



České vysoké učení technické v Praze
Fakulta strojní

Experimentální stanovení mechanických vlastností vazů

Bakalářská práce

Štěpánka Haiblíková

Praha, 2015

Anotační list

Název BP: Experimentální stanovení mechanických vlastností vazů
Autor: Štěpánka Haiblíková

Akademický rok: 2014/2015
Studijní program: Teoretický základ strojního inženýrství
Ústav: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
Vedoucí práce: doc. Ing. Zdeněk Horák, Ph.D.
Konzultant: Ing. Josef Šepitka, Ph.D.

Počet stran: 39
Počet obrázků: 16
Počet tabulek: 6

Klíčová slova: mechanické vlastnosti, vazy, hlezenní kloub, nanoindentace, kvazistatická metoda Olivera a Pharra

Anotace:

Bakalářská práce se zabývá experimentálním měřením mechanických vlastností vazů hlezenního kloubu. Zkoumány byly vzorky tří vazů, které byly odebrány během operace. Konkrétně se jednalo o *lig. deltoideum*, *lig. tibiofibulare anterius* a *lig. fibulotalare anterius*. U těchto vazů byly stanoveny za použití nanoindentační techniky měření v kvazistatickém režimu hodnoty redukováného modulu pružnosti E_{red} a kontaktního tlaku H_{IT} . Z naměřených dat byly uvedené mechanické parametry určeny kvazistatickou metodou analýzy Olivera a Pharra. Snahou bylo zjistit mechanické vlastnosti, které vaz vykazuje v přirozených podmínkách lidského těla, čemuž musela být přizpůsobena příprava vzorků, jejich skladování i průběh měření.

Title: Experimental measurement of mechanical properties of ligaments

Keywords: mechanical properties, ligaments, ankle joint, nanoindentation, quasi-static method of analysis by Oliver and Pharr

Abstract:

Experimental measurement of mechanical properties of ligaments of the human ankle joint is the main aim of this study. There were three samples removed during the surgery which was subjected to research. *Lig. deltoideum*, *lig. tibiofibulare anterius* and *lig. fibulotalare anterius* specifically. Using instrumented nanoindentation technique at quasi-static mode, the reduced modulus of elasticity E_{red} and contact pressure H_{IT} were determined. Mechanical characteristics were computed from the measured data by means of quasi-static method of analysis by Oliver and Pharr. The aim was to establish the mechanical properties of the wet preparation, hence the preparation of the samples, their storage and the experiment itself had to be adapted.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím literatury uvedené v seznamu.

V Praze dne: 12. června 2015

Podpis:

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat doc. Ing. Zdeňku Horákovi, Ph.D. za vedení této bakalářské práce, za rady, které tuto práci obohatily a za všechny čas, který mi věnoval. Děkuji také Ing. Josefu Šepitkovi, Ph.D. za naměření dat, za cenné konzultace a věcné připomínky. Také bych ráda poděkovala 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze za spolupráci a poskytnutí vzorků, zejména slečně Alžbětě Blankové za přípravu vzorků, za její odborné rady a ochotu. Vznik této práce byl podpořen grantovým projektem SGS13/176/OHK2/3T/12: Biomechanika struktur lidského těla, jejich náhrad a interakce s blízkým okolím.

Obsah

Obsah	3
Seznam obrázků	4
Seznam tabulek	5
Seznam použité symboliky	6
1 Úvod	7
1.1 Motivace práce	8
1.2 Cíle práce	8
2 Anatomie hlezenního kloubu a jeho vazů	9
3 Provedená experimentální měření	13
3.1 Úvod do problematiky	13
3.2 Chování vazů při tahové zkoušce	13
3.3 Přehled experimentálních měření	14
3.4 Shrnutí rešerše	18
4 Kvazistatická metoda analýzy Olivera a Pharra	19
4.1 Nanoindentace	19
4.2 Historický vývoj metody	20
4.3 Kvazistatická metoda analýzy Olivera a Pharra	22
5 Experimentální měření	26
5.1 Příprava vzorků	26
5.2 Průběh měření	27
5.3 Naměřená data	30
6 Diskuze	32

6.1	Zhodnocení naměřených dat	33
6.2	Možné příčiny odlišných hodnot	33
6.3	Návrh vylepšení metodiky testování	36
7	Závěr	37
	Seznam použité literatury	38

Seznam obrázků

2.1	Pohled na vazivový aparát dolní končetiny zezadu, převzato z [12].	11
2.2	Boční pohled z vnější strany na vazivový aparát dolní končetiny, převzato z [12].	12
2.3	Boční pohled z vnitřní strany na vazivový aparát dolní končetiny, převzato z [12].	12
3.1	Diagram tahové zkoušky kolaterálního vazy hlezenního kloubu, převzato z [16].	15
4.1	Schématické znázornění odlehčovacího procesu pro zobrazení parametrů určujících kontaktní plochu.	22
5.1	Schématické znázornění ovlivněné oblasti při nanoindentaci.	27
5.2	Schématické znázornění nanoindentace lubrikovaného vzorku.	28
5.3	Znázornění závěrečného posunutí počátku souřadnicového systému indentační křivky.	29
5.4	Zatěžovací funkce, jež byla použita pro nanoindentaci všech vzorků.	29
5.5	Ukázka tří indentačních křivek naměřených testováním <i>lig. deltoideum</i> (Vzorek 1).	30
5.6	Ukázka tří indentačních křivek naměřených testováním <i>lig. tibiofibulare anterius</i> (Vzorek 2).	31
5.7	Ukázka tří indentačních křivek naměřených testováním <i>lig. fibulotalare anterius</i> (Vzorek 3).	31
6.1	Porovnání jednotlivých indentačních křivek měřených vzorků.	32
6.2	Snímek struktury - Vzorek 1.	33
6.3	Snímek struktury - Vzorek 2.	33
6.4	Snímek struktury - Vzorek 3.	33

Seznam tabulek

3.1	Přehled hodnot maximálního zatížení vazů zjištěných experimentem vedeným Attarianem a spol., převzato z [2].	14
3.2	Přehled hodnot maximálního zatížení a Youngova modulu pružnosti kolaterálních vazů hlezenního kloubu zjištěných experimentem vedeným Sieglerem a spol., převzato z [16].	15
5.1	Přehled vazů, u kterých byla provedena analýza mechanických vlastností.	26
5.2	Použité experimentální vybavení.	27
5.3	Tabulka zjištěných průměrných hodnot redukovaného modulu pružnosti E_{red} a kontaktního tlaku H_{IT} pro dané vzorky.	30
6.1	Tabulka porovnávací výsledný redukovaný modul pružnosti získaný nanoindentací a Youngův modul určený tahovou zkouškou.	34

Seznam použité symboliky

Fyzikální veličiny

E	... Youngův modul pružnosti [MPa]
E_{red}	... redukovaný modul pružnosti [MPa]
H	... tvrdost [MPa]
H_{IT}	... indentační tvrdost (kontaktní tlak) [MPa]
P	... zatížení [N]
P_{max}	... maximální zatížení [N]
β	... korekční parametr [1]
ϕ	... poloviční vrcholový úhel [°]
m	... materiálová konstanta [1]
ϵ	... geometrická konstanta [1]
S	... tuhost [N/mm]
S_{max}	... kontaktní tuhost (tuhost při počátečním odlehčení) [N/mm]
a	... poloměr kontaktu při maximálním zatížení [μm]
h_{max}	... hloubka při maximálním zatížení [μm]
h_f	... zbytková hloubka při odlehčení [μm]
h_c	... příčná vzdálenost kontaktu [μm]
h_s	... posuv povrchu na poloměru kontaktu [μm]

Zkratky

MKP	... metoda konečných prvků
AFM	... mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy)
SFA	... měření povrchových sil (Surface Force Apparatus)
PMMA	... polymethylmetakrylát
ATiF	... <i>lig. tibiofibulare anterius</i>
PTiF	... <i>lig. tibiofibulare posterius</i>
ATiT	... <i>lig. tibiotalare anterius</i>
TiV	... <i>lig. tibionaviculare</i>
PTiT	... <i>lig. tibiotalare posterius</i>
ATaF	... <i>lig. fibulotalare anterius</i>
FC	... <i>lig. fibulocalcaneare</i>
PTaF	... <i>lig. fibulotalare posterius</i>

Kapitola 1

Úvod

Kloubní vazy jsou měkké tkáně spojující k sobě artikulující kosti. Jejich funkcí je umožnit, ale také vymezit pohyb kloubu a podílet se na jeho stabilitě. Jsou tvořeny pojivovou tkání složenou především ze svazků kolagenních vláken, mezi kterými se vyskytují specializované buňky zvané fibroblasty. Svazky vláken jsou orientovány směrem, který závisí na tom, jakému pohybu zabraňují. Díky této skutečnosti vazy disponují vysoce anizotropními vlastnostmi. Mezi jednotlivými svazky se proplétají cévy a nervová vlákna. Je tedy zřejmé, že jejich struktura nemůže být považována za homogenní a přesné určení jejich mechanických vlastností nebude jednoduché.

V poslední době dochází ke stále většímu rozvoji v oblasti mechanického testování biologických materiálů. Znalost jejich mechanických vlastností přispívá v první řadě k porozumění jejich funkce, příčinám poranění a k jejich optimální chirurgické náhradě. Jelikož biologické materiály vykazují vysoce optimalizovanou strukturu, mnohdy se také stávají inspirací pro vývoj v oblasti materiálového inženýrství. V současné době je k dispozici velké množství informací o mechanickém chování tkání v lidském těle. Co se však týče vazivového aparátu hlezenního kloubu, jsou zde stále velké mezery v popisu mechanického chování jeho jednotlivých částí.

Úkolem této práce je experimentálně stanovit mechanické vlastnosti vazů podílejících se na stabilitě hlezna, které by dále měly sloužit jako vstupní data pro MKP model dolní končetiny. Předmětem zkoumání jsou *lig. deltoideum*, *lig. tibiofibulare anterius* a *lig. fibulotalare anterius*. Snahou bude testováním nativní tkáně změřit mechanické vlastnosti, které budou co nejvíce odpovídat mechanické odezvě vazů v lidském těle. Proto musí být bráno v potaz, že se jedná o materiál, který je vysoce anizotropní a nehomogenní. Materiál, který v oblasti mimo lidské tělo vysychá. Určení správných mechanických vlastností vazů, nebo biologických materiálů obecně, je tedy velmi obtížné.

Jelikož je vaz nehomogenní a anizotropní materiál, je nutné použít metodu, která bude testovat materiál lokálně a poskytne zmapování mechanických vlastností celé jeho struktury, namísto měření mechanických vlastností materiálu, jako celku. Jednou z vhodných metod pro lokální měření mechanických vlastností je nanoindentace. Právě technikou nanoindentačního testování bude v tomto experimentu provedeno měření vybraných vazů. U uvedených vazů budou zjišťovány hodnoty redukovaného modulu pružnosti E_{red} a kontaktního tlaku H_{IT} .

1.1 Motivace práce

Vznikl požadavek na vytvoření MKP modelu dolní končetiny. Je proto potřeba zjistit parametry popisující mechanické chování vazů lidského hlezenního kloubu, které by dále sloužily jako vstupní hodnoty. Jelikož hodnoty mechanických parametrů jednotlivých vazů lidského hlezenního kloubu nejsou k dispozici, je potřeba vhodnou metodou testování tyto parametry stanovit. Aby byla zaručena jejich správnost je zapotřebí testovat vzorky, které budou vykazovat v průběhu jejich experimentálního měření mechanické vlastnosti odpovídající skutečnému mechanickému chování vazů v přirozených podmínkách lidského těla.

1.2 Cíle práce

Cílem této práce je experimentálně stanovit mechanické vlastnosti vazů hlezenního kloubu. K tomu byly stanoveny dílčí cíle:

1. provedení literární rešerše dané problematiky,
2. návrh a příprava metodiky experimentálního měření,
3. realizace experimentálního měření,
4. zpracování výsledků experimentu.

