelární šlachy naměřil rozdílné maximální tahové napětí pro dvě věkové skupiny. U mladších dárců (29–50 let) naměřil 64.77 ± 15.0 MPa a pro starší (64–93 let) 53.67 ± 10.0 MPa. Maximální poměrná deformace u mladší skupiny byla $14,7 \pm 6$ % a u starší $15,7 \pm 5$ %. Youngův modul pružnosti u různých šlach se v několika studiích pohyboval mez hodnotami 500–1800 MPa a hodnoty maximálních napětí 50–125 MPa [11] [12].

Jako i jiné měkké tkáně (vazy a kůže) jsou šlachy viskoelastické a citlivé na rychlost zatěžování. Viskoelastické chování je zapříčiněno kolagenem, vodou a interakcemi mezi kolagenovými a nekolagenovými proteiny (proteoglykany). Viskoelastická je definována creepem a hysterezní křivkou zatěžování. Díky viskoelasticitě dosahují šlachy větších deformací při pomalém zatěžování. Šlachy tedy absorbují větší množství energie, ale hůře přenášejí sílu. Při vysokých rychlostech zatěžování jsou efektivnější při přenosu síly, dosahují větší tuhosti a menších deformací [11].

2.2. Reakce na mechanické zatěžování

Šlachy, podobně jako kosti, dokáží změnit svoji strukturu v závislosti na zátěži, které jsou vystavovány. Například u myši, které běhaly pravidelně na běžícím pásu, byl pozorován nárůst rozměrů, počtu kolagenních fibril a plochy průřezu šlachy oproti skupině s neaktivním stylem života. U lidských subjektů toto nebylo prozatím prokázáno [11].

Trénink dále spustí biochemické změny ve šlachách. Například po osmitýdenním namáhavém vytrvalostním tréninku došlo v Achillově šlaše kohouta k 46% nárůstu ukládání kolagenu. Bylo také zjištěno, že fyzickou námahou se zvyšuje syntéza i degradace kolagenu v lidské Achillově šlaše, což má za následek remodelaci celé šlachy, která vede k lepší regeneraci [11].

Dalším faktorem ovlivňujícím mechanické vlastnosti šlach je imobilizace, například po vážném úrazu. Studií zabývajících se touto problematikou je celkem malé množství, tudíž máme omezené znalosti. Jedním z důvodů je, že metabolismus kosterní svaloviny je mnohem rychlejší kvůli jejich většímu prokrvení a následky imobilizace jsou u ní mnohem výraznější. Jakmile dojde k zamezení pohybu, váha šlachy, její tuhost a pevnost klesá. Tato skutečnost se potvrdila při fixaci králičího kolene. Byl pozorován pokles maximální zátěže

v tahu a snížení tuhosti. Dalším důsledkem byla formace nepravidelných a různě dlouhých vláken kolagenu [11].

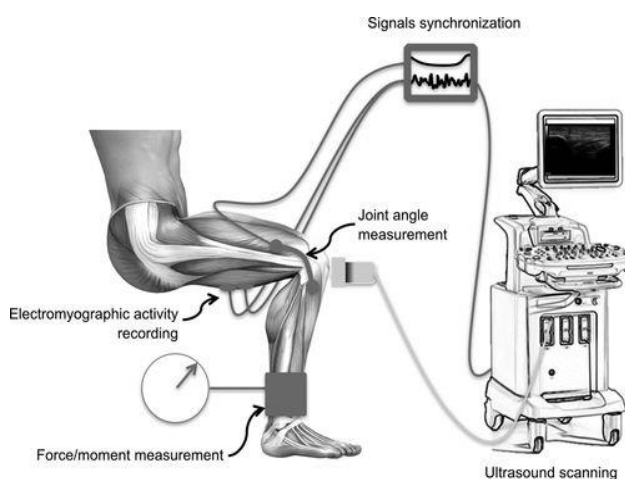
2.3. Mechanické testy

Zjistit mechanické vlastnosti šlach lze různými metodami, které můžeme, stejně jako u kostí, rozdělit na invazivní a neinvazivní. Neinvazivní mechanické testy lze provádět *in vivo* a bez jakéhokoli zásahu do těla zvířete či člověka, což je velká výhoda. Tato metoda má samozřejmě i své limity, nelze ji použít vždy a její výsledky jsou zpravidla méně přesné než u metod invazivních. Vzhledem k tomu, že v praktické části se zabývám metodou invazivní, budu se v následujících odstavcích více věnovat těmto metodám [12] [13].

2.3.1. Neinvazivní metody

Jedním z druhů neinvazivního testování je ultrazvuk. Ultrazvukem lze v určitých případech spolehlivě stanovit mechanické vlastnosti šlach. Ultrazukovými vlnami lze změřit prodloužení dané šlachy a pomocí přístroje, který měří sílu nebo moment v kloubu, v tomto případě v koleni (viz Obrázek 10), vytvořit závislost napětí/síly na poměrné deformaci/posuvu. Pro přesné výsledky je důležité změřit úhel natočení v kloubu. V některých případech se používá elektromyografie pro změření elektrických potenciálů v protilehlém svalu, aby se určilo, zda a popřípadě jak velkou silou působí na kloub z opačného směru. Tato svalová aktivita může mít velký vliv na měření [13].

Mezi další neinvazivní metody můžeme zařadit magnetickou rezonanci nebo radiové vlny [13].



Obrázek 10 – Schéma aparatury na měření mechanických vlastností patelární šlachy [13]

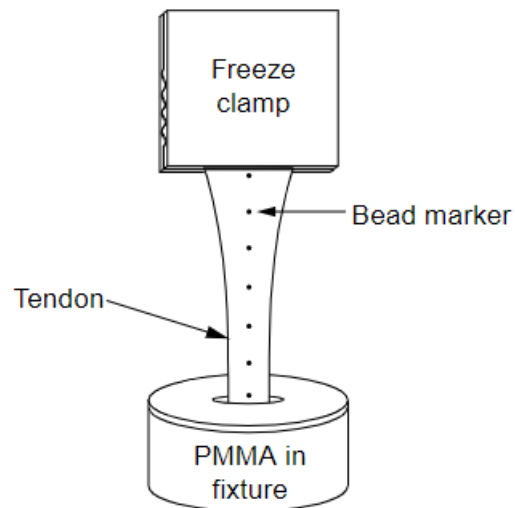
2.3.2. Invazivní metody

Šlachy jsou uzpůsobeny k tomu, aby přenášely sílu v tahu. Na této skutečnosti jsou také postaveny mechanické testy. Tahové zkoušky můžeme rozdělit na dvě podskupiny, a to na test mechanických vlastností jednotlivých vláken nebo celých šlach. Je dbáno na to, aby byly podmínky při testu co nejbližší podmínkám *in vivo* [13] [14].

Pro tahovou zkoušku samotných vláken je nutné vlákna izolovat. Po vyjmutí z těla se zmrazí (obvykle $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), aby se oddálila fáze autolýzy, převezou a poté pomalu rozmrazí. Při testování mechanických vlastností jednotlivých vláken kolagenu nebo například fibril se používá speciální sestava. Celý experiment probíhá v termostatické komoře, kde se udržuje teplota $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kolagenová vlákna mají průměr $1\text{ }\mu\text{m}$ a délku mezi 300 a $500\text{ }\mu\text{m}$. Pomocí kyanoakrylátového lepidla se vlákno přilepí na skleněné mikrotrubičky, které jsou připojeny na lineární aktuátor. Po hydrataci v solném roztoku začne tahová zkouška o rychlosti deformace $3\text{ }\mu\text{m/s}$. Výstupem z celého experimentu je diagram závislosti napětí na poměrné deformaci [14].

Při mechanických testech celých šlach je aparatura podstatně robustnější, protože musí vydržet mnohonásobně větší síly. Vzorky musí být pomalu rozmrazeny stejně jako v případě samotných vláken a hydratovány solným roztokem nebo vodou těsně před testem. Aby nedošlo ke zkreslení dat je důležité šlachy očistit od jiných tkání. Pro průběh testu je naprosto zásadní, aby vzorky nebyly jakkoliv poškozeny, protože i malé vrypy jsou koncentrátory napětí, které by snížily maximální sílu v tahu. Měření průřezu šlachy se dělá většinou za pomoci ultrazvuku, který má střední odchylku do 5% . Oproti tomu ruční měření posuvným měřítkem je méně přesné a závisí na člověku, který měří. Jedním z největších problémů u mechanických testů šlach je špatné upnutí konců a následné vyklouznutí z trhacího stroje. Z tohoto důvodu se používá spojení kost-šlacha-sval. Kost se dá v případě větších vzorků (lidská Achillova šlacha) zalít do polymethylmetakrylátu (PMMA) (viz Obrázek 11), který se poté zafixuje kovovým přípravkem, a v případě například potkaních šlach uchytit do čelistí. Sval lze uchytit do čelistí chlazených tekutým dusíkem, aby zůstal dostatečně tuhý a nevyklouzl. Tyto chlazené čelisti se dají nahradit pneumatickými s drsným povrchem, které udržují stálou přitlačnou sílu, i když se sval zploští. V tomto případě je vhodné sval zmrazit na 5 sekund tekutým dusíkem ze stejného důvodu jako u chlazených čelistí. Příliš dlouhá doba v tekutém dusíku by mohla zmrazit i samotnou šlachu, což není žádoucí. Pro určení deformace ve středu šlachy se na ní udělají značky s konstantní vzdáleností mezi sebou. Videoextenzometr pak z jejich vzájemného

pohybu určí deformaci. Je důležité udržovat stejnou rychlost zatěžování mezi vzorky, aby se mezi sebou daly porovnávat. Výstupem z tohoto měření je závislost napětí na poměrné deformaci, ze které se dají určit mechanické vlastnosti šlachy [12] [15].



Obrázek 11 – Uchycení lidské Achillovy šlachy při zkoušce tahem [12]

Experimentální část

1. Hypotéza

Pro vývoj nového léčiva je zásadní, aby negativně neovlivňovalo jakékoliv tkáň. V tomto případě je nutné ověřit bezpečnost látky 4-Methylumbelliferone (4MU). Předpokládáme tedy, že se mechanické vlastnosti potkaních kostí a šlach nezmění v závislosti na medikaci inhibítorem 4MU.

2. Vzorky

Vzorky a jejich přeprava

V rámci experimentu byly porovnávány čtyři skupiny potkaních femurů (viz Tabulka 1) a šlach (viz Tabulka 2). Potkani ze skupiny B a D byli léčeni inhibítorem perineuronálních sítí 4-methylumbelliferone (4MU). Potkani ze skupiny A a C léčeni nebyli, dostali placebo a byli kontrolními vzorky. Skupiny B a D se liší koncentrací 4MU, kdy ve skupině D je koncentrace dvojnásobná než v B a to 5 % 4MU. Dvě kontrolní skupiny jsou proto, že léčba u skupin B a D probíhala s rozstupem několika měsíců.