Kapitola 2

Anatomie hlezenního kloubu a jeho vazů

Cílem této práce je určit mechanické vlastností vazů hlezenního kloubu. Abychom ale tyto vazy mohli zkoumat mechanicky, je také potřeba znát jejich základní anatomii. V následující části bude popsán hlezenní kloub současně s jeho funkcí, obecná struktura vazů a jeho upnutí ke kosti. Na závěr budou uvedeny názvy a polohy všech vazů, podílejících se na stabilitě hlezenního kloubu. Toto je nezbytné nejen pro osvětlení používaných pojmů, definování měřených vzorků a vymezení jejich přesné polohy na lidském těle, ale také proto, aby nám anatomie případně pomohla vysvětlit výsledky experimentu. Následující teorie byla převzata z odborné literatury [3][7].

Articulatio talocruralis (hlezenní kloub, horní kloub zánártní)

Hlezenní kloub má při chůzi klíčové postavení v dynamickém přenosu hmotnosti těla z dolní končetiny na podložku, neboť současně s přenosem váhy musí být udržena tělesná rovnováha. Toto vyžaduje jednak dostatečnou stabilitu, ale také umožnění potřebného rozsahu pohybu. Hlezenní kloub je typem složený, tvarem připomínající kladku, jeho skelet je tvořen distálním koncem *tibie* a *fibuly*, které jsou spojeny ve vidlici, do níž je zasazena kladka *talus*. Hlavice kloubu je *trochlea tali*, která je vepředu širší, s kloubními povrchy na proximální ploše i na obou bočních plochách. Jamka je vidlice tvořená *tibií* s vnitřním kotníkem a s připojeným zevním kotníkem, který zasahuje distálněji.

Kloubní vazy

Kloubní vazy jsou pruhy hustého vaziva spojující artikulující kosti. Jejich názvy jsou odvozeny například od kosti, kterou spojují, tvaru vazů, jejich vzájemného vztahu a podobně. Jejich hlavní funkcí je zajistit stabilní spojení artikulujících kostí a přitom umožnit jejich vzájemný pohyb. Druh pohybu a jeho rozsah je dán nejen tvarem kloubních ploch, ale i prostorovým uspořádáním vazivového aparátu. Vazivo je pojivová tkáň, kterou tvoří především kolagen.

Kolagenní vlákna vytvářejí paralelně probíhající snopce, mezi kterými se vyskytují řídké rozložené fibroblasty, jež mají dlouhý štíhlý tvar a produkují kolagenní vlákna a další strukturní části vazů. Mezi jednotlivými svazky se proplétají cévy a nervová vlákna. Jednotlivé vazy však mohou mít odlišnou histologii a biochemickou strukturu, což se může projevit na jejich mechanických vlastnostech. V polarizovaném světle je vidět lehce vlnitá struktura vykazující určitou periodicitu. Toto uspořádání má zřejmě funkci tlumiče, který umožňuje určité prodloužení vazů, a to zhruba o 4 až 6 % původní délky a tím i neutralizaci působících mechanických sil.

Způsob upnutí vazů ke kosti je následující. Zatímco povrchová vlákna přecházejí plynule do kostního periostu, hluboká vlákna procházejí při úponu do kosti strukturními změnami. Lze tedy v úponu vazů rozlišit čtyři strukturní zóny. Nejprve vaz tvořený paralelně probíhajícími vlákny přechází ve vazivovou chrupavku tím, že se mezi kolagenními vlákny objevují chrupavčité buňky a základní hmota chrupavky. V blízkosti kosti dále chrupavka kalcifikuje a průběh vláken vazů již není tak pravidelný. Přejít mezi normální chrupavkou a zvápenatělou běžně nazývá „modrá linie“. Odtud pak pronikají nepravidelně uspořádané kolagenní vlákna do kostní tkáně, kdy záleží na typu vazů a směru jeho průběhu, jak hluboko. Takto je zajištěno mechanicky pevné a současně neohebné spojení vazů ke kosti.

Vazivový aparát hlezenního kloubu

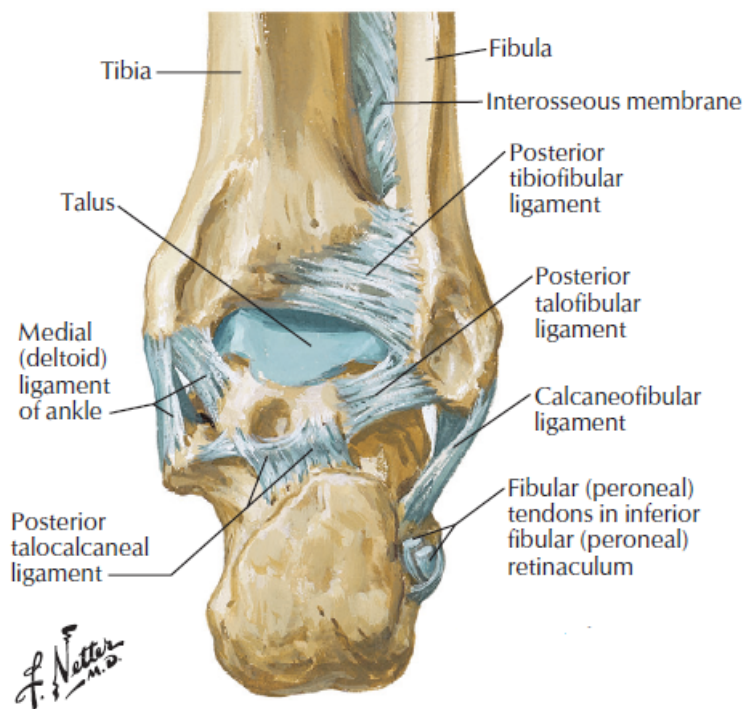
Poněkud slabé kloubní pouzdro, které tvoří základ vazivového aparátu hlezenního kloubu, je zesíleno třemi mohutnými systémy vazů. Tibiofibulární vidlici stabilizují vazy *tibiofibulární syndesmózy* a *trochlea talu* je k oběma kotníkům připevněna dvěma systémy postranních vazů.

Vazy tibiofibulárního spojení

Spojení mezi *tibií* a *fibulou* je v distální části bérce a v oblasti hlezna zajištěno třemi mohutnými vazy. Jedním z těchto vazů je *lig. tibiofibulare interosseum* vyplňující mezeru mezi *tibií* a *fibulou*. Dále to je *lig. tibiofibulare anterius* (dále jen ATiF), jenž se skládá ze tří pod sebou položených částí. Horní část je velmi krátká, ale značně silná, začíná a upíná se nad kostními hrbolky, kde také začíná střední, nejmohutnější část vazů. Dolní, nejdelší a zároveň nejslabší část se upíná pod hrbolky. *Lig. tibiofibulare posterius* (dále jen PTiF) je i přes tvarovou podobnost na rozdíl od vazů předchozího mohutnější a zcela kompaktní. Pro jeho plynulý přechod do *lig. tibiofibulare interosseum* je občas obtížné rozeznat jejich hranici. Na tibií se vaz upíná na kostní vyvýšeninu a jeho dolní část, široká téměř 5 mm, začíná na zadní hraně *tibiie*. V některých literaturách je tato část označována jako samostatná jednotka.

Systém postranních vazů

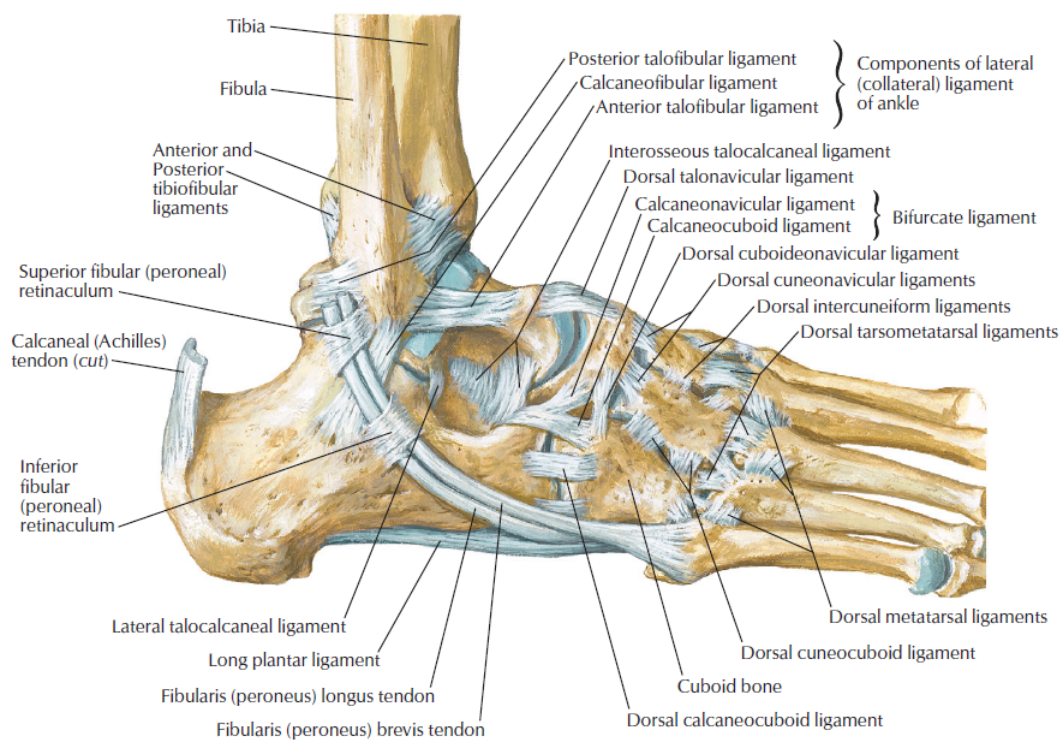
Prvním systémem postranních vazů je vnitřní postranní vaz, *lig. collaterale mediale*, podle tvaru nazýván deltový, pevně srostlý s mediální částí pouzdra. Druhý představuje zevní postranní vaz, *lig. collaterale laterale*, skládající se ze tří samostatných vazů, často označovaných za vazy fibulární.



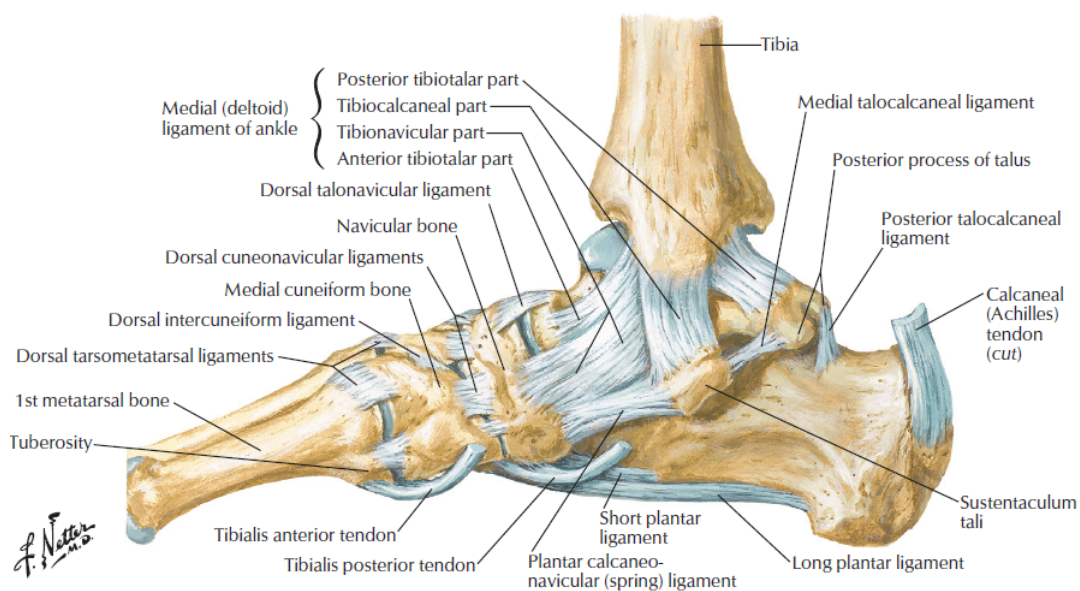
Obrázek 2.1: Pohled na vazivový aparát dolní končetiny zezadu, převzato z [12].

Lig. deltoideum, tvarem připomínající trojúhelník, má část povrchovou a hlubokou. Část povrchovou tvoří *lig. tibiotalare anterius* (dále jen ATiT), jenž se upíná na přední okraj *colliculus anterius* a směřuje šikmo dolů na anteromediální plochu krčku *talu* a napíná se při plantární flexi nohy. Dále *lig. tibionaviculare* (dále jen TiV), nejširší, ale také nejslabší ze všech čtyř pruhů povrchové části. Tento vaz se směrem k úponu vějířovitě rozšiřuje a svým dolním okrajem dosahuje až na *calcaneonaviculare*, tzv. *spring ligament*. *Lig. tibiotalare posterius* (dále jen PTiT) vychází ze zadního okraje *colliculus anterior* a z celého *colliculus posterior*. Napíná se při dorzální flexi hlezna. Hluboká část deltového vazů souvisí s *lig. tibiotalare posterius*. Vybíhá především ze zářezu mezi oběma *kolikuly*. Silné snopce poněkud krátkého vazů probíhají téměř horizontálně laterálním směrem, částečně prominují do kloubní dutiny a upínají se na mediální plochu *trochley talu*. Má značný význam pro stabilitu hlezna tím, že zabraňuje laterálnímu posunu *trochley* ve vidlici *talu*.

Jednotlivé zevní postranní vazy jsou na rozdíl od svého mediálního protějšku zcela samostatné. *Lig. fibulotalare anterius* (dále jen ATaF) je krátký, plochý vaz, který začíná na předním okraji zevní plochy *fibuly* kousek pod úponem *lig. tibiofibulare anterius* a upíná se na *trochleu talu*. Vaz se napíná při inverzi a zabraňuje vysunutí *trochley talu* z tibiofibulární vidlice vpřed. Patří k nejčastěji poraněným vazům lidského těla vůbec. *Lig. fibulocalcaneare* (dále jen FC) je silnější provazec oválného tvaru, začíná na přední ploše hrotu zevního kotníku a upíná se na zevní plochu patní kosti. Nakonec *lig. fibulotalare posterius* (dále jen PTaF) je ze všech tří vazů nejsilnější. Začíná ve *fossa malleoli lateralis* a probíhá téměř horizontálně dorzálním směrem, vějířovitě se rozšiřuje a poté přední, kratší snopce prominují do kloubní dutiny a dorzální, delší snopce dosahují až k *tuberculum laterale*. Tento vaz se napíná při dorzální flexi, nebo everzi nohy a zabraňuje dorzálnímu posunu *talu* vůči tibiofibulární vidlici.



Obrázek 2.2: Boční pohled z vnější strany na vazivový aparát dolní končetiny, převzato z [12].



Obrázek 2.3: Boční pohled z vnitřní strany na vazivový aparát dolní končetiny, převzato z [12].

Kapitola 3

Provedená experimentální měření

3.1 Úvod do problematiky

Hlezenní kloub a jeho vazy představují složitý systém, jehož mechanické vlastnosti nejsou doposud plně prozkoumány. Současně je k dispozici velké množství informací týkajících se mechanického chování vazů a různých faktorů, které toto chování ovlivňují. Nicméně množství informací o mechanických vlastnostech vazivového aparátu hlezenního kloubu je stále do velké míry omezené [16].

Vazy obecně, jež byly v největší míře zkoumány, jsou především vazy v koleni zvířat, zkřížené kolenní vazy člověka a lidské intervertebrální vazy. Tyto experimenty byly prováděny buďto formou tahové zkoušky, nebo za použití mikroskopie atomárních sil (AFM). Výsledky studií ukazují několik důležitých poznatků: (1) starší, porušené nebo nepohyblivé vazy vykazují zvýšenou tuhost, vyšší modul pružnosti v tahu a snížené mezní zatížení a deformaci, (2) zmrazování a rozmrazování nijak významně neovlivňuje mechanické vlastnosti vazů, (3) mechanické vlastnosti vazů jsou necitlivé na změnu teploty v rozmezí (23-45°C) [16].

Co se však týče vazů hlezenního kloubu, množství získaných informací o jejich mechanickém chování, natož konkrétní hodnoty Youngova modulu pružnosti, nejsou ani zdaleka postačující. Přehled experimentů, které se dosud touto problematikou zabývaly, spolu s jejich stručným popisem jsou uvedeny níže. Jedná se pouze o měření tahovou zkouškou, nebyl nalezen žádný záznam o studii vazů hlezenního kloubu pomocí AFM.

3.2 Chování vazů při tahové zkoušce

Vaz vykazuje velmi odlišné mechanické chování ve srovnání s běžnými materiály, což je patrné již z tvaru křivky pracovního diagramu získaného tahovou zkouškou (viz Obr. 3.1). To je způsobeno mírným zvlhčením struktury vazů v nezatíženém stavu, které je viditelné polarizovaným světlem. Mechanické vlastnosti vazů jsou především závislé na vlastnostech kolagenních vláken, na uspořádání a poměru kolagenu a elastinu. Vazy jsou považovány za viskoelastické materiály, což znamená, že mají časově závislé mechanické vlastnosti, které se mění při různých rychlostech deformace. Chování vazů zároveň závisí na předchozím zatížení.

Jelikož u vazů *in vivo* převažuje směr zatěžování ve směru kolagenních vláken, běžné tahové zkoušky se také provádí v tomto směru. Křivku diagramu tahové zkoušky, která je nelineární, můžeme rozdělit do 4 oblastí. (1) V oblasti označované jako *toe region*, kde se při stálém zatěžování zvyšuje tuhost, jsou postupně zapotřebí mnohem větší síly k vyvození stejného prodloužení. Tato část křivky je konvexní. (2) Následuje lineární oblast, kde již došlo k narovnání všech kolagenních vláken a jejich tuhost zůstává konstantní. (3) Ve třetí oblasti může být pozorováno malé, nepravidelné snížení zatěžovací síly v důsledku postupného selhávání několika svazků vláken, kdy je však většina struktury neporušena. (4) Oblast, kde je dosaženo nejvyššího zatížení, které předchází kompletnímu porušení vazů, ať už ve formě roztržení vazů nebo jeho odtržení od kosti, kdy již vaz není schopen dále nést zatížení. Ve fyziologických podmínkách se předpokládá běžné zatížení vazů odpovídající třetině maximálního zatížení [6].

3.3 Přehled experimentálních měření

1985 - Attarian a spol.

Attarian a spol. roku 1985 definovali biomechanické vlastnosti celků vazů s kostí lidského hlezenního kloubu. Bylo testováno 20 lidských hlezenních kloubů, odebraných při pitvě nebo operaci. Preparáty byly zbaveny všech okolních tkání tak, aby zůstala pouze *tibia*, *fibula*, *talus* a *calcaneus*, neporušené *ATaF*, *FC*, *PTaF*, *PTiT* a *ATiT*. Nejprve byly vzorky cyklicky zatěžovány, poté následovalo několik testů za konstantní rychlosti a konečně velmi prudká aplikace zátěže až do chvíle, kdy vzorek praskl. Všechny vazy vykazovaly nelinearitu chování a závislost naměřených dat pracovního diagramu na rychlosti deformace.

Tabulka 3.1: Přehled hodnot maximálního zatížení vazů zjištěných experimentem vedeným Attarianem a spol., převzato z [2].

	<i>Počet vzorků</i>	<i>Maximální zatížení</i>
	[1]	[N]
<i>Lig. fibulotalare anteriorius</i>	12	138,9 ± 23,5
<i>Lig. fibulocalcaneare</i>	16	345,7 ± 55,2
<i>Lig. fibulotalare posteriorius</i>	4	261 ± 32,4
<i>Lig. tibiofibulare</i>	6	713 ± 69,3

Vazy byly mechanicky testovány pomocí Minneapolis Testing System. Vzorky byly uchovány ve vlhku za použití roztoku Ringer laktózy, zamrazeny a nakonec před samotným testováním rozmrazovány po dobu 24 hodin v chladničce. Každý preparát vazů s kostí byl odděleně testován při pokojové teplotě, tj. nebyl ovlivněn ostatními vazů. Všechny vazy byly namáhány tahem ve směru jejich vláken.

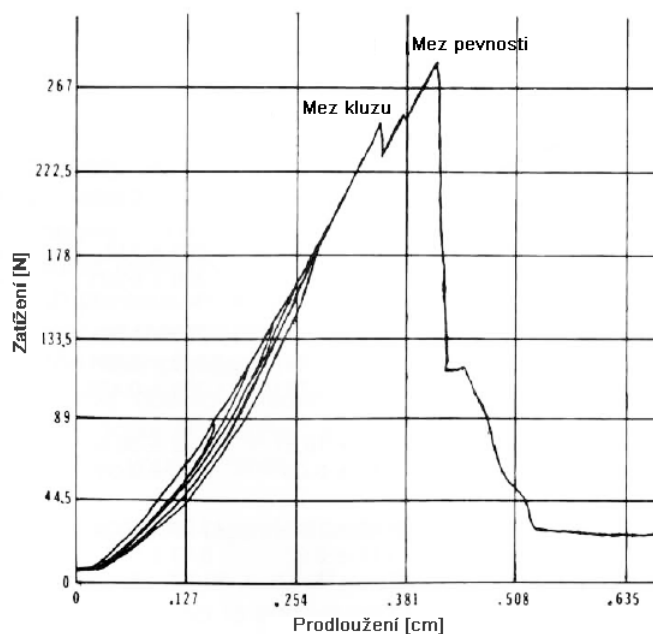
Tab.3.1 obsahuje hodnoty maximálního zatížení a údaj o počtu testovaných vzorků. Obecně nejčastěji poraněný *ATaF* snese také podle výsledků experimentu ze všech testovaných vzorků nejnižší maximální zátěž. Některá data představují široký číselný interval, což ukazuje na velmi proměnlivé mechanické vlastnosti vazů různých hlezenních kloubů [2].

1988 - Siegler, Block a Schneck

Experimentem vedeným Sieglerem a spol. v roce 1988 byly změřeny mechanické vlastnosti všech kolaterálních vazů lidského hlezna z tahových zkoušek provedených na 120 vazech, získaných z 20 dolních lidských končetin (12 žen, 8 mužů), amputovaných ihned po operaci. Testovány byly tyto vazy: *lig. collaterale laterale*, skládající se z *ATaF*, *PTaF* a *FC*, dále *lig. collaterale mediale (lig. deltoideum)*, konkrétně jeho části *TiV*, *TiC* a *PTiT*.

Tabulka 3.2: Přehled hodnot maximálního zatížení a Youngova modulu pružnosti kolaterálních vazů hlezenního kloubu zjištěných experimentem vedeným Sieglerem a spol., převzato z [16].

	<i>Maximální zatížení</i>	<i>Youngův modul pružnosti</i>
	[N]	[MPa]
<i>Lig. fibulotalare anterius</i>	231 ± 129	255,5 ± 181,3
<i>Lig. fibulocalcanearae</i>	307 ± 142	512,0 ± 333,5
<i>Lig. fibulotalare posterius</i>	418 ± 191	216,5 ± 169,5
<i>Lig. tibionaviculare</i>	120 ± 49	320,7 ± 266,5
<i>Lig. tibiotalare posterius</i>	467 ± 209	99,54 ± 79,32



Obrázek 3.1: Diagram tahové zkoušky kolaterálního vazů hlezenního kloubu, převzato z [16].