Tabulka 1 – Koncentrace 4MU a počet potkaních femurů v rámci skupin

skupina	A	B	C	D
koncentrace [%]	0	2,5	0	5
počet vzorků	17	18	8	13

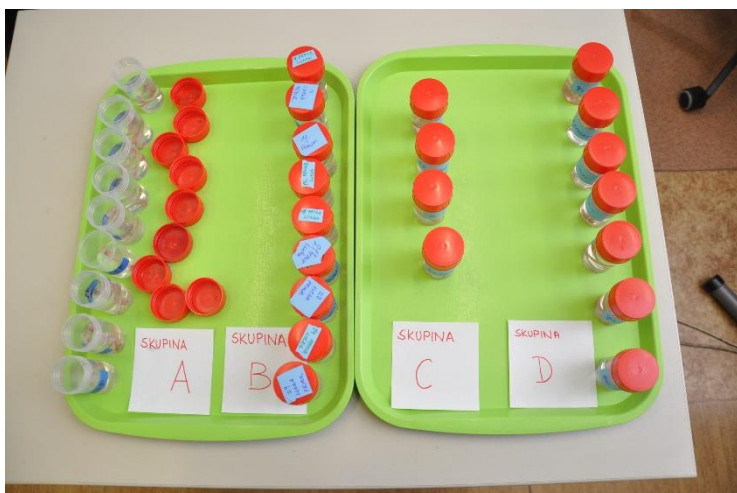
Tabulka 2 – Koncentrace 4MU a počet potkaních šlach v rámci skupin

skupina	A	B	C	D
koncentrace [%]	0	2,5	0	5
počet vzorků	18	18	8	14

Po vyjmutí byly femury a šlachy roztrženy na páry (z každého potkana jeden pár) a zmrazeny na -20 °C, aby se oddálila fáze degradace tkání. Převoz proběhl v chladícím boxu naplněným ledem. Aby se dosáhlo co nejpomalejšího rozmrazení, nechaly se přes noc v lednici.

Po rozmrazení byly vzorky vizuálně zkontrolovány a případně očištěny od přebytečných tkání. Před experimentem byly vzorky po párech vloženy do malých nádobek s fyziologickým roztokem, aby se úroveň hydratace blížila stavu *in vivo* (viz Obrázek 13).

Celé vzorky byly ponořeny. Následovalo určení pravého a levého femuru u každého páru na základě anatomie kosti. U šlach se jednalo se o spojení patní kost-Achillova šlacha-lytkový sval. Každému vzorku bylo přiřazeno číslo podle pořadí při mechanické zkoušce.



Obrázek 12 – Rozdělení vzorků do skupin



Obrázek 13 – Hydratace vzorku



Obrázek 14 – Rozdělní šlach do skupin a jejich hydratace

3. Kosti

3.1. Metodika experimentu

3.1.1. Postup zkoušky

- 1) Změření vzdálenosti podpěrných válečků na přípravku
- 2) Změření rozměrů vzorku
- 3) Vložení vzorku do přípravku
- 4) Zatěžování do selhání
- 5) Stanovení maximální zatěžovací síly F_{max}
- 6) Změření tloušťky stěny femuru

3.1.2. Vyhodnocované parametry

Pro každý vzorek vyhodnocujeme tyto parametry z naměřených dat:

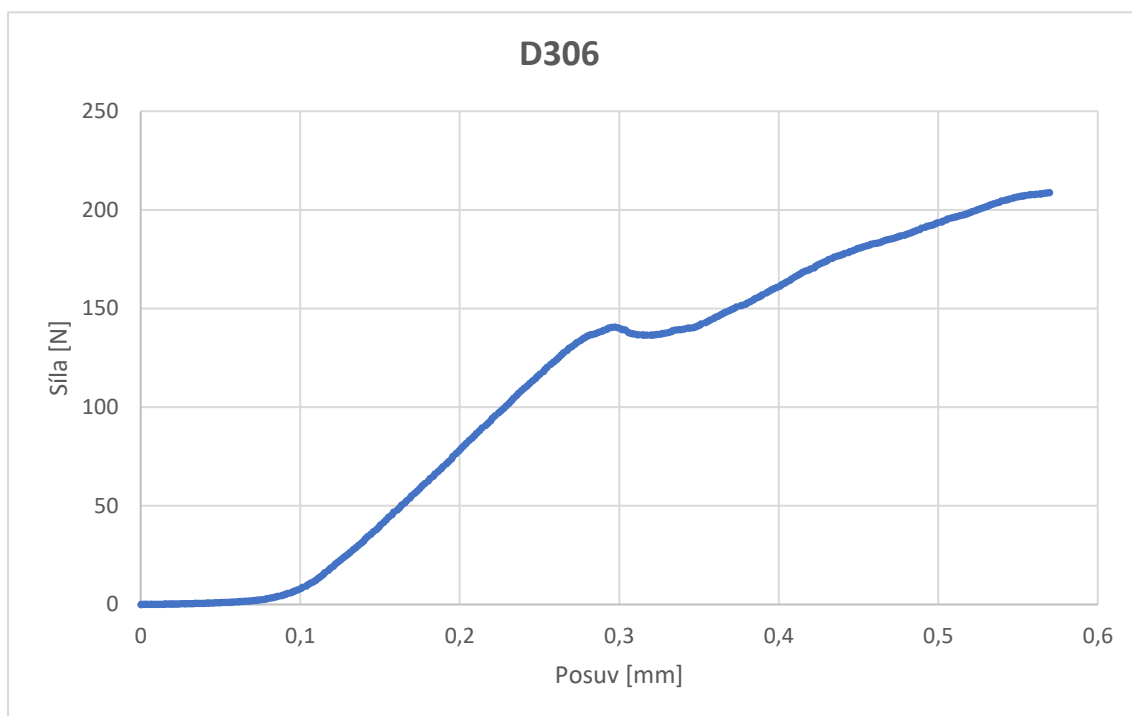
- 1) Maximální síla F_{max} [N]
- 2) Diagram závislosti síly F [N] na deformaci (posuvu) p [mm]
- 3) Maximální ohybový moment M_{omax} [N·mm]
- 4) Maximální ohybové napětí σ_{omax} [MPa]
- 5) Tuhost vzorku S [N·mm⁻¹]
- 6) Deformační energie U [mJ]

Maximální síla

Maximální síla byla vyhodnocena přímo ze systému MTS na základě dat ze silového snímače. V naprosté většině vzorků to byla hodnota těsně před selháním.

Diagram závislosti síly na deformaci

Pro každý vzorek byl z dat ze systému MTS vytvořen diagram závislosti síly F [N] (svislá osa) na posuvu p [mm] (vodorovná osa). Vzorky byly zatěžovány tlakem, takže se diagram nachází ve 3. kvadrantu. Pro lepší názornost jsou hodnoty síly a posuvu (deformace) převedeny do kladných hodnot, tudíž je výsledná křivka v kvadrantu 1. Maximální dosažená síla v tlaku je na vrcholu křivky a pro většinu vzorků těsně před selháním (viz Obrázek 15).



Obrázek 15 – Diagram závislosti síly na posuvu pro vzorek D306

Maximální ohybový moment

Maximální ohybový moment M_{omax} [N·mm] byl získán po dosažení do vztahu pro třibodový ohyb

$$M_{omax} = \frac{Fl}{4} \quad (1)$$

Maximální ohybové napětí

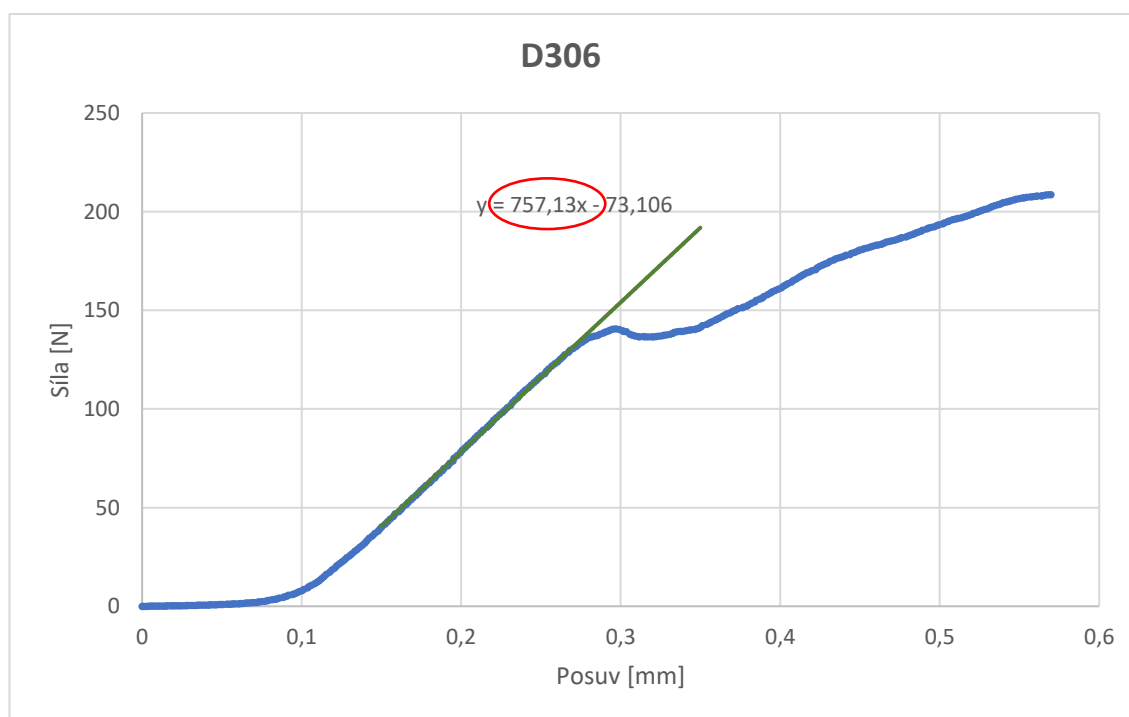
Nejdříve bylo dosazeno do rovnice pro průřezový modul v ohybu W_o [mm³] pro elipsu a z další rovnice jsme získali ohybové napětí σ_o [MPa].

$$W_o = \frac{\pi \cdot A \cdot B^2}{32} \cdot \frac{1 - a \cdot b^3}{A \cdot B^3} \quad (2)$$

$$\sigma = \frac{M_o}{W_o} \quad (3)$$

Tuhost vzorku

Tuhost kosti S [N·mm⁻¹] byla získána z diagramu závislosti síly na posuvu. Hodnota tuhosti kosti je ekvivalentní tangente (směrnice) lineární části F - p diagramu a byla získána pomocí lineární regrese s hodnotou r^2 vyšší než 0,995¹. Ve funkčním předpisu lineární funkce $y = ax + b$ je tuhost zastoupena koeficientem a (viz Obrázek 16).



Obrázek 16 – Směrnice lineární části diagramu síla-posuv reprezentující tuhost vzorku číslo D306. $S = 757,13 \text{ N}\cdot\text{mm}^{-1}$

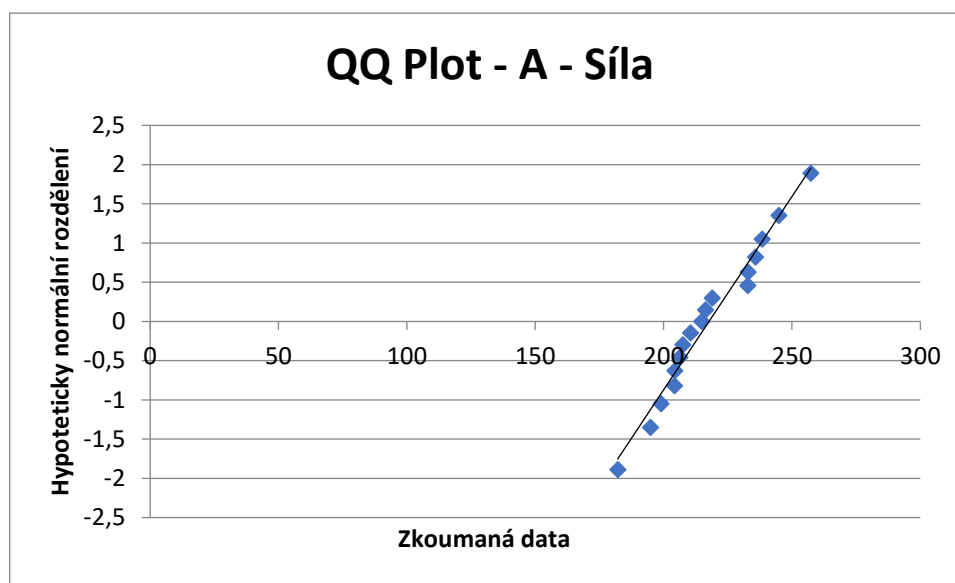
¹ Koeficient determinace (r^2) nabývá hodnot od 0 do 1. Pokud má hodnotu 1, tak nastává dokonalá korelace mezi odhadem (v tomto případě přímkou) a skutečnými hodnotami.

Deformační energie

Deformační energie U [mJ] je energie potřebná ke zlomení femuru a je ekvivalentní ploše pod křivkou diagramu $F-p$. Přesnou velikost plochy bychom získali integrací křivky diagramu. Vzhledem k tomu, že neznáme funkční předpis, můžeme získat pouze přibližnou velikost plochy, a to součtem obdélníků, na které plochu pod křivkou rozdělíme. Díky vzorkovací frekvenci 20 Hz jsme získali dostatečně přesnou velikost plochy.

3.2. Metodika statistického vyhodnocení

U každého parametru je ze všech hodnot spočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka výběru. Pro ověření normálního rozdělení dat byl použit Shapiro-Wilkův test a pro ověření jeho správnosti Q-Q graf, který na horizontální ose zobrazuje kvantily zkoumaného souboru hodnot a na svislé ose kvantily hypotetického normálního rozdělení. Pokud hodnoty splňují normální rozdělení, zobrazí se v jedné přímce (viz Obrázek 17).



Obrázek 17 – Q-Q graf z dat naměřené síly pro skupinu A. Můžeme pozorovat malý rozptyl kolem přímky, rozdělení dat je tudíž normální. Vodorovná osa síla [N], svislá osa hodnoty kvantilů pro normální rozložení

Pokud u skupiny dat vyšlo rozdělení normální, použil se parametrický Studentův T-test. Při nenormálním rozdělení dat byl použit neparametrický Mannův-Whitneyův U test. Oba tyto testy mají zjistit, zda se data ve dvou vzájemně porovnávaných skupinách statisticky významně liší. Pro tento test byla zvolena 5% hladina významnosti, která poté byla srovnávána s p-hodnotou. Pokud z testu vyjde p-hodnota menší než 0,05, jedná se o statisticky významnou odlišnost.

3.3. Realizace experimentu

3.3.1. Princip

Principem experimentu je tříbodový ohyb femuru potkana. Zatěžování probíhá konstantní rychlostí $2 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ až do destrukce. Všechny testy proběhly v laboratorních podmínkách za teploty vzduchu $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.2. Použitá zařízení

Pro testování byl použit systém MTS Mini Bionix 858.02 (metrologické označení PM 00) (viz Obrázek 18) se silovým snímačem o rozsahu 500 N (PM 00/18). Pro řízení testu jsme použili program vytvořený v software FlexTest GT (PM 00/11). Pro tříbodový ohyb byl použit speciální přípravek (PM 00/24) se dvěma podpěrnými válečky. Měření vzorků bylo provedeno pomocí posuvného měřítka KINEX (OM 01). Pomocí teploměru a vlhkoměru COMET (PM 07) jsme zaznamenali podmínky prostředí.



Obrázek 18 – Systém MTS Mini Bionix 858.02 se speciálním přípravkem

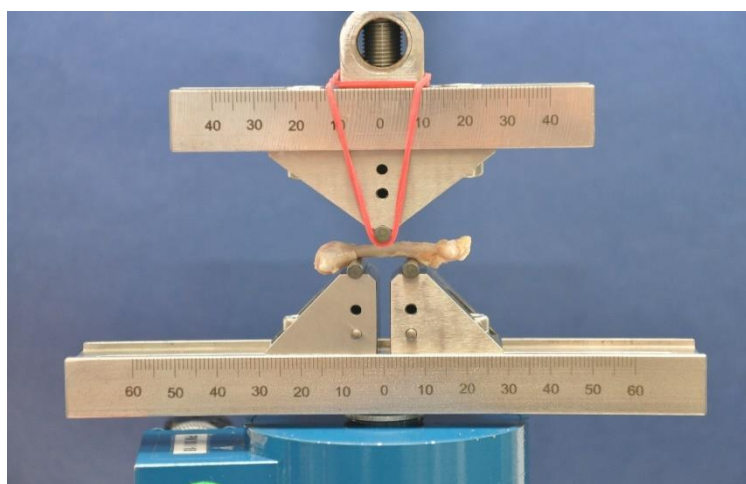
Všechna měřidla používaná v akreditované Laboratoři mechanických zkoušek na Fakultě strojní ČVUT v Praze a jsou pravidelně kalibrována.

3.3.3. Průběh zkoušky

Před prvním tříbodovým ohybem byly spodní podpory přípravku nastaveny tak, aby třetí bod zatěžování, který byl nad femurem, byl přesně mezi nimi (viz Obrázek 19). Takto bude vzorek zatěžován rovnoměrně z obou stran a minimalizuje se tím vznik smykových napětí. Poté byla proměřena vzdálenost spodních válečkových podpěr na přípravku. Třikrát se změřila vnější a třikrát vnitřní vzdálenost okrajů válečků (viz Tabulka 3). Pro další výpočty jsme použili hodnotu aritmetického průměru střední vzdálenosti.

Tabulka 3 – Změření přípravku na tříbodový ohyb

Měření podpor [mm]			Průměrná střední vzdálenost
Vnitřní	9,30	9,30	13,256 mm
Vnější	17,20	17,24	



Obrázek 19 – Potkaní femur na přípravku pro tříbodový ohyb

Měření vzorku

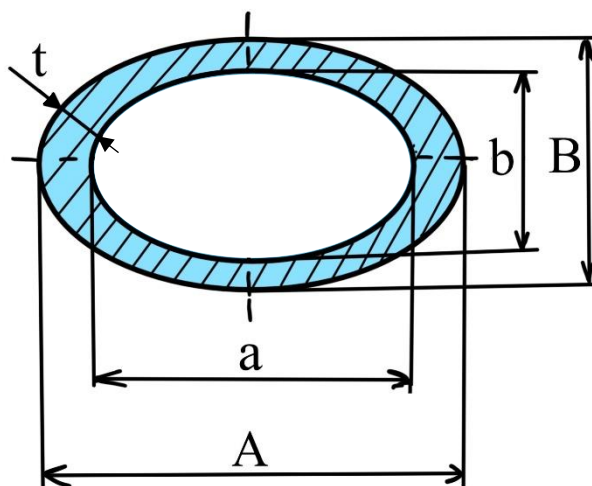
Každý femur byl změřen pomocí posuvného měřítka. Měřil se průměr v nejužším místě. Průřez je v tomto místě blíží elipse, tudíž je zapotřebí změřit hlavní (**A**) a vedlejší (**B**) osu (viz Obrázek 20). Pootáčením jsme hledali tedy největší a nejmenší rozměr, které na sebe byly kolmé. Hodnoty jsme zaznamenali do tabulky s přesností na setiny milimetru (viz Tabulka 3).

Zatěžování do destrukce

Po změření os průřezu byl vzorek horizontálně položen na přípravek tak, aby byla podélná osa kosti kolmá k osám podpěrných válečků (viz Obrázek 19). Umístěný vzorek byl zatěžován rychlostí 2 mm/min až do selhání. Software po destrukci zaznamenal F_{max} .

Změření tloušťky stěny

Po vyjmutí femuru z přípravku bylo možné změřit tloušťku stěny (t) kortikální kosti v místě lomu. Měření proběhlo třikrát na každé polovině (viz Tabulka 4). Těchto šest hodnot se zprůměrovalo pro co nejpřesnější výsledky (t'). Lom nastal v nejtenčí části kosti, takže společně s velikostmi os elipsy bylo možné dopočítat hodnoty os vnitřní elipsy (a , b) (viz Obrázek 20). Průřezový modul v ohybu W_0 [mm³] lze získat z těchto hodnot.



Obrázek 20 – Eliptický průřez střední části potkaního femuru

Tabulka 4 – Rozměry vzorků ze skupiny A

skupina	záznam	A	B	t						t'	a	b
		[mm]	[mm]	[mm · 10 ⁻²]						[mm]	[mm]	[mm]
A	1	4,52	3,36	80	82	112	90	116	102	0,97	2,58	1,42
	2	4,30	3,32	120	110	138	102	94	118	1,14	2,03	1,05
	3	4,02	3,58	104	102	116	112	100	128	1,10	1,81	1,37
	4	4,52	3,66	92	88	110	150	118	120	1,13	2,26	1,40
	5	4,52	3,26	98	88	118	108	130	106	1,08	2,36	1,10
	6	4,30	3,22	88	116	94	110	92	88	0,98	2,34	1,26
	7	4,14	3,50	108	92	116	86	92	142	1,06	2,02	1,38
	8	4,32	3,52	100	98	116	118	116	90	1,06	2,19	1,39
	9	4,32	3,34	136	106	122	110	112	108	1,16	2,01	1,03
	10	4,62	3,30	132	126	118	130	92	132	1,22	2,19	0,87
	11	3,80	3,08	90	110	92	90	108	88	0,96	1,87	1,15
	12	4,32	3,48	160	82	86	94	100	102	1,04	2,24	1,40
	13	4,12	3,44	108	132	110	128	112	102	1,15	1,81	1,13
	14	4,14	3,30	90	96	132	102	88	98	1,01	2,12	1,28
	15	4,14	3,24	138	88	134	140	116	100	1,19	1,75	0,85
	16	4,32	3,20	92	152	108	110	102	116	1,13	2,05	0,93
	17	4,12	3,10	122	100	118	120	82	134	1,13	1,87	0,85

3.4. Výsledky

Pro každou skupinu femurů byly kromě parametrů vyhodnoceny i jejich průměry a směrodatné odchylky. Určilo se, zda je rozložení dat normální. Podle parametrického T-Testu nebo neparametrického U-Testu se stanovila signifikance odlišnosti.