Vzorky byly připraveny ihned po operaci, poté skladovány při teplotě -20°C a testovány v průběhu 48 hodin. Po dvouhodinovém rozmrazování při pokojové teplotě byla změřena počáteční délka a plocha příčného řezu každého vazů. Pro upevnění vzorků do testovacího zařízení byly části kostí připevněny k vazů z důvodu prodloužení a posílení konce kosti zapsány do polymethylmetakrylátu (PMMA). Následně byla kolmo na osu vazů vyvrtána díra, do které byl vsazen kovový kolík pro připevnění vzorku do držadla upevněného v testovacím zařízení. Na vzorcích byly provedeny tahové zkoušky při nízkých rychlostech deformace (od 7,8%/min

do 27%/min) tak, aby mohly být zanedbány viskózní účinky. Vazy byly zprvu podrobeny 15 předběžným testovacím cyklům a poté několika zatěžovacím a odlehčovacím cyklům, kdy byla zátěžná síla s každým cyklem navýšena o 44,5 N. Takto se pokračovalo až do doby, kdy došlo k prasknutí. Důvodem pro opakování cyklů, namísto spolehnutí se pouze na jednu tahovou zkoušku, bylo ověření opakování křivky tahového diagramu. Průběh pracovního diagramu je vidět na obrázku (Obr. 3.1). Jak je z grafu patrné, vazy vykazují nelineární strukturální chování typické pro měkké tkáně. V průběhu experimentu byl testovací vzorek zvlhčován častým nanášením 10% solného roztoku [16].

1990 - Colville, Marder, Boyl a Zarins

Vypreparované kompletní hlezenní klouby s vazivovým aparátem byly roku 1990 zkoumány Colvillem a spol. Byla měřena deformace kadaverózních laterálních vazů při pohybu kloubu a aplikaci různých druhů zátěže. Konkrétně byly studovány *ATiF*, *FC*, *PTaF*, *ATiT* a *PTiT*. Během měření byly nepřetržitě zaznamenávány deformace vazů při pohybu z dorzální flexe do plantární flexe. Poté bylo měření opakováno za inverze, everze, vnitřní rotace a zevní rotace. Výsledky ukázaly, že deformace *ATaF* při pohybu hlezna do většího úhlu plantární flexe, vnitřní rotace nebo inverze vzrostla a podobně narostla při dorzální flexi také deformace *FC*. Tyto poznatky potvrzují, že *ATaF* a *FC* pracují společně při všech pozicích flexe tak, aby zajistily laterální stabilitu kotníku. Při dorzální flexi narostla také deformace *ATiF* a *PTiF*. Zevní rotace zvýšila deformaci *ATiF* a deformaci *PTiF* snížila [5].

2000 - Funk, Hall, Crandall a Pilkey

Funk a spol. v roce 2000 provedli studii zaměřenou na vytvoření lineárních a nelineárních viskoelastických modelů osmi stěžejních vazů hlezenního kloubu pro počítačové modelování dolní končetiny. Teorie byla založena na viskoelastickém chování vazů, relaxační funkce $R(t)$ byla použita pro výpočet silové odezvy materiálu aplikací Boltzmannova principu superpozice. Lineární viskoelastický model byl prezentován jako kombinace jednotlivých pružin a tlumičů zastupujících elastické a viskózní složky materiálu. Jelikož biologické materiály vykazují nelineární chování při větších deformacích, byla použita Fungova kvazi-lineární teorie. Ke studii bylo vybráno 8 vazů tvořících hlavní strukturu podílející se na pohybu hlezenního kloubu. Jsou to *ATaF*, *ATiF*, *ATiT*, *CF*, *PTaF*, *PTiF*, *PTiT* a *TiC*. Bylo odebráno 29 kadaverózních preparátů vazů s kostí ze tří párů amputovaných dolních končetin, jež byly skladovány v mrazu a opět rozmrazeny 24 hodin před pitvou. Po vypreparování byly vzorky uchovány v -4°C a otestovány v průběhu jednoho týdne. V den testování byly vzorky rozmrazeny, zabaleny do gázy nasáklé roztokem fosfátového pufru pro udržení vlhkosti vzorku a upevněny na testovací zařízení. V servo hydraulickém testovacím zařízení pak vzorky podstoupily sérii testů zaměřených na viskoelastické chování materiálu [9].

2003 - Takebayashi

Roku 2002 Takebayashi a spol. zkoumali biomechanické vlastnosti laterálních vazů hlezenního kloubu v závislosti na přítomnosti mechanoreceptorů. Vykonali tahové zkoušky na zvířecích vzorcích a získaly křivku závislosti zátěžné síly na prodloužení. Jelikož cílem experimentu bylo pouhé porovnání mechanických vlastností uprostřed a na proximálním konci vazů, nebyla výsledná data dále zpracována [18].

2004 - Butler a Walsh

V roce 2004 byla dokončena studie Butlera a Walshe zabývající se mechanickou odezvou vazů hlezenního kloubu při malých zátěžích. Vlastnosti vazů při malých zátěžích hrají významnou roli ve statické stabilitě kotníku. Bylo zkoumáno 8 hlezenních kloubů, získaných od subjektů průměrného věku 65 let, u kterých byly okolní tkáně vyříznuty tak, aby zbyly pouze vazy obklopující kloub. Kadaverózní vzorky byly dále skladovány při teplotě -20°C , poté následovalo rozmrazování po dobu 48 hodin, aby mohly být vypreparovány jednotlivé vazy. Po vypreparování byly vazy zamrazeny v gáze nasáklé fosfátovým puřrem (PBS, pH 7,4) a otestovány do jednoho týdne. Před testováním byly vzorky ponořeny do fosfátového puřru o teplotě 37°C po dobu 30 minut. Testování bylo prováděno na zařízení Micromechanical testing system. Měřeny byly vazy mediální: *PTiT*, *ATiT*, *TiC* a laterální: *ATaF*, *PTaF*, *FC*, *ATiF* a *PTiF*.

Relaxační zkoušky byly provedeny při 30% a 10% deformace v axiálním směru. Nezahrnovaly zatížení mimo osu, k čemuž však může v reálných podmínkách v lidském těle dojít. Experiment ukázal, že se všechny vazy zotavily i při zatížení menším než 5 N a také skutečnost, že se *ATaF* nezotaví do stejné míry jako ostatní laterální vazy. Při každém kroku testování byly získány křivky zatížení v závislosti na čase. Jelikož je laterální zaoblení *talus* oproti mediálnímu větší, více rotací se při dorzální nebo plantární flexi děje na straně laterální. To je podáno jako jeden z důvodů, proč jsou v těchto místech tři oddělené vazy a pouze jeden souvislý deltový vaz se nachází na straně mediální. Při vyšších napětích nesou laterální vazy větší zátěž než vazy mediální, naopak při nižších napětích se zdají být (s výjimkou *lig. tibiofibulare posterius* a *anterius*) zatížení jednotlivých vazů podobná. Výsledky také ukázaly, že při nižší zátěži absorbují mediální vazy větší energii. Mediální vazy byly shledány nejsilnějšími a nejšířšími ze všech studovaných vazů. Také na zátěž reagují rychleji než vazy laterální, což odpovídá jejich pozici, kdy na laterální straně hlezenního kloubu dochází k větším pohybům právě díky geometrii *talus* [4].

2007 - Ramazanoglu a Ucisik

Ramazanoglu a Ucisik v roce 2007 testovali vazy hlezenního kloubu. Výsledkem experimentu byly data závislosti zatížení, deformace a času. Měření bylo za použití Instron Universal Testing Machine provedeno na čtyřech kadaverózních vazech, jež byly až do chvíle testování skladovány ve fyziologickém roztoku. Spolu s klasickou tahovou zkouškou byly také provedeny testy cyklického zatěžování na třech úrovních zátěže. Každý z vazů projevil vysoce anizotropní chování a bylo pozorováno, že náhle změny v rychlosti deformace způsobovaly také změny v tuhosti vazů [15].

3.4 Shrnutí rešerše

Tímto příspěvkem končí do této doby publikovaná experimentální měření zabývající se mechanickými vlastnostmi vazů hlezenního kloubu. Jejich výsledky však nemohou být považovány k sestavení MKP modelů dolní končetiny za dostačující z několika důvodů.

Prvním důvodem jsou konkrétní získané hodnoty Youngova modulu pružnosti, které byly v 80. letech naměřeny Sieglerem a spol. Tyto hodnoty se nejen pohybují v příliš širokém intervalu, ale také se jedná o jediné dosud naměřené hodnoty. Proto nemohou být porovnány s jinými výsledky a tím ověřena jejich správnost. Výsledky tohoto experimentu však mohou posloužit pro srovnání s hodnotami redukováného modulu pružnosti, které budou stanoveny experimentálním měřením, jenž je předmětem této práce.

Většina vzorků byla testována formou tahové zkoušky a vaz přitom zůstal připevněn na část kosti, pomocí které byl dále upnut do testovacího zařízení. Následně byla zkoumána mechanická odezva tohoto celku. To vede hned k několika nedostatkům měření. Jelikož je zaznamenáno celkové prodloužení vzorku, tedy i kosti a upínacího systému, nelze určit skutečné prodloužení vazů, které je potřeba k dalším výpočtům. Ve skutečnosti je toto přídatné prodloužení velmi malé, uvádí se i jako zanedbatelné. Na druhou stranu jak ovlivní naměřená data není známo. Testováním samotného vazů se zajisté dosáhne správnějších výsledků.

Struktura vazů nemůže být považována za homogenní, což vede k dalšímu nedostatku testování tahovou zkouškou, při které jsou určovány mechanické vlastnosti vazů jako celku. Nao-pak mnohem přesnějšího mechanického popisu vazů by bylo dosaženo jeho lokálním měřením. Veškeré tyto nedostatky vedou k zamýšlení se nad novou technikou testování. Jelikož nanoindentace splňuje všechny zmíněné požadavky, zdá se být pro testování vazů daleko vhodnější metodou.

Dalším výrazným nedostatkem některých experimentů je měření kadaverózní tkáně, jejíž mechanické chování ve skutečnosti nemusí odpovídat mechanickým vlastnostem vazů *in vivo*. Pro co nejbližší určení těchto mechanických vlastností, které by vaz vykazoval v přirozeném prostředí, bude proto potřeba testovat čerstvé vzorky. Ty budou muset být řádně skladovány až do doby jejich testování a samotné měření bude potřeba provést v co nejkratší době od operace. Ve většině experimentů byly měřené vzorky v průběhu testování zvlhčovány. V uvedených případech to bylo 10% solným roztokem, fyziologickým roztokem nebo roztokem fosfátového pufru. I přesto však nemohlo být zamezeno určitému vysychání tkáně. U nanoindentací techniky je měření prováděno přímo v prostředí fyziologického roztoku, kterým je vzorek zakápnut, a tím je udržována stálá vlhkost tkáně.

Závěrem všech experimentů jsou důležité poznatky o chování vazů hlezenního kloubu, které jsou přínosné pro další zkoumání tohoto biologického materiálu. Avšak stále tu je jistá mezera v přiřazení mechanických vlastností jednotlivým vazům hlezenního kloubu. Nejen, že výsledkem nejsou hodnoty, se kterými by se dalo dále pracovat, ale zároveň nebyly otestovány všechny vazy podílející se na stabilitě hlezna. Ze všech těchto důvodů je tedy potřeba vytvořit nová a přesnější data popisující mechanické chování zkoumaných vazů a to za použití techniky, která je pro testování tohoto materiálu vhodná.