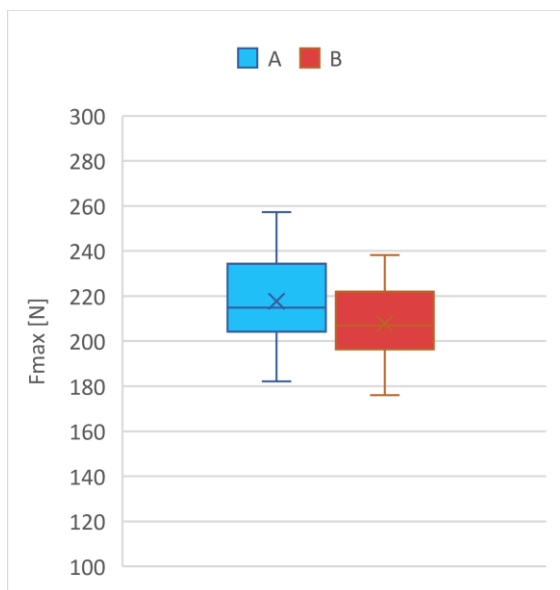
3.4.1. Maximální síla

Hodnoty maximální síly pro skupinu A a B jsou v normálním rozložení, takže byl u nich použit T-Test. Neprojevila se statistická signifikance změny a vzorky ze skupiny A jsou minimálně odlišné od skupiny B (v maximální síle) (viz Tabulka 5). I na krabicových grafech je vidět, že je rozložení dat u obou skupin podobné (viz Obrázek 21).

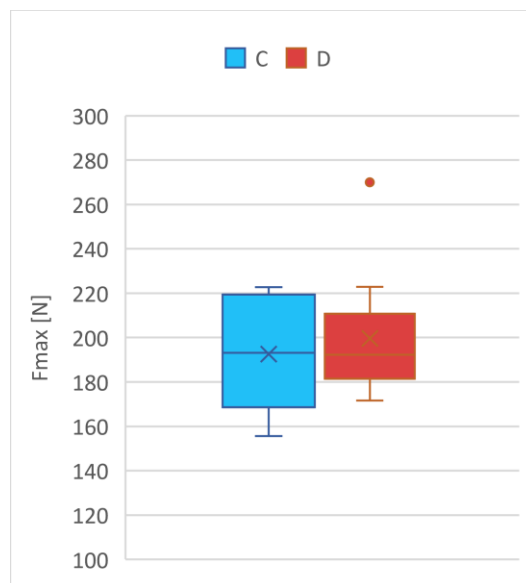
U skupin C a D byl také použit Shapiro-Wilkův test pro ověření normality. Skupina C má normální rozložení, ale skupina D ne, tudíž musel být použit neparametrický U-Test. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi hodnotami maximální síly u těchto skupin. Hodnoty směrodatných odchylek se zvýšily oproti předchozím skupinám a je to také vidět i na krabicových grafech. Oproti C (placebo) má skupina D (bylo použito 4MU) vyšší průměrné hodnoty maximální síly o 4 % (viz Obrázek 22).

Tabulka 5 – Hodnoty maximální síly jednotlivých femurů, průměr skupiny a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D.

Skupina	$F_{\max} - \text{mean}$	$F_{\max} - \text{SD}$
	[N]	[N]
A	217,67	19,86
B	207,73	17,14
C	192,51	26,71
D	199,64	25,72



Obrázek 21 – Rozložení hodnot maximální síly skupiny A – placebo, B – 2,5% 4MU



Obrázek 22 – Rozložení hodnot maximální síly skupiny C – placebo, D – 5% 4MU

3.4.2. Maximální ohybový moment

Vzhledem k tomu, že maximální ohybový moment je maximální síla vynásobená délkou (viz (1)), která je stejná pro všechny vzorky, tak tyto hodnoty (viz Tabulka 6) nebyly statisticky vyhodnoceny. Nepřineslo by to žádné nové informace.

Tabulka 6 – Hodnoty maximálního ohybového momentu, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D

Skupina	M_o – mean	M_o – SD
	[N·mm]	[N·mm]
A	721,36	65,82
B	688,43	56,81
C	637,99	88,53
D	661,60	85,23

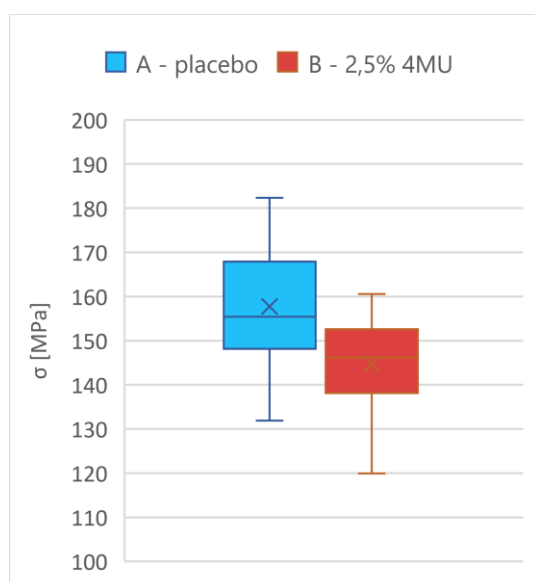
3.4.3. Maximální ohybové napětí

Pro skupiny A, B Shapirov-Wilkův test stanovil normální rozdělení dat a mohl být tedy použit parametrický T-Test. Mezi těmito skupinami byla nalezena statisticky signifikantní odlišnost (p-hodnota menší než 0,05). Tato skutečnost je patrná i z průměrných hodnot pro celou skupinu, kdy je průměrná hodnota maximálního ohybového napětí pro skupinu B o necelých 10 % nižší než pro skupinu A (viz Tabulka 7, Obrázek 23).

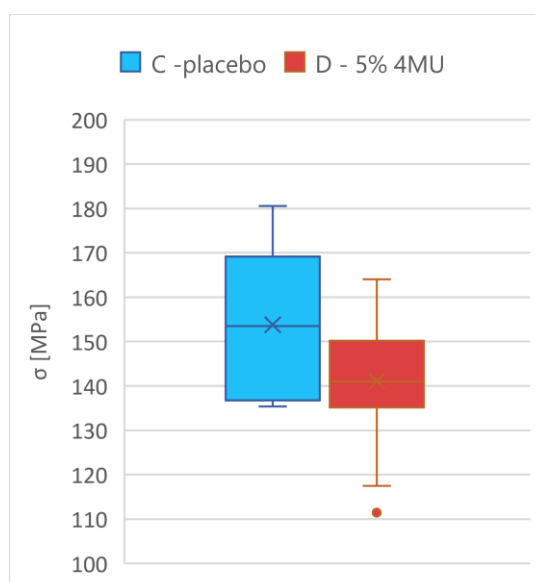
Shapirov-Wilkův test pro skupinu C a D opět potvrdil normální rozdělení. Signifikantní změna nebyla prokázána (viz Obrázek 24).

Tabulka 7 – Hodnoty maximálního ohybového napětí, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D

Skupina	σ_o – mean	σ_o – SD
	[N·mm ⁻²]	[N·mm ⁻²]
A	157,74	13,90
B	144,63	10,97
C	153,80	16,95
D	141,10	14,88



Obrázek 23 – Rozložení hodnot maximálního ohybového napětí pro skupiny A a B



Obrázek 24 – Rozložení hodnot maximálního ohybového napětí pro skupiny C a D

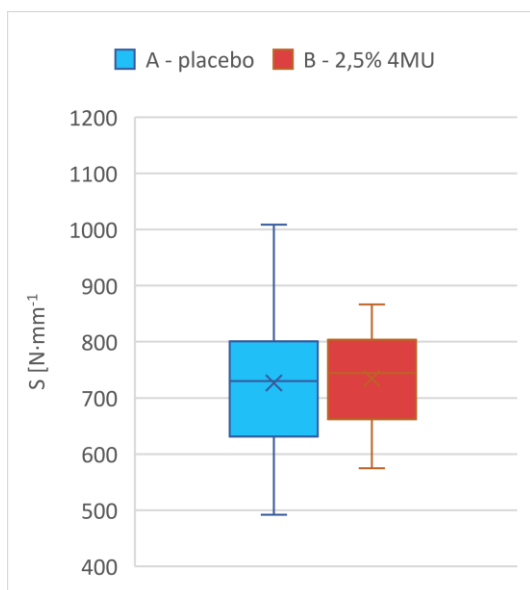
3.4.4. Tuhost vzorku

Při statistické analýze skupin A, B se zjistilo normální rozložení hodnot tuhosti. Signifikantní odlišnost nebyla prokázána. Průměrné hodnoty obou skupin jsou velice podobné a skupina B ji má zhruba o 1 % vyšší (viz Tabulka 8, Obrázek 25).

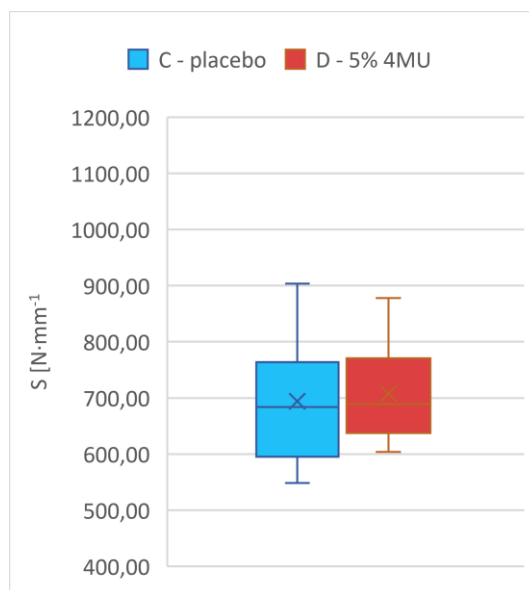
Pro skupiny C, D opět statistické vyhodnocení ukázalo normální rozložení. Neprokázalo se signifikantní rozdíl mezi skupinami. Skupina D má přibližně o 2 % vyšší průměrnou hodnotu tuhosti (viz Obrázek 26).

Tabulka 8 – Hodnoty tuhosti, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C a D

Skupina	S – mean	S – SD
	[N·mm ⁻¹]	[N·mm ⁻¹]
A	726,76	136,03
B	734,42	84,46
C	694,30	113,57
D	707,98	82,99



Obrázek 25 – Rozložení hodnot tuhosti pro skupinu A, B



Obrázek 26 – Rozložení hodnot tuhosti pro skupinu C, D

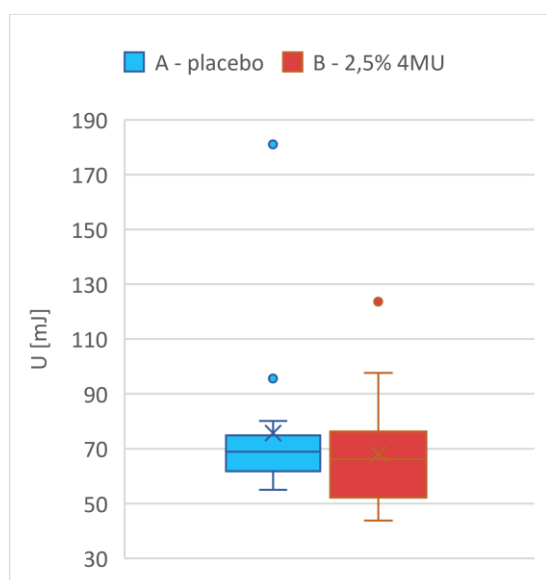
3.4.5. Deformační energie

Pro skupinu A Shapiro-Wilkův test neukázal normální rozdělení, takže byl použit neparametrický U-Test. Nebyl potvrzen rozdíl nad hladinou signifikantní odlišnosti. Průměrná hodnota deformační energie pro skupinu B je přibližně o 10 % nižší než u A (viz Tabulka 9). U skupiny A byly zaznamenány dvě vzdálené hodnoty, z nichž má jedna více než dvojnásobnou velikost oproti průměru (viz Obrázek 27).

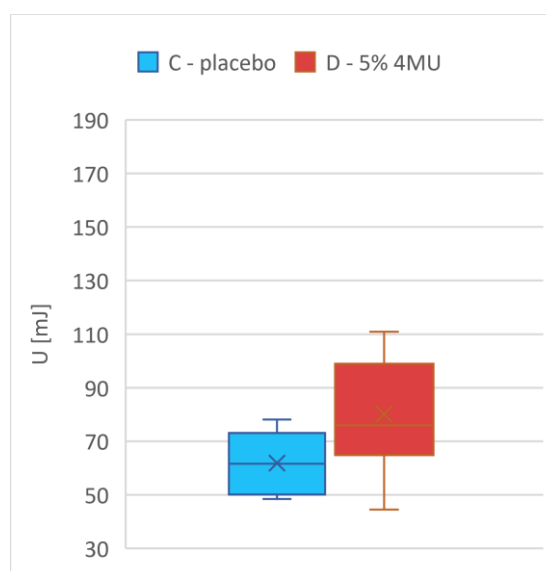
U skupin C a D Shapiro-Wilkův test prokázal normální rozložení dat. Byl použit T-Test. Byla nalezena signifikantní odlišnost mezi těmito skupinami. Tento jev můžeme pozorovat i na průměrných hodnotách deformační energie. Skupina D má průměrnou hodnotu přibližně o 30 % vyšší než C. Výrazný rozdíl je vidět i na rozložení hodnot (viz Obrázek 28).

Tabulka 9 – Hodnoty deformační energie, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B

Skupina	U – mean	U – SD
	[mJ]	[mJ]
A	75,67	28,99
B	68,00	19,82
C	61,80	11,45
D	80,10	20,00



Obrázek 27 – Rozložení hodnot deformační energie pro A, B



Obrázek 28 – Rozložení hodnot deformační energie pro C, D

4. Šlachy

4.1. Metodika experimentu

4.1.1. Postup zkoušky

- 1) Změření rozměrů vzorku
- 2) Zmražení svalu v tekutém dusíku
- 3) Vložení vzorku do čelistí
- 4) Zatěžování do selhání
- 5) Stanovení maximální síly v tahu
- 6) Vyndání vzorku a očištění čelistí

4.1.2. Vyhodnocované parametry

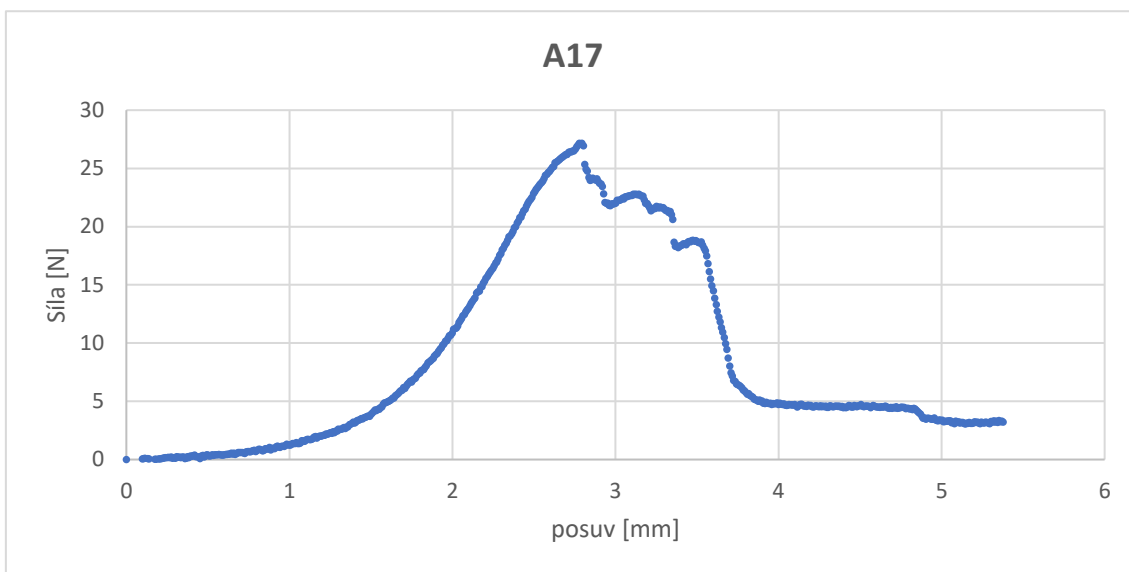
- 1) Maximální síla F_{max} [N]
- 2) Diagram závislosti síly F [N] na deformaci (posuvu) p [mm]
- 3) Maximální napětí v tahu σ_{max} [MPa]
- 4) Tuhost vzorku S [N·mm⁻¹]
- 5) Youngův modul pružnosti E [MPa] v 5 % deformace

Maximální síla

Maximální naměřená síla byla vyhodnocena systémem MTS na základě dat ze silového snímače, která se nahrávala do počítačového programu.

Diagram závislosti síly na deformaci

Z dat ze silového snímače a posuvu v čase byl vytvořen diagram závislosti síly F [N] (svislá osa) na posuvu p [mm] (vodorovná osa). Vzorky byly zatěžovány tahem, takže se diagram nachází v 1. kvadrantu. Na rozdíl od kostí nebyla maximální síla těsně před selháním vzorku, ale jak je vidět, nepotrhalo se najednou všechna vlákna a síla postupně klesala (viz Obrázek 29).



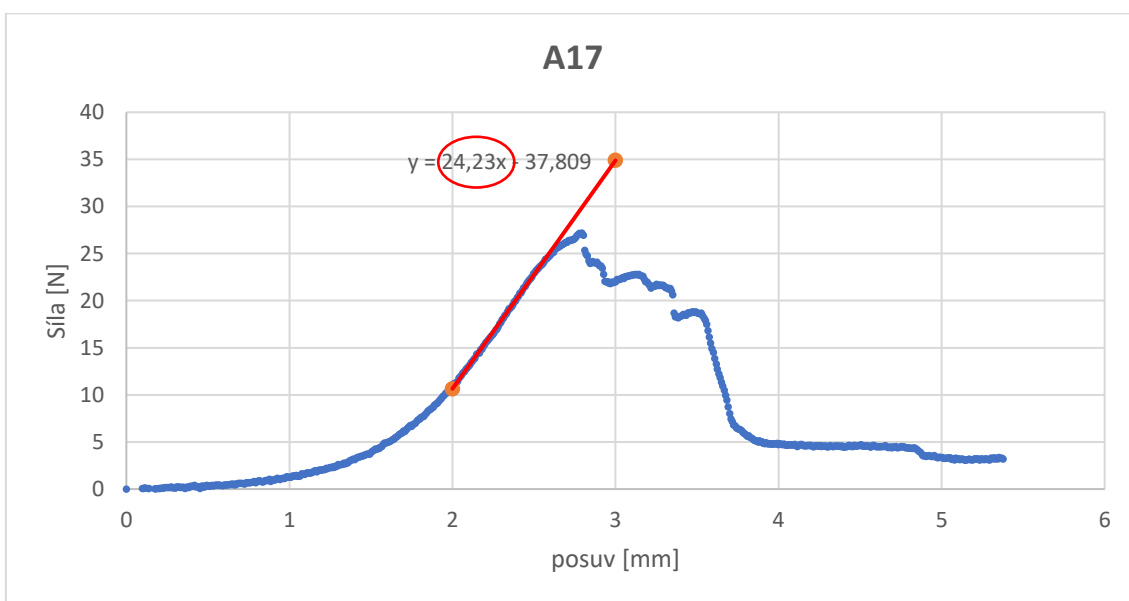
Obrázek 29 – Závislost síly na posuvu pro vzorek A17

Maximální napětí v tahu

Po podělení maximální síly plochou průřezu šlarchy jsme získali maximální naměřené napětí v tahu σ_{max} [MPa]. Průřez šlarchy byl aproximován kruhem.

Tuhost vzorku

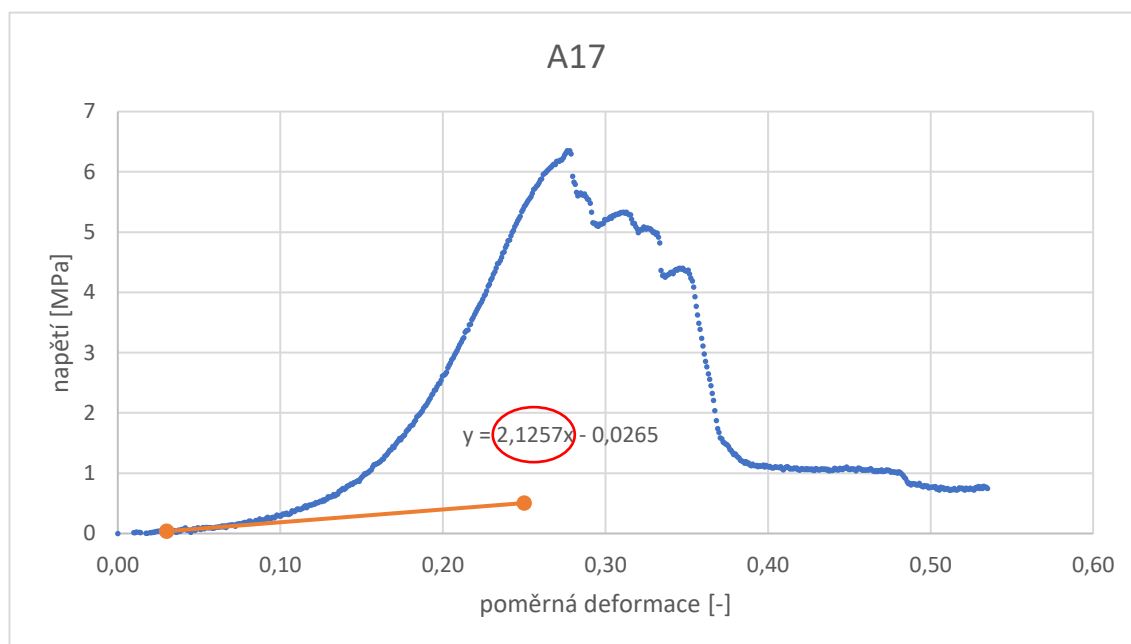
Tuhost vzorku S [$N \cdot mm^{-1}$] se určovala z diagramu síla-posuv a je ekvivalentní směrnicí lineární části křivky. Směrnice byla získána pomocí lineární regrese s hodnotou r^2 vyšší než 0,995. Ve funkčním předpisu $y = ax + b$ je tuhost zastoupena koeficientem a (viz Obrázek 30).