Kapitola 4

Kvazistatická metoda analýzy Olivera a Pharra

4.1 Nanoindentace

Biologické materiály mohou být rozděleny s ohledem na jejich mechanické vlastnosti. Pevné tkáně, jako je kost, mají větší tvrdost a Youngův modul pružnosti, zatímco měkké tkáně, např. vazy, jsou většinou vysoce viskoelastické a jejich mechanická odezva závisí na čase a rozsahu zatížení. Oba typy materiálů představují značně optimalizovanou strukturu, která má ideální uspořádání pro příslušné zatížení a podmínky prostředí a také je schopna se změně těchto podmínek přizpůsobit. V důsledku jejich stupňovitě rozvrstvené struktury nemohou být považovány za homogenní, a proto je důležité zavést odlišnou techniku testování pro správné určení jejich mechanických vlastností. Testování biologických materiálů je podrobena mnoha omezením, jako jsou malé veličiny a rozměry, a tím i potřeba aplikace vysoce lokalizované metody. Jednou touto metodou je nanoindentace, jež je široce využívána v mnoha oblastech vědy o materiálech [8].

Nanoindentace obecně je přímá metoda měření lokálních mechanických vlastností materiálu ve velmi malém měřítku, tj. mikromechanických vlastností materiálu. Využívá ostrý diamantový hrot, který je zatěžován silou, díky čemuž dochází ke kolmému vniknutí hrotu do povrchu zkoumaného vzorku. V průběhu měření se monitoruje závislost působící síly na hloubce vtisku a tím se vykresluje křivka závislosti $P-h$. Z naměřené závislosti lze později získat základní mechanické vlastnosti vzorku, jako je tvrdost a Youngův modul. Rozsah sil používaných při nanoindentacích měřeních je v řádu μN až mN . Ideální testovací zařízení musí mít tedy možnost aplikovat malé zátěžné síly, systém musí mít nízký systémový šum, musí být umožněna přesná kontrola, rozlišení hloubky vpichu a přesné polohování měřicího hrotu vůči objektům na povrchu vzorku, nejlépe s rozlišením nanometrů. Nanoindentaci lze provést v kvazistatickém režimu, kdy hrot indentoru v průběhu měření nekmitá, nebo ve stále více používaném dynamickém režimu, kdy je hrot během indentace zatěžován periodickou silou a data jsou dále zpracována dynamickou mechanickou analýzou. Tato technika je ideální právě pro testování viskoelastických materiálů nebo velmi tenkých filmů [11].

Dodnes byly vyvinuty tři odlišné metody a přístroje pro měření mechanických vlastností v nanoměřítku. První je metoda založená na měření povrchových sil (SFA) od Israelachviliho a Tabora, dále je to mikroskopie atomárních sil (AFM), kterou vyvinul Binning, Quate

a Gerber a poslední metodou je indentační metoda, při které je snímán odpor materiálu proti vniknutí ostrého hrotu, kterou navrhli Pethica, Hutching a Oliver [1].

Metoda pro vyhodnocení naměřených dat aktuálně používaná ve většině nanoindentačních experimentů, byla odvozena v roce 1992 W. Oliverem a G. Pharrm. Ti zrealizovali myšlenku, původně představenou J. Pethicou, R. Hutchingsem a W. Oliverem, zahrnout tvar indentačního hrotu do výpočtů, aby byla brána v úvahu nelinearita křivky odlehčování. Jedná se o takzvanou kvazistatickou metodu, jež se používá ke stanovení mechanického chování materiálů v malém měřítku, tj. k určení materiálových konstant, jako jsou tvrdost H a Youngův modul pružnosti E . Jelikož od této doby došlo k určitému vylepšení testovacích zařízení a technik, úpravám metody a vysvětlení dříve neobjasněných jevů, jako například mechaniky elasticko-plastického kontaktu, byla tato metoda později, v roce 2003, svými původními autory aktualizována. V následujících odstavcích bude představen historický vývoj, základní principy, o které se tato metoda opírá a obecný postup její realizace [8][13][14].

4.2 Historický vývoj metody

Boussinesq jako první vytvořil v 19. století metodu pro výpočet působící síly a hloubky vtisku v elastickém materiálu zatíženém pevným osově souměrným indentorem. Z této teorie bylo později odvozeno řešení několika důležitých geometrií, jako je válcový a kuželový indenter. Současně *Hertz* popsal problém pružného kontaktu mezi dvěma kulovými povrchy s rozdílným poloměrem a elastickými parametry. Tím poskytl řešení, podle kterého je do analýzy zahrnuta poddajnost indentoru.

Dalším klíčovým okamžikem byl přínos *Sheddona*, který odvodil základní vztah mezi zatížením, posuvem a kontaktní plochou platný pro jakýkoliv indenter, který může být popsán jako dokonale tuhý předmět, jehož tvar vznikl rotací hladké funkce. Na základě výsledků jeho experimentu byl popsán vztah mezi zatěžující silou a posuvem jako:

$$P = \alpha \cdot h^m, \quad (4.1)$$

kde P je zatížení indentoru, h elastický posuv a m konstanta, která nabývá hodnot pro válec $m=1$, kužel $m=2$, kouli $m=1.5$, rotační paraboloid $m=1.5$.

Mnohem rozsáhlejší problémem je však řešení indentačního kontaktu, kde je obsažena určitá plasticita. Jelikož směrodatné rovnice nejsou lineární a musí být bráno v potaz množství parametrů popisujících materiál (mez kluzu, mechanické zpevnování), nelze dosáhnout snadného analytického řešení.

Tabor věnující se indentaci několika kovů, deformovaných tvrzenými kulovými indentory, byl prvním, kdo použil snímání závislosti působící síly na hloubce vpichu pro určení mechanických vlastností materiálu. Experimentálně přišel na velmi důležitou skutečnost. Vtisk vytvořený kulovým indentorem je stále kulový s nepatrně větším rádiusem, než má indenter. Stejně tak u kuželového indentoru je vtisk opět kuželový s větším vrcholovým úhlem. Význam tohoto zjištění je, že pokud vezmeme v potaz tvar zdeformovaného povrchu, plasticita nám neovlivní data elastického odlehčení. Výsledky ukazují, že tvar celé křivky odlehčení a část zotaveného posunutí mohou být spojeny s modulem pružnosti a velikostí kontaktního vtisku pro kulový i kuželový indenter. Také průměr kontaktního vtisku na povrchu, vytvořeném kuželovým indentorem, se nezotaví v průběhu odlehčování, pouze hloubka. Kvůli možnému výskytu

určitého množství plasticity při počátečních zatěžovacích cyklech musí být indenter před tím, než dojde k dokonale vratnému chování závislosti, několikrát zatížen a znovu odlehčen. Nepřesnosti do výpočtu může zanést vliv poddajnosti indentoru na chování závislosti působící síly na posuvu. Ten může být zahrnut do analýzy definicí redukovaného modulu pružnosti, pro který platí:

$$\frac{1}{E_{red}} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}, \quad (4.2)$$

kde E je Youngův modul pružnosti, E_{red} je redukovaný modul pružnosti, ν Poissonova konstanta a parametry s indexem i popisují indenter.

Bulychev, Alekin, Shorshorov a kol., naměřili indentační data závislosti působící síly na hloubce vtisku. Data byla dále analyzována podle rovnice, jež byla později Kingem korigována parametrem β :

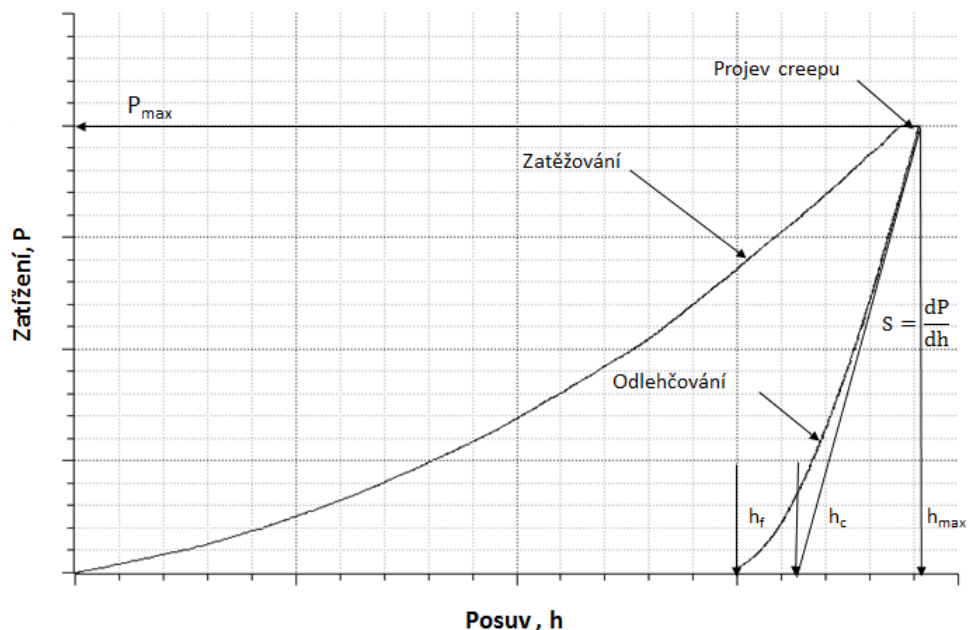
$$S = \frac{dP}{dh} = \beta \cdot \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot E_{red} \cdot \sqrt{A}, \quad (4.3)$$

kde S je experimentálně měřená tuhost, A průmět plochy elastického kontaktu a β bezrozměrný parametr.

Parametr β je v případě malých deformací elastického materiálu, jež jsou vyvolány osově souměrným indentorem hladkého profilu, roven jedné. Ve skutečnosti jsou však indentační experimenty prováděny osově nesymetrickými indentory a zahrnují velké deformace, je tedy třeba za parametr β dosadit jinou hodnotu. Byly vedeny mnohé experimenty a výpočtové analýzy zabývající se tímto problémem, také Oliver a Pharr pomocí metody konečných prvků stanovili tento parametr pro případ kuželového indentoru, s polovičním vrcholovým úhlem $70,3^\circ$, roven $\beta=1.07$ pro většinu materiálů. Nakonec shrnuli poznatky do závěru, že hodnoty parametru spadají do intervalu $\langle 1.0226; 1.085 \rangle$. Za dobrou volbu parametru se považuje hodnota navržená Chengem 1.05 s chybou přibližně $\pm 0,05$.

Měřením tuhosti při počátečním odlehčování a za předpokladu, že kontaktní plocha je rovna opticky měřené ploše vtisku, můžeme z této rovnice odvodit redukovaný modul pružnosti. Tento vztah je sice původně odvozen pro kuželový indenter, ale bylo dokázáno, že stejně dobře popisuje i chování pro kulový a válcový indenter. Rovnice tedy platí pro každý tvar indentoru, jenž je popsán jako rotace hladké funkce, avšak lze ji použít i pro pyramidový Berkovichův indenter. Obecně používané hodnoty modulu a hodnoty vypočtené z této rovnice, za použití dat získaných Vickersovým indentorem, se shodují, což potvrzuje platnost tohoto vztahu.

Oliver, Hutchings a Pethica zavedli jednoduchou metodu pro získání mechanických charakteristik. Tato metoda vychází z indentační křivky závislosti působící síly na hloubce vtisku (Obr. ??) a je založena na předpokladu, že se materiál při plné zátěži do určité hloubky přizpůsobí tvaru indentoru. Pokud může být tato hloubka z dat závislosti stanovena, plochu kontaktu pak lze odhadnout přímo z funkce tvaru indentoru. Pro výpočet musí být známa funkce plochy indentoru, tedy plochy příčného řezu indentoru jako funkce vzdálenosti od jeho vrcholu. K výpočtu může být dále použita buďto hloubka při maximálním zatížení h_{max} nebo konečná hloubka h_f , zbytková hloubka vtisku po konečném odlehčení. Za použití metody konečných prvků (MKP) pro určení funkce tvaru však Oliver zjistil, že konečná hloubka dává lepší odhad než hloubka maximální.



Obrázek 4.1: Schématické znázornění křivky závislosti $P = f(h)$ pro zobrazení důležitých parametrů měření.