Obrázek 30 - Tuhost jako směrnice lineární části, $S = 24,23 N \cdot mm^{-1}$

Youngův modul pružnosti

Youngův modul pružnosti E [MPa] udává materiálovou pevnost vzorku. Určil se z diagramu napětí-poměrná deformace, ve kterém je ekvivalentní tečně ke křivce. Protože jsme se setkávali s velkým rozptylem hodnot maximální síly, z důvodu nedostatečného zafixování svalu v čelistech, tak jsme určovali Youngův modul pouze v 5 % deformace (viz Obrázek 31). Použili jsme k tomu opět lineární regresi, a to na intervalu 4–6 % deformace.



Obrázek 31 – Youngův modul pružnosti pro vzorek A17, $E = 2,13$ MPa. (Tečna je protažená pouze pro názornost.)

4.2. Metodika statistického vyhodnocení

Nejdříve bylo prověřeno, zda nejsou hodnoty jednotlivých parametrů mimo interval I tvořený mediánem a interkvartilovým rozložením (viz rovnice (4)). Pokud se nacházely mimo I , byly vyloučeny z dalšího statistického vyhodnocení.

$$I = \text{median} \pm 3 \cdot \text{IQR} \quad (4)$$

Další statistické vyhodnocení proběhlo stejně jako u femurů (viz kapitola 3.2)

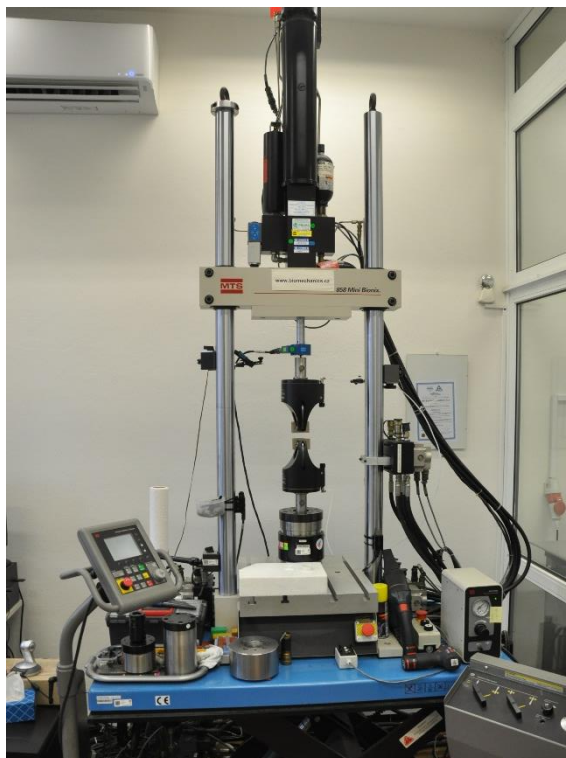
4.3. Realizace experimentu

4.3.1. Princip

Principem mechanického testu Achillovy šlachy potkana je zkouška tahem do destrukce. Zatěžování mělo konstantní rychlost 10 mm/min a vzorkování bylo o frekvenci 20 Hz. Vše probíhalo v laboratorních podmínkách při teplotě vzduchu 23 ± 2 °C.

4.3.2. Použitá zařízení

Pro zkoušku tahem byl použit systém MTS Mini Bionix 858.02 (metrologické označení PM 00) se silovým snímačem o rozsahu 500 N (PM 00/18). Pro řízení zkoušky jsme použili program vytvořený v software FlexTest GT (PM 00/11). Byly použity pneumatické čelisti, které zajišťují stálou sílu stisku. Měření vzorků bylo provedeno pomocí posuvného měřítka KINEX (OM 01). Pomocí teploměru a vlhkoměru COMET (PM 07) jsme zaznamenali podmínky prostředí.



Obrázek 32 – Systém MTS Mini Bionix 858.02 s pneumatickými čelistmi

4.3.3. Průběh zkoušky

Před první zkouškou se natlakovaly pneumatické čelisti na 45 PSI a tato hodnota byla kontrolována mezi jednotlivými měřeními, aby nedocházelo k různým přítlačným silám.

Změření vzorku

Průměr každé šlachy byl změřen třikrát v nejužším místě posuvným měřítkem a poté aritmeticky zprůměrován na finální hodnotu pro dopočet plochy průřezu (viz Tabulka 10), která je poté aproximována na kruh.

Tabulka 10 – Rozměry šlach ve skupině A

skupina	záznam	Vzorek číslo	d			d – mean	S
			[mm]			[mm]	[mm ²]
A	1	2_1	2,20	2,30	1,90	2,13	3,57
	2	2_2	3,30	2,30	3,20	2,93	6,76
	3	4_1	2,90	2,80	2,80	2,83	6,31
	4	4_2	3,40	1,70	2,30	2,47	4,78
	5	13_1	3,30	2,80	3,20	3,10	7,55
	6	13_2	1,70	3,90	2,90	2,83	6,31
	7	14_1	1,60	3,14	2,60	2,45	4,70
	8	14_2	1,30	3,20	2,30	2,27	4,04
	9	15_1	3,00	1,90	2,50	2,47	4,78
	10	15_2	2,60	3,40	2,30	2,77	6,01
	11	16_1	1,70	3,40	2,20	2,43	4,65
	12	16_2	3,30	1,80	2,30	2,47	4,78
	13	22_1	1,10	1,50	1,40	1,33	1,40
	14	22_2	2,70	3,00	2,60	2,77	6,01
	15	26_1	2,20	2,30	1,80	2,10	3,46
	16	26_2	3,30	1,90	2,40	2,53	5,04
	17	27_1	1,30	2,90	2,80	2,33	4,28
	18	27_2	2,30	1,40	2,20	1,97	3,04

Zmrazení svalu

Bylo důležité zmrazit sval, aby byl dostatečně pevný a nevyklouzl z čelistí. Zmražení i šlachy by negativně ovlivnilo její mechanické vlastnosti, muselo se tedy dbát zvýšené opatrnosti. Zmrazení muselo být rychlé (5 s), použili jsme tekutý dusík o teplotě -196 °C (viz Obrázek 33).



Obrázek 33 – Zmrazení svalu tekutým dusíkem

Upnutí do čelistí

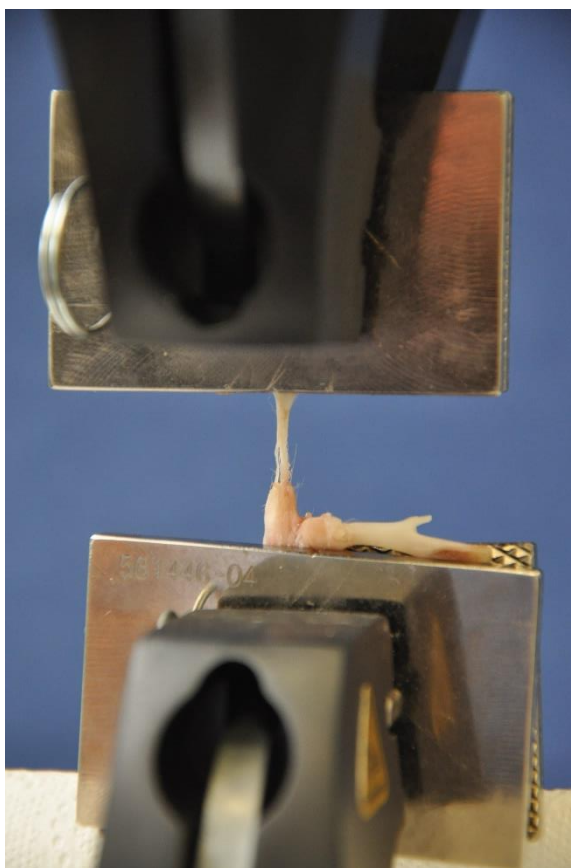
Po zmrazení mohl být vzorek uchycen do pneumatických čelistí. Bylo důležité dbát na to, aby byl sval upnut přímo nad kostí (viz Obrázek 34). Kdyby tomu tak nebylo, mohla by být šlacha nerovnoměrně zatěžována, což by ovlivňovalo výsledky.

Zatěžování do selhání

Upnutý vzorek byl zatěžován rychlostí 10 mm/min až do porušení (viz Obrázek 35). Po selhání byl vzorek vyjmut z čelistí, které byly následně očištěny, aby následující vzorek nevyklouzával.



Obrázek 34 – Upnutí vzorku do pneumatických čelistí



Obrázek 35 – Zatěžování vzorku do destrukce

4.4. Výsledky

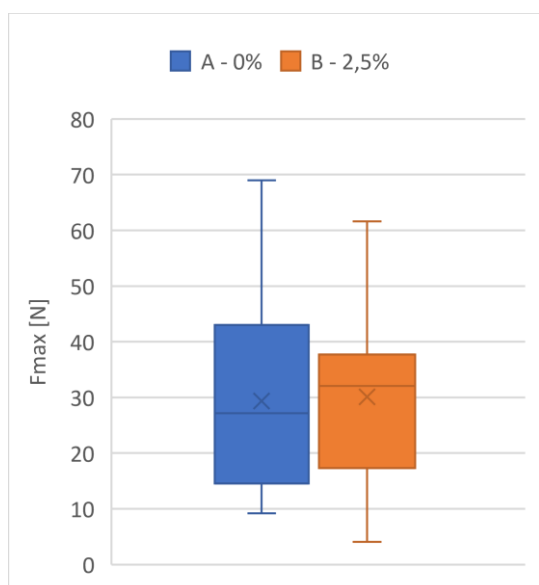
4.4.1. Maximální naměřená síla

Hodnoty síly pro skupiny A a B jsou podle Shapiro-Wilkova testu v normálním rozložení, byl tedy použit T-Test. Statistická signifikance se neprojevila. Skupina A dosahuje přibližně o 2,5 % nižších průměrných hodnot než B (viz Tabulka 11). Rozložení hodnot pro tyto skupiny je podobné (viz Obrázek 36)

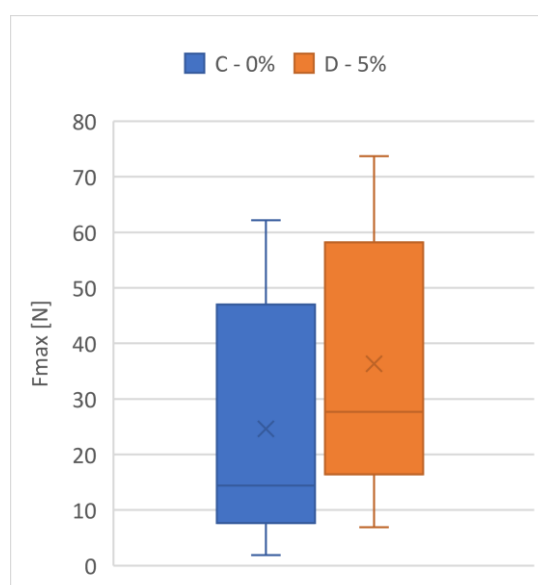
Pro skupiny C a D se opět potvrdilo normální rozložení. T-Test neprokázal signifikantní změnu. Průměrné hodnoty maximální síly pro skupinu C jsou zhruba o 30 % nižší než u D. Kvůli velkému rozptylu hodnot (viz Obrázek 37) nejde o signifikantní odlišnost.