Doerner a Nix navázali na tyto studie shromážděním všech dosavadních poznatků k vytvoření do té doby nejlépe pochopitelné metody pro určení tvrdosti a elastického modulu z indentační křivky závislosti $P-h$ (Obr. ??). Jejich teorie využívá podobnost mezi elastickým chováním při počáteční fázi odlehčování indentačního kontaktu vytvořeném běžným indentorem a indentorem válcovým. U válcového indentoru, zatímco je indentor odlehčen, zůstane plocha kontaktu konstantní. Navrhli tak jednoduchou empirickou metodu založenou na extrapolaci počáteční lineární části odlehčovací křivky a následném použití extrapolované hloubky h_c spolu s tvarovou funkcí indentoru pro určení kontaktní plochy. Experimenty tedy potvrdily, že extrapolovaná hloubka h_c poskytuje lepší odhad kontaktní plochy než hloubka konečná h_f . S takto určenou kontaktní plochou může být redukovaný modul pružnosti E_{red} určen z rovnice (4.3) a tvrdost H z její klasické definice:

$$H = \frac{P_{max}}{A}, \quad (4.4)$$

kde P_{max} je maximální zatížení indentoru a A průmět plochy elastického kontaktu. Naopak pozorování *Olivera a Pharra* vedlo k tomu, že odlehčovací křivka je zřídka, jestli vůbec někdy, lineární, dokonce i v počáteční fázi odlehčování. Také zjistili, že kontaktní tuhost při odlehčování se mění okamžitě a nepřetržitě, jakmile je indentor ze vzorku vytahován.[13][14]

4.3 Kvazistatická metoda analýzy Olivera a Pharra

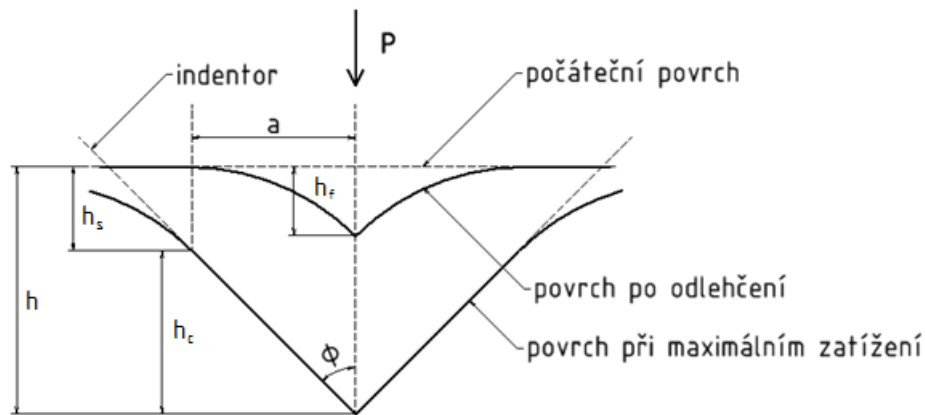
Teorie

Jak je z předešlých poznatků patrné, zjednodušení aproximací plochým indentorem není pro popis chování materiálu při indentaci příliš vhodné. Oliver a Pharr proto navrhli novou metodu analytického řešení, kterou lze aplikovat i pro další geometrie indentoru. Metoda pracuje se zcela odlišnou hloubkou, která je, ve spojení s tvarem indentoru, použita pro určení kontaktní plochy. Mimo jiné podává vysvětlení pro nelinearitu křivky závislosti působící síly na hloubce vtisku při odlehčování.

Matematický popis elastického zatěžování a odlehčování rozrušeného povrchu je naprosto stejný jako pro plochý povrch, jestliže přizpůsobíme geometrické parametry popisující vrcholový úhel kuželu a poloměr zaoblení koule nebo indentoru tvaru rotačního paraboloidu. Jelikož kuželový a kulový indentor představují velmi odlišné geometrie, toto chování může také platit pro ostatní osově souměrné indentory. Kdykoli během zatěžování je pak celkový posun popsán jako:

$$h = h_c + h_s, \quad (4.5)$$

kde h_c je příčná vzdálenost kontaktu a h_s posuv povrchu na poloměru kontaktu.



Obrázek 4.2: Schématické znázornění odlehčovacího procesu pro zobrazení parametrů určujících kontaktní plochu.

Při maximální zátěži je a označením pro poloměr kontaktu a h_f pro konečnou hloubku vtisku po celkovém odlehčení. Třemi klíčovými parametry, které je potřeba určit z $P-h$ závislosti, jsou maximální zatížení P_{max} , hloubka při maximálním zatížení h_{max} a tuhost při počátečním odlehčování S_{max} definovaná jako sklon vrchní části křivky odlehčování, někdy také označovaná jako kontaktní tuhost. Správnost výpočtu tvrdosti a modulu pružnosti je pak odvozena od toho, jak dobře lze tyto parametry experimentálně změřit. Kontaktní tuhost je měřena pouze při maximálním zatížení a nejsou kladena žádná omezení na data odlehčování z hlediska linearit v určité části odlehčovací křivky.

Analýza tak začne přepisem rovnice (4.3), což platí pro jakýkoliv tvar indentoru, který se nechá popsát jako tvar vzniklý rotací hladké křivky:

$$E_{red} = \frac{1}{\beta} \cdot \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot \frac{S}{\sqrt{A}}, \quad (4.6)$$

kde E_{red} je redukovaný modul pružnosti, β bezrozměrný korekční součinitel, S je experimentálně měřená tuhost a A průmět plochy elastického kontaktu.

Měření sklonu křivky počátečního odlehčení může být tedy použito k určení redukovaného modulu, a to pokud lze nezávisle změřit kontaktní oblast při plné zátěži. Za předpokladu, že se indentor výrazně nedeformuje, kontaktní plocha se při maximální zátěži vypočítá ze vztahu:

$$A = F(h_c), \quad (4.7)$$

kde A je kontaktní plocha při maximální zátěži, F je určeno experimentálně a h_c je kontaktní hloubka. Kontaktní hloubku získáme ze vztahu:

$$h_c = h_{max} - h_s, \quad (4.8)$$

kde h_{max} je maximální hloubka určená experimentálně a hloubka povrchu na poloměru kontaktu h_s je určena následujícím vztahem (4.10). Průhyb povrchu na kontaktním poloměru závisí na geometrii indentoru. Pro kuželový indentor je odvozen vztah:

$$h_s = \frac{\pi - 2}{\pi} \cdot (h - h_f) = \frac{2 \cdot (\pi - 2)}{\pi} \cdot \frac{P}{S}, \quad (4.9)$$

kde h_s je hloubka povrchu na poloměru kontaktu, h je celková hloubka, h_f konečná hloubka, P velikost zátěže a S experimentálně měřená tuhost. Obecně pak platí vztah:

$$h_s = \epsilon \cdot \frac{P_{max}}{S} \quad (4.10)$$

kde konstanta $\epsilon = \frac{2}{\pi} \cdot (\pi - 2)$ pro kuželový indentor, $\epsilon = 0.75$ pro rotační paraboloid a $\epsilon = 1$ pro plochý indentor.

Pro kuželový a paraboloidní indentor jsou hloubky kontaktu větší než pro plochý indentor, což musí být zahrnuto v analýze, která tyto geometrie používá. Křivka odlehčování je podle empirického pozorování nejlépe aproximována indentorem, který se chová jako rotační paraboloid, je tedy doporučeno brát pro výpočty hodnotu geometrické konstanty $\epsilon = 0.75$. Kromě určení modulu můžeme touto metodou určit i tvrdost H , která je podle vztahu (4.4) definována jako střední tlak, který materiál snese při zatížení [13][14].

Realizace metody

Výběr geometrie indentoru

Chování široké škály materiálu při odlehčení může být popsáno jedinou geometrií indentoru. Vychází to z pozorování, že křivky odlehčování pro různé materiály v grafu překresleném pro poměry hodnot k hodnotě maximální jsou jen stěží odlišitelné. Na základě exponentů energetického vztahu je chování při odlehčení nejlépe popsáno geometrií paraboloidu, a proto je bráno pro výpočty $\epsilon = 0.75$. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že není možné provést čistě elastickou charakteristiku kuželové geometrie, pokud se objeví plasticita. Napěťový uzel, který se vytvoří okolo vrcholu indentoru, lze pak lépe předpovědět rotačním paraboloidem. Přesný postup měření H a E_{red} je založen na procesech při odlehčování, pro které se předpokládá, že je možné modelovat chování Berkovichova indentoru pomocí kuželového indentoru s polovičním vrcholovým úhlem $\varphi = 70,3^\circ$, který dává stejný vztah mezi kontaktní plochou a vzdáleností od vrcholu.

Měření tuhosti při počátečním odlehčení

Hodnoty tuhosti získané z prvního a posledního odlehčování jsou velmi odlišné. Důvodem je značné množství creepu, jenž se objevuje při prvním odlehčování, které způsobí abnormální zvýšení sklonu horní části odlehčovací křivky. Tento účinek může být minimalizován zařazením do zatěžovacího cyklu zatížení na maximální hodnotu po dlouhou dobu tak, aby došlo ke snížení časově závislých plastických účinků. Data odlehčování lze dobře popsat exponenciálním vztahem, a tak použitý vztah pro měření tuhosti je:

$$P = \alpha \cdot (h - h_f)^m, \quad (4.11)$$

kde $(h - h_f)$ je elastický posun, α a m materiálové konstanty určené metodou nejmenších čtverců.

Počáteční tuhost se tak analyticky určí derivací tohoto vztahu a stanovením derivace při maximální zátěži a hloubce. Parametr m se podle původního experimentálního měření Berkovichovým indentorem pohybuje v intervalu $\langle 1.2; 1.6 \rangle$, což potvrzuje nejen to, že aproximace plochým indenotrem, kdy parametr $m = 1$, není vhodná, ale také skutečnost, že se indenter chová spíše jako rotační paraboloid, pro který je $m = 1.5$. Toto zjištění je poněkud zvláštní v tom, že osově souměrný ekvivalent Berkovichova indentoru je kužel, pro který je parametr $m = 2$.

Kapitola 5

Experimentální měření

5.1 Příprava vzorků

Hlavním cílem této práce je naměřit mechanické vlastnosti, které budou odpovídat skutečnému chování vazů v lidském těle. Proto bylo potřeba odebrat živé vzorky, zaručit jejich vhodné skladování a otestovat je v co nejkratším možném čase od operace. Operace i příprava vzorků byla provedena na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze, odkud byly dále vzorky převezeny do Laboratoře nanoindentačních zkoušek ČVUT v Praze, kde byla provedena analýza jejich mechanických vlastností. Vzorky byly odebrány k histologickému vyšetření subjektu ve věku 63 let. Část těchto vzorků byla použita pro nanoindentační testování. Odebrány byly tři vzorky vazů hlezenního kloubu, konkrétně pak: *lig. deltoideum* (Vzorek 1), *lig. tibiofibulare anterius* (Vzorek 2) a *lig. fibulotalare anterius* (Vzorek 3). V následující části je popsán proces zacházení se vzorky od jejich odebrání až po samotnou indentaci vzorků.

Tabulka 5.1: Přehled vazů, u kterých byla provedena analýza mechanických vlastností.

Vzorek 1	<i>Lig. deltoideum</i>	20 indentů
Vzorek 2	<i>Lig. tibiofibulare anterius</i> (ATiF)	13 indentů
Vzorek 3	<i>Lig. fibulotalare anterius</i> (ATaF)	9 indentů

Nejprve byly vzorky peroperačně odebrány. Nejedná se tudíž o kadaverózní tkáň, na které byly dosud experimenty prováděny. Ihned po odebrání byl pro usnadnění orientace na každém vzorku vytvořen modrý steh označující jeden jeho konec. Následně byly vzorky uzavřeny do odběrové nádoby se sterilním fyziologickým roztokem o pokojové teplotě. V nádobce byly co nejrychleji dopraveny ze sálu do laboratoře, kde byla provedena jejich příprava pro samotné měření.

V laboratoři byly vzorky jemně osušeny, pod lupou zjištěna jejich orientace a nakonec byla tkáň očištěna. Po zamrazení pomocí kryospřeje, byly ponechány 20 minut v mrazáku při teplotě -20°C . Zalití tkáně na krájecí bloček bylo provedeno pomocí O.C.T.TM Compound Tissue-Tek, což je montovací médium, rozpustné ve vodě, které podle informací prodejce nijak neovlivňuje tkáň. Po připevnění tkáně na bloček byly za použití kryotomu Leica CM1850 při teplotě -20°C provedeny tenké řezy o tloušťce $50\ \mu\text{m}$.

Řezy byly následně nataženy na sklíčka pokrytá tenkou vrstvou Entellanu a poté po dobu 5 vteřin ponořena do nesterilního fyziologického roztoku o pokojové teplotě. Nato byly vzorky uloženy do chladničky do teploty 4°C, kde se na dně kontejneru, ve kterém byly vzorky skladovány, vyskytoval fyziologický roztok, který zabraňoval jejich vysychání. Následně byly dopraveny do Laboratoře nanoindentačních zkoušek ČVUT v Praze, kde byla provedena analýza jejich mechanických vlastností.

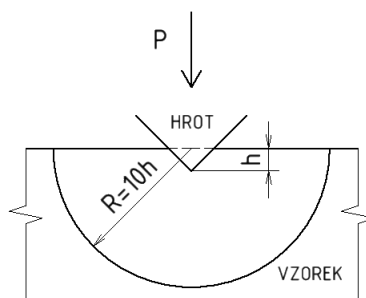
5.2 Průběh měření

Měření bylo provedeno na systému pro nanomechanické testování TI 950 TriboIndenterTM (Hysitron, Inc.) v Laboratoři nanoindentačních zkoušek ČVUT v Praze. Testování vzorků proběhlo do 12 hodin od operace. Pro analýzu mechanických vlastností byla použita kvazistatická nanoindentace. Na vzorcích bylo dohromady provedeno 42 indentů (Tab. 5.1). Aby nedocházelo k ovlivnění měřených vlastností tkáně od sousedních míst vpichu, jsou od sebe tato místa vzdálena 40 μm .

Snímač nanoindentačního systému pracuje v maximálním rozsahu posuvu hrotu v indentační ose $z \pm 2.5 \mu\text{m}$. Z důvodu velmi nízkých modulů pružnosti materiálu bylo navíc nutné použít stolek s rozšířeným posuvem ve směru osy z (Extended z stage) o rozsahu posuvu 500 μm . Kvůli jeho použití však nadále nemohla být provedena dynamická mechanická analýza (DMA). K testování vzorků byl použit diamantový konosférický hrot s vrcholovým úhlem 90° a poloměrem zaoblení 10 μm , který se využívá k testování měkkých tkání. Díky většímu zaoblení dochází ke zvětšení kontaktní plochy, a tím se hrot při stejném zatížení dostává do menší hloubky. Při vniknutí hrotu do materiálu dochází k ovlivnění oblasti znázorněné na obrázku (Obr. 5.1) o poloměru $R = 10 \cdot h$. Z tohoto důvodu je u testování vzorků s nižšími hodnotami modulu pružnosti, jako jsou právě vazy, důležité, aby tato oblast nezasahovala mimo prostředí indentovaného materiálu. Měřená data by pak byla ovlivněna mechanickými vlastnostmi skla, na kterém je tkáň testována.

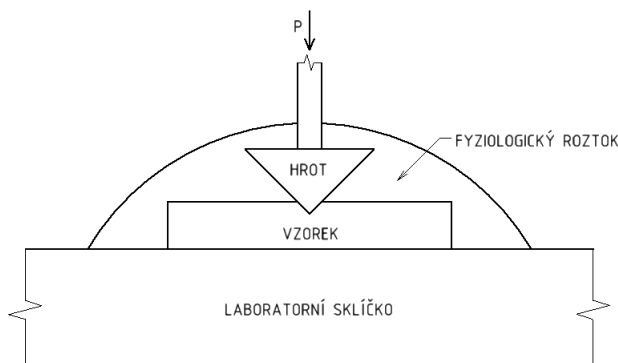
Tabulka 5.2: Použité experimentální vybavení.

Přístroj	TI 950 TriboIndenter (Hysitron, Inc.)
Přídavné vybavení	Stolek s rozšířeným posuvem ve směru osy z
Indentační hrot	Diamantový konosférický hrot, rádius 10 μm



Obrázek 5.1: Schématické znázornění ovlivněné oblasti při nanoindentaci.

Nejprve byl vzorek zakápnut fyziologickým roztokem tak, aby bylo zamezeno jeho vysychání (Obr. 5.2). Následně bylo sklíčko, na kterém je zcela lubrikovaný vzorek fixován, podtlakově připevněno na vakuový stolek. Indentace se tedy provádí pod hladinou fyziologického roztoku, čemuž musí být přizpůsobena hned dvěma způsoby. (1) Aby se roztok nedostal do snímače, je třeba použít hrot s delším dřikem, než je tomu při běžné nanoindentaci. (2) Je nutné provést kalibraci v indentační ose nejen ve vzduchu, ale také ve fyziologickém roztoku. Postup kalibrace prostředí je následující. Nejprve je hrot vysunut o maximální vzdálenost, čímž dostaneme křivku závislosti zatížení na hloubce vpichu. Jejím proložením zjistíme hodnoty, které je potřeba v průběhu experimentu od naměřených dat odečíst. Tím bude zajištěno, že dané prostředí, ve kterém nanoindentace probíhá, nijak neovlivní naměřené hodnoty.



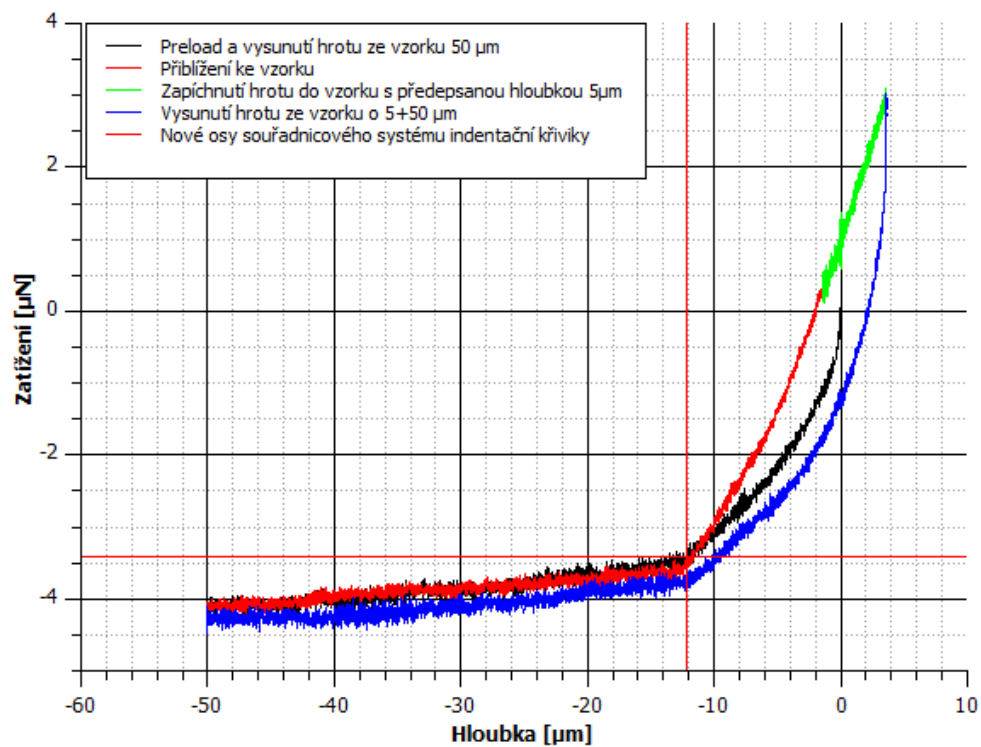
Obrázek 5.2: Schématické znázornění nanoindentace lubrikovaného vzorku.

Hrot nemá ideální tvar a vlivem opotřebení se jeho plocha neustále mění. Jelikož jeho přesný tvar potřebujeme znát k dalším výpočtům, je současně před zahájením měření potřeba provést kalibraci tvaru indentoru. Ta se provádí za použití taveného křemene o známých mechanických vlastnostech, kde pomocí vztahů pro jejich výpočet zpětně určíme hledanou funkci tvaru indentoru. Mechanické vlastnosti taveného křemene jsou $E_{red} = 69.6 \text{ GPa}$ a $H_{IT} = 9.25 \text{ GPa}$, kde E_{red} je redukovaný modul pružnosti a H_{IT} indentační tvrdost. Indentační tvrdost se od běžných tvrdostí liší tím, že není vypočtena ze zbytkové hloubky vtisku, ale odvíjí se od aktuální kontaktní plochy, která odpovídá dané velikosti zatížení. Funkce kontaktní plochy, jež byla použita pro všechna měření, má následující tvar:

$$A(h_c) = \pi \cdot (h_c)^2 + 26.02580569 \cdot h_c, \quad (5.1)$$

kde $A(h_c)$ je kontaktní plocha v jednotkách $[\mu\text{m}^2]$ závislá na příčné vzdálenosti kontaktu h_c [10].

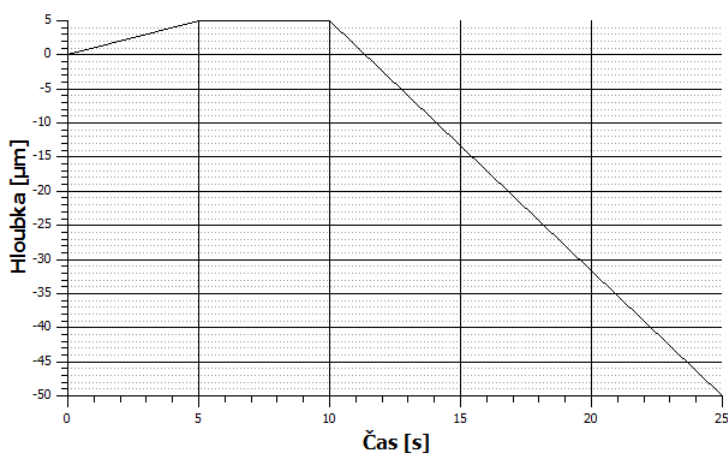
Samotné měření začne lokalizací vhodné polohy pro indentaci pomocí zkalibrovaného mikroskopu s přesností menší než $1.5 \mu\text{m}$. Po nalezení místa, kde chceme mechanické vlastnosti materiálu měřit, následuje zjišťování povrchu vzorku. Toho docílíme aplikací malé zátěže o velikosti $0.5 \mu\text{N}$, tzv. *preload*, a následným vysunutím hrotu z materiálu. Poté přijde na řadu samotná indentace podle zvolené zatěžovací funkce. Následně pak z vykreslené indentační křivky určíme její počátek. V tomto místě se hrot dostává mimo oblast materiálu a je zapotřebí výrazně menších sil k jeho vytahování, tím se mění smernice křivky. Počátek tedy leží v místě inflexního bodu křivky počátečního zatížení silou $0.5 \mu\text{N}$. Do tohoto bodu na závěr celého měření přesuneme počátek souřadnicového systému (Obr. 5.3).



Obrázek 5.3: Znázornění závěrečného posunutí počátku souřadnicového systému indentační křivky.

Zatěžovací funkce byla u všech měřených vzorků nastavena následovně (Obr.5.4):

0. Vysunutí hrotu ze vzorku $50 \mu\text{m}$ za 15 s a následovné přiblížení ke vzorku za 50 s .
1. Zapíchnutí hrotu do vzorku s předepsanou hloubkou $5 \mu\text{m}$ za 5 s .
2. Udržování předepsané hloubky $5 \mu\text{m}$ po dobu 5 s (relaxační segment).
3. Vysunutí hrotu ze vzorku o $5 + 50 \mu\text{m}$ za 15 s .



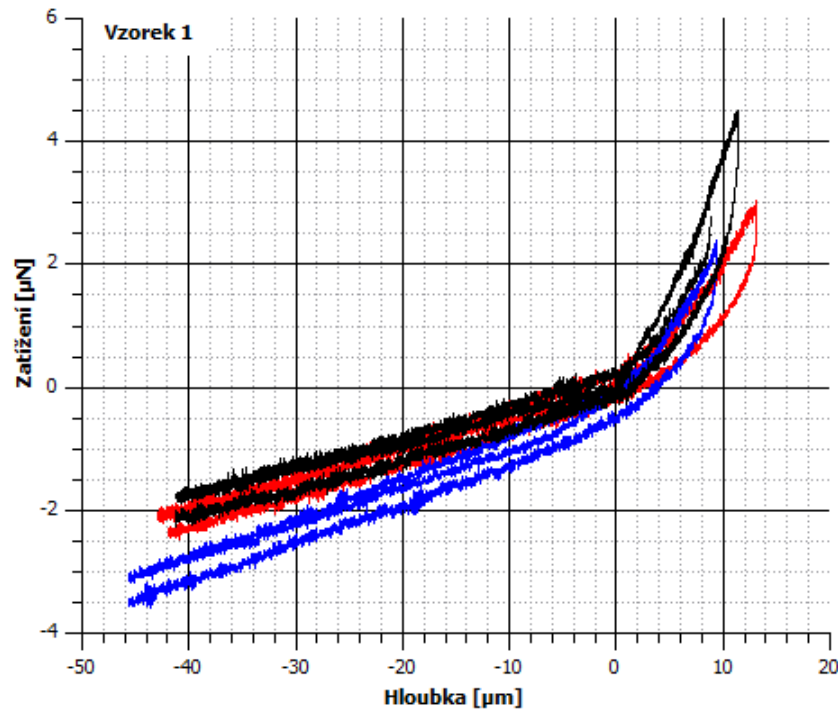
Obrázek 5.4: Zatěžovací funkce, jež byla použita pro nanoindentaci všech vzorků.

5.3 Naměřená data

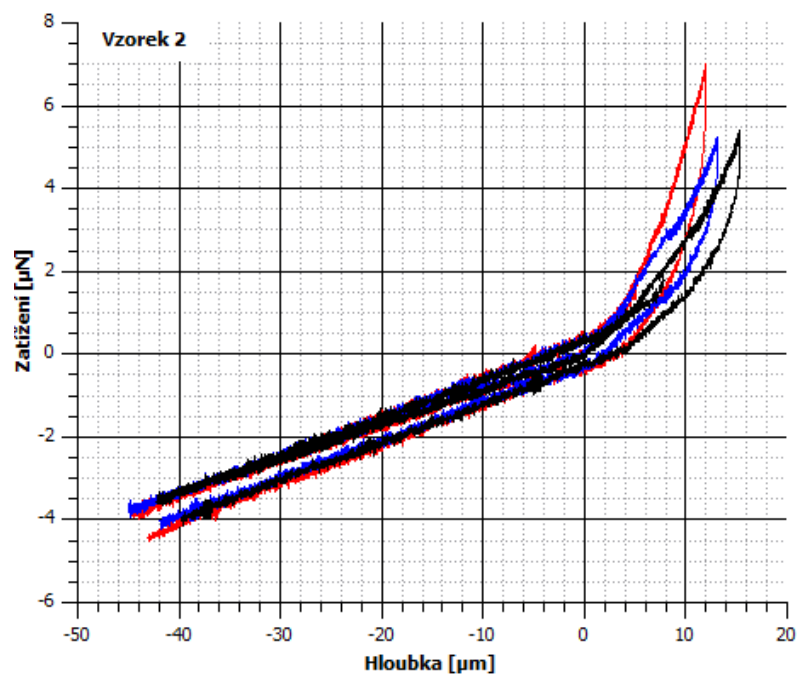
Byla provedena analýza mechanických vlastností za použití kvazistatické nanoindentace u nativních vzorků vazů hlezenního kloubu. Po naměření indentačních křivek, jež jsou vykresleny na obrázcích (Obr. 5.5, Obr. 5.6 a Obr. 5.7), byla data vyhodnocena pomocí softwaru TriboScan analýzy odlehčovací křivky dle Olivera a Pharra. U vazů *lig. deltoideum* (Vzorek 1), *lig. tibiofibulare anterius* (Vzorek 2) a *lig. fibulotalare anterius* (Vzorek 3) byly zjištěny hodnoty redukovaného modulu E_{red} a kontaktního tlaku H_{IT} . U nízkých hodnot H_{IT} se tato veličina místo indentační tvrdosti označuje jako kontaktní tlak. Získané mechanické vlastnosti jsou prezentovány níže (Tab. 5.3).

Tabulka 5.3: Tabulka zjištěných průměrných hodnot redukovaného modulu pružnosti E_{red} a kontaktního tlaku H_{IT} pro dané vzorky.

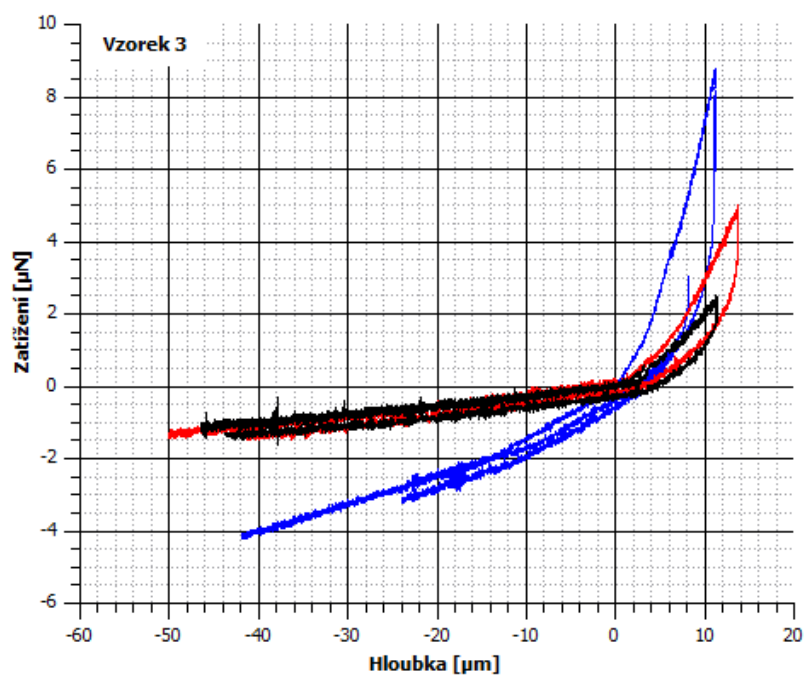
		Redukovaný modul pružnosti	Kontaktní tlak
		[kPa]	[kPa]
Vzorek 1	D	24.05 ± 13.30	4.85 ± 2.70
Vzorek 2	AtiF	27.77 ± 10.91	6.38 ± 2.06
Vzorek 3	AtaF	24.67 ± 24.86	5.00 ± 3.12



Obrázek 5.5: Ukázka tří indentačních křivek naměřených testováním *lig. deltoideum* (Vzorek 1).



Obrázek 5.6: Ukázka tří indentačních křivek naměřených testováním *lig. tibiofibulare anterius* (Vzorek 2).

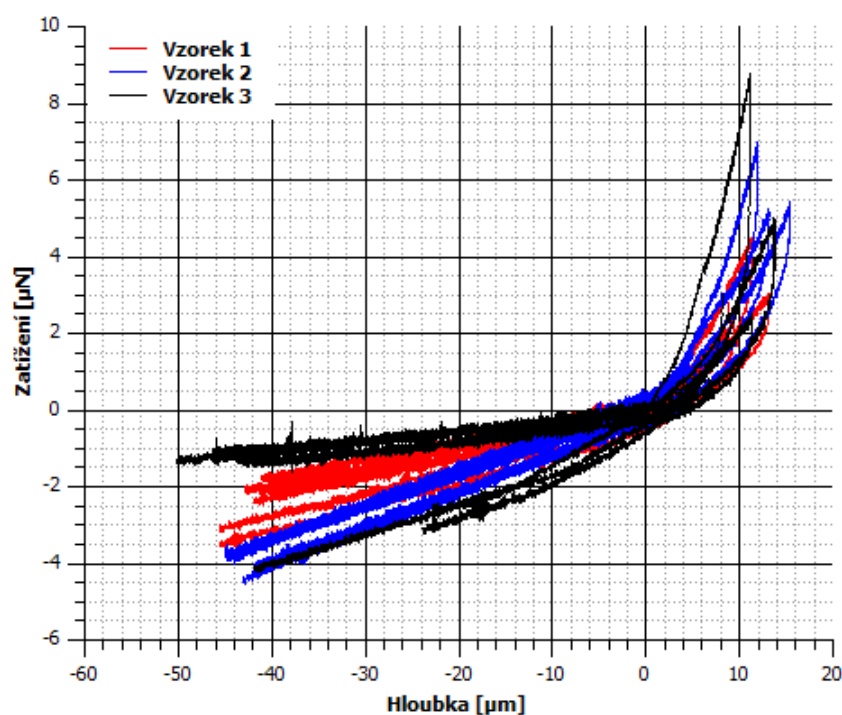


Obrázek 5.7: Ukázka tří indentačních křivek naměřených testováním *lig. fibulotalare anterius* (Vzorek 3).

Kapitola 6

Diskuze

Metodou nanoindentace v kvazistatickém režimu byly stanoveny hodnoty redukovaného modulu pružnosti a kontaktního tlaku, které jsou uvedeny v kapitole 5.3 (viz Tab. 5.3). Nejvyšší redukovaný modul pružnosti vykazuje *lig. tibiofibulare anterius* (Vzorek 2), následuje *lig. fibulotalare anterius* (Vzorek 3) a nejnižší redukovaný modul pružnosti byl zjištěn u *lig. deltoideum* (Vzorek 1). To potvrzuje i tvar jednotlivých indentačních křivek pro dané vzorky (viz Obr. 6.1). Zde je vidět, že průměrně největší strmost mají křivky zatěžování (což je první část indentační křivky v oblasti materiálu) právě pro vzorek 2 a průměrně nejmenší směrnici této části mají indentační křivky odpovídající vzorku 1. Rozdíly výsledných hodnot redukovaného modulu pružnosti a kontaktního tlaku pro jednotlivé vazy se však liší jen nepatrně, a to v řádech jednotek.

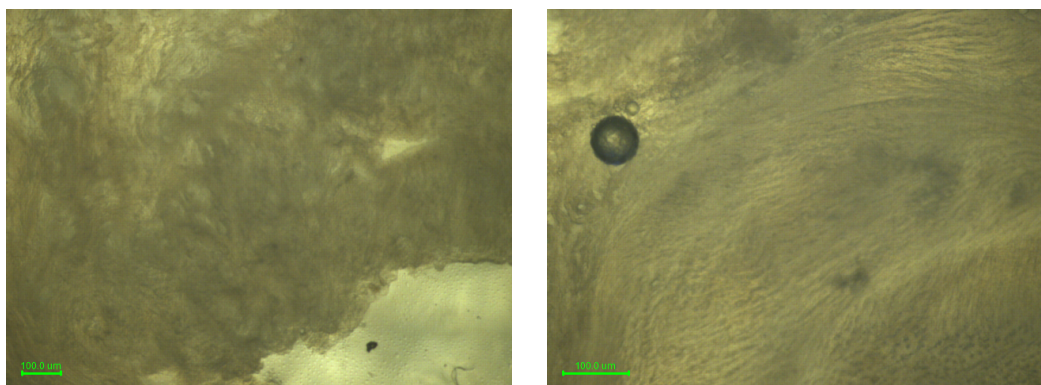


Obrázek 6.1: Porovnání jednotlivých indentačních křivek měřených