Tabulka 11 – Hodnoty maximální síly jednotlivých šlach, průměr skupiny a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D.

Skupina	F_{\max} – mean	F_{\max} – SD
	[N]	[N]
A	29,35	16,71
B	30,12	14,54
C	24,61	22,33
D	36,33	23,36



Obrázek 36 – Rozložení hodnot maximální síly skupiny A – placebo, B – 2,5% 4MU



Obrázek 37 – Rozložení hodnot maximální síly skupiny C – placebo, D – 5% 4MU

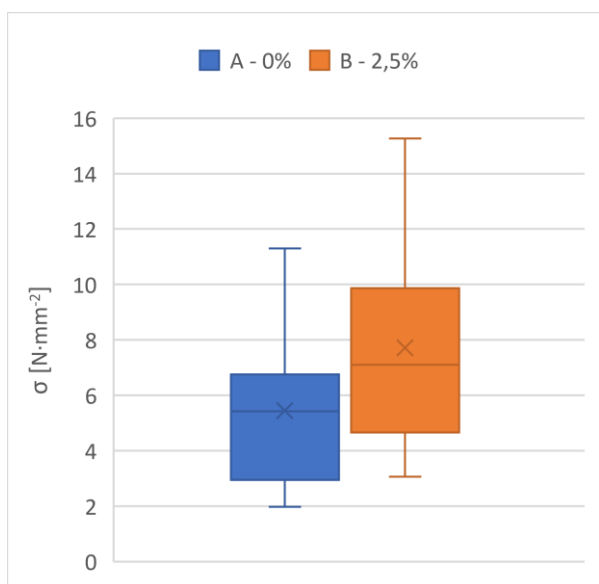
4.4.2. Maximální tahové napětí

Hodnoty skupin A a B jsou v normálním rozdělení. V tomto případě se jedná o signifikantní změnu, p-hodnota klesla pod 0,05. Průměrné hodnoty skupiny A jsou o necelých 42 % nižší než B (viz Tabulka 12). Tato skutečnost se projevila i na rozložení hodnot v krabicových grafech (viz Obrázek 38).

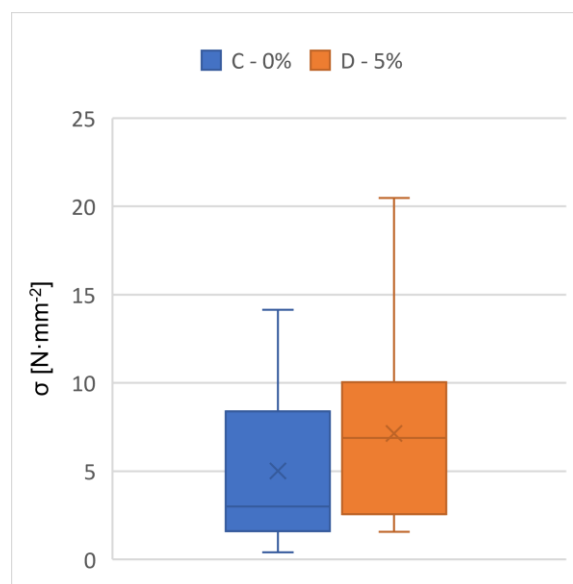
U skupin C a D se opět potvrdilo normální rozložení a po statistickém vyhodnocení se neprokázala signifikantní změna. Průměrné hodnoty skupiny A jsou o 42 % nižší než skupiny B (viz Obrázek 39).

Tabulka 12 – Hodnoty maximálního tahového napětí jednotlivých šlach, průměr skupiny a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D.

Skupina	$\sigma_{\max} - \text{mean}$	$\sigma_{\max} - \text{SD}$
	[N·mm ⁻²]	[N·mm ⁻²]
A	5,44	2,82
B	7,72	3,50
C	5,01	4,66
D	7,13	5,48



Obrázek 38 – Rozložení hodnot maximálního tahového napětí pro skupiny A a B



Obrázek 39 – Rozložení hodnot maximálního tahového napětí pro skupiny C a D

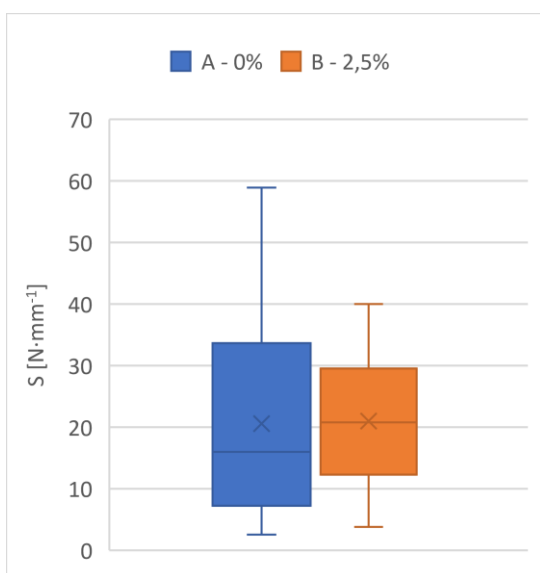
4.4.3. Tuhost

Ve skupině A nebyly hodnoty normálně rozloženy, takže musel být použit neparametrický U-Test, který určil p-hodnotu větší než 0,05, nebyla tedy prokázána signifikantní odlišnost. Průměrné hodnoty skupiny A jsou o necelé 2 % nižší než u skupiny B (viz Tabulka 13). I z krabicových grafů je zřejmé, že hodnoty skupin A a B jsou si velmi blízké. (viz Obrázek 40).

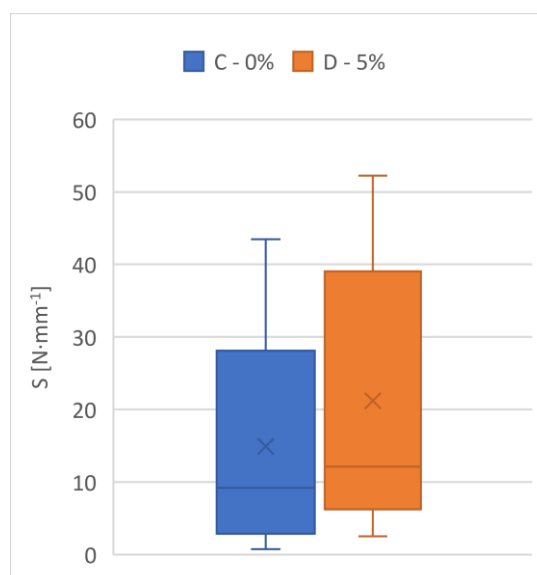
Hodnoty skupiny D opět nepodléhaly normálního rozložení. U-Test neprokázal signifikantní odlišnost. Průměrné hodnoty tuhosti se tentokrát lišily o 42 % (viz Obrázek 41).

Tabulka 13 – Hodnoty tuhosti, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D

Skupina	S – mean	S – SD
	[N·mm ⁻¹]	[N·mm ⁻¹]
A	20,59	16,85
B	20,97	10,63
C	14,92	15,33
D	21,18	18,04



Obrázek 40 – Rozložení hodnot tuhosti skupiny A – placebo, B – 2,5% 4MU



Obrázek 41 – Rozložení hodnot tuhosti skupiny C – placebo, D – 5% 4MU

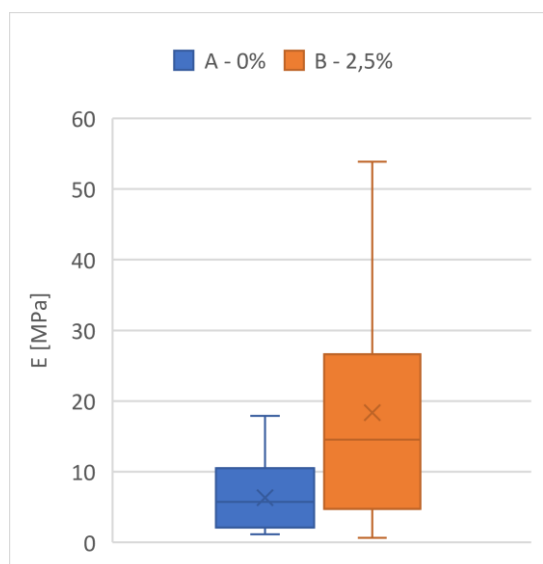
4.4.4. Modul pružnosti v 5 % deformace

Skupina A ani B nemají normální rozložení, byl použit neparametrický U-Test, který prokázal signifikantní změnu. Průměrné hodnoty také poukazují na velký rozdíl mezi skupinami (viz Tabulka 14). Průměrné hodnoty Skupiny B jsou o 190 % vyšší, což je patrné z krabicových grafů (viz Obrázek 42).

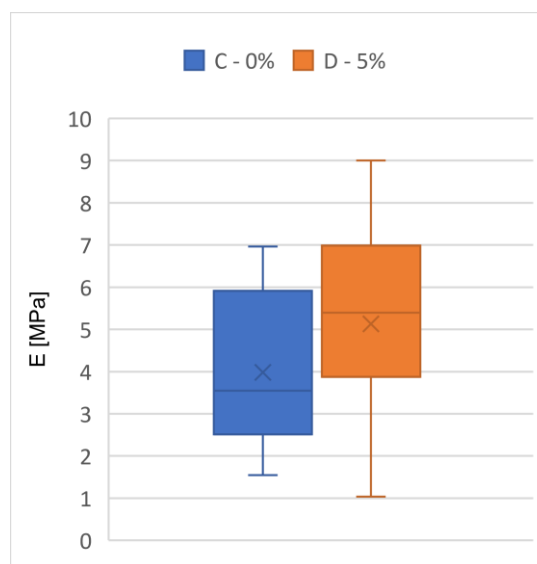
Shapiro-Wilkův test prokázal normální rozložení hodnot u skupin C a D. Parametrický T-Test neprokázal signifikantní odlišnost. Průměrné hodnoty modulu pružnosti u skupiny C jsou o 29 % nižší než u D (viz Obrázek 43).

Tabulka 14 – Hodnoty modulu pružnosti v 5 % deformace, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D

Skupina	E – mean	E – SD
	[MPa]	[MPa]
A	6,31	4,97
B	18,34	16,68
C	3,98	1,90
D	5,13	2,38



Obrázek 42 – Rozložení hodnot modulu pružnosti v 5 % deformace skupiny A – placebo, B – 2,5% 4MU



Obrázek 43 – Rozložení hodnot modulu pružnosti v 5 % deformace skupiny C – placebo, D – 5% 4MU

5. Závěr

Úkolem této práce bylo stanovit dopad léčby inhibitorem perineuronálních sítí 4MU na mechanické vlastnosti stehenních kostí (femurů) a Achillových šlach u potkanů ze čtyř skupin. Skupina A sloužila jako kontrolní skupina pro skupinu B, kde byl použit 2,5% 4MU. Skupina C byla kontrolní skupinou pro skupinu D s 5% 4MU.

Po statistické analýze výsledků tříbodového ohybu potkaních femurů a následném porovnání s kontrolními skupinami, byla prokázána signifikantní odlišnost ve dvou případech z osmi. Mezi skupinami A a B byla signifikantní změna u ohybového napětí a poté u deformační energie mezi skupinami C a D.

Po konzultaci s doktorandkou z Ústavu experimentální medicíny akademie věd se domnívám, že rozdíl v ohybovém napětí by mohl být zapříčiněn zhoršenou výživou kosti, která se vyskytuje kvůli lézi v oblasti míchy. Dochází tedy k atrofii kosti a k zhoršení mechanických vlastností. Zvýšení deformační energie po podání 4MU může být způsobeno úbytkem hyaluronu, který má na starosti vytvářet strukturní síť kosti, kost se tedy více prohne při tříbodovém ohybu.

U Achillových šlach se setkáváme se stejným počtem signifikantních změn, tj. ve dvou případech, a to mezi skupinami A a B v tahovém napětí a v modulu pružnosti. Bohužel u některých vzorků docházelo k prokluzu svalu v čelistech, což mělo za následek velký rozptyl hodnot mezi vzorky. Domníváme se, že pokud by byla na vzorku ponechána větší část svalu, mohl by se lépe zmrazit a uchytit do pneumatických čelistí bez prokluzu.

Najít příčinu změn mechanických vlastností šlach je velmi náročné, protože byl velký rozptyl jejich hodnot, kvůli nevhodné velikosti vzorků.

Aby se léčivo 4MU mohlo uvést na trh je důležité eliminovat negativní změny ve tkáních a předejít tak případným nežádoucím účinkům. V této práci jsme se zaměřili pouze na kosti a šlachy, ale v rámci preklinického testování se musí zajistit bezpečnost i pro všechny ostatní tkáně.

6. Zdroje

1. KARETKO, Magdalena; SKANGIEL-KRAMSKA, Jolanta. Diverse functions of perineuronal nets. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2009, 69.4: 564-77.
2. CULLINANE, Dennis M. a Thomas A. EINHORN. Biomechanics of Bone: A tutorial. *Principles of Bone Biology* [online]. Elsevier, 2002, 2002, 14(4), 17-32 [cit. 2021-11-29]. ISBN 9780120986521. ISSN 87563282. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012098652-1.50104-9
3. DOBLARÉ, Manuel; MERODIO, José. An introduction to biomechanics and mechanobiology. *Editors: Manuel Doblare and Jose Merodio*, 2015, 1. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120986521501049>
4. TURNER, C.H. a D.B. BURR. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* [online]. 1993, 14(4), 595-608 [cit. 2021-11-29]. ISSN 87563282. Dostupné z: doi:10.1016/8756-3282(93)90081-K <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/875632829390081K>
5. CURREY, JD 2006, *Bones: Structure and Mechanics*, Princeton University Press, Princeton. Available from: ProQuest Ebook Central. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/detail.action?docID=1441378>
6. Shear-torsional-compression-tension-stress-forces [online]. In: . [cit. 2022-07-30]. Dostupné z: http://images.books24x7.com/bookimages/id_9027/fig12-1.jpg
7. ZHANG, G., et al. Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2005, 5.1: 5-21.
8. THORPE, Chavaunne T. a Hazel R. C. SCREEN, 2016. Tendon Structure and Composition. *Metabolic Influences on Risk for Tendon Disorders* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016-08-18, 3-10 [cit. 2022-06-17]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN 978-3-319-33941-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-33943-6_1

9. ČIHÁK, Radomír. Anatomie. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-3817-8.
10. BENEDICT, James V, Leon B WALKER a Edward H HARRIS, 1968. Stress-strain characteristics and tensile strength of unembalmed human tendon. *Journal of Biomechanics* [online]. **1**(1), 53-63 [cit. 2022-06-17]. ISSN 00219290. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9290(68)90038-9
11. WANG, James H.-C., 2006. Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics* [online]. **39**(9), 1563-1582 [cit. 2022-06-17]. ISSN 00219290. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiomech.2005.05.011
12. WREN, Tishya A.L, Scott A YERBY, Gary S BEAUPRÉ a Dennis R CARTER, 2001. Mechanical properties of the human achilles tendon. *Clinical Biomechanics* [online]. **16**(3), 245-251 [cit. 2022-06-19]. ISSN 02680033. Dostupné z: doi:10.1016/S0268-0033(00)00089-9
13. SEYNNES, O. R., J. BOJSEN-MØLLER, K. ALBRACHT, A ARNDT, N. J. CRONIN, T. FINNI a S. P. MAGNUSSON, 2015. Ultrasound-based testing of tendon mechanical properties: a critical evaluation. *Journal of Applied Physiology* [online]. **118**(2), 133-141 [cit. 2022-06-20]. ISSN 8750-7587. Dostupné z: doi:10.1152/jappphysiol.00849.2014
14. MIYAZAKI, Hiroshi a Kozaburo HAYASHI. Biomedical Microdevices [online]. **2**(2), 151-157 [cit. 2022-06-20]. ISSN 13872176. Dostupné z: doi:10.1023/A:1009953805658
15. MACHOVA URDZIKOVA, Lucia, Radek SEDLACEK, Tomas SUCHY, et al., 2014. Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat. *BioMedical Engineering OnLine* [online]. **13**(1) [cit. 2022-06-20]. ISSN 1475-925X. Dostupné z: doi:10.1186/1475-925X-13-42

7. Seznam obrázků

Obrázek 1 – Ukázka Wolffova zákona. Lze vidět, že se trámčové elementy tvoří ve směru zatěžování [3]	9
Obrázek 2 – Zleva: tah, tlak, smyk [6]	11
Obrázek 3 – Diagram závislosti relativní deformace (x) na napětí (y) [4].....	12
Obrázek 4 – Srovnání vysušené (vlevo) a hydratované (vpravo) kosti v diagramu napětí-deformace [4].....	14
Obrázek 5 – Vzorky pro tahovou zkoušku kortikální kosti (vlevo) a spongiózní kosti (vpravo) [4].....	15
Obrázek 6 – Tříbodový (nahore) a čtyřbodový (dole) ohyb [4]	16
Obrázek 7 – Fibroblasty [9].....	17
Obrázek 8 -Sstavba šlachy [9]	17
Obrázek 9 – Diagram závislosti napětí na poměrné deformaci pro šlachu	18
Obrázek 10 – Schéma aparatury na měření mechanických vlastností patelární šlachy [13]	20
Obrázek 11 – Uchycení lidské Achillovy šlachy při zkoušce tahem [12].....	22
Obrázek 12 – Rozdělení vzorků do skupin.....	24
Obrázek 13 – Hydratace vzorku	24
Obrázek 14 – Rozdělní šlach do skupin a jejich hydratace	24
Obrázek 15 – Diagram závislosti síly na posuvu pro vzorek D306	26
Obrázek 16 – Směrnice lineární části diagramu síla-posuv reprezentující tuhost vzorku číslo D306. $S = 757,13 \text{ N} \cdot \text{mm}^{-1}$	27
Obrázek 17 – Q-Q graf z dat naměřené síly pro skupinu A. Můžeme pozorovat malý rozptyl kolem přímky, rozdělení dat je tudíž normální. Vodorovná osa síla [N], svislá osa hodnoty kvantilů pro normální rozložení	28
Obrázek 18 – Systém MTS Mini Bionix 858.02 se speciálním přípravkem.....	29
Obrázek 19 – Potkaní femur na přípravku pro tříbodový ohyb.....	30
Obrázek 20 – Eliptický průřez střední části potkaního femuru	31
Obrázek 21 – Rozložení hodnot maximální síly skupiny A – placebo, B – 2,5% 4MU	33
Obrázek 22 – Rozložení hodnot maximální síly skupiny C– placebo, D – 5% 4MU	33
Obrázek 23 – Rozložení hodnot maximálního ohybového napětí pro skupiny A a B	34
Obrázek 24 – Rozložení hodnot maximálního ohybového napětí pro skupiny C a D	34
Obrázek 25 – Rozložení hodnot tuhosti pro skupinu A, B.....	35

Obrázek 26 – Rozložení hodnot tuhosti pro skupinu C, D.....	35
Obrázek 27 – Rozložení hodnot deformační energie pro A, B	36
Obrázek 28 – Rozložení hodnot deformační energie pro C, D	36
Obrázek 29 – Závislost síly na posuvu pro vzorek A17.....	38
Obrázek 30 - Tuhost jako směrnice lineární části, $S = 24,23 \text{ N}\cdot\text{mm}^{-1}$	38
Obrázek 31 – Youngův modul pružnosti pro vzorek A17, $E = 2,13 \text{ MPa}$. (Tečna je protažená pouze pro názornost.)	39
Obrázek 32 – Systém MTS Mini Bionix 858.02 s pneumatickými čelistmi.....	40
Obrázek 33 – Zmrazení svalu tekutým dusíkem	41
Obrázek 34 – Upnutí vzorku do pneumatických čelistí	42
Obrázek 35 – Zatěžování vzorku do destrukce	42
Obrázek 36 – Rozložení hodnot maximální síly skupiny A – placebo, B – 2,5% 4MU	43
Obrázek 37 – Rozložení hodnot maximální síly skupiny C – placebo, D – 5% 4MU	43
Obrázek 38 – Rozložení hodnot maximálního tahového napětí pro skupiny A a B	44
Obrázek 39 – Rozložení hodnot maximálního tahového napětí pro skupiny C a D	44
Obrázek 40 – Rozložení hodnot tuhosti skupiny A – placebo, B – 2,5% 4MU	45
Obrázek 41 – Rozložení hodnot tuhosti skupiny C – placebo, D – 5% 4MU	45
Obrázek 42 – Rozložení hodnot modulu pružnosti v 5 % deformace skupiny A – placebo, B – 2,5% 4MU	46
Obrázek 43 – Rozložení hodnot modulu pružnosti v 5 % deformace skupiny C – placebo, D – 5% 4MU	46

8. Seznam tabulek

Tabulka 1 – koncentrace 4MU a počet potkaních femurů v rámci skupin.....	23
Tabulka 2 – koncentrace 4MU a počet potkaních šlach v rámci skupin	23
Tabulka 3 – změření přípravku na tříbodový ohyb	30
Tabulka 4 - rozměry vzorků ze skupiny A	31
Tabulka 5 – hodnoty maximální síly jednotlivých femurů, průměr skupiny a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D.....	32
Tabulka 6 – hodnoty maximálního ohybového momentu, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D	33
Tabulka 7 – hodnoty maximálního ohybového napětí, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D	34
Tabulka 8 – hodnoty tuhosti, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C a D.....	35
Tabulka 9 – hodnoty deformační energie, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B ..	36
Tabulka 10 – rozměry šlach ve skupině A	41
Tabulka 11 – hodnoty maximální síly jednotlivých šlach, průměr skupiny a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D.....	43
Tabulka 12 – hodnoty maximálního tahového napětí jednotlivých šlach, průměr skupiny a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D.	44
Tabulka 13 – hodnoty tuhosti, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D.....	45
Tabulka 14 – hodnoty modulu pružnosti v 5 % deformace, průměr a směrodatná odchylka skupiny A, B, C, D	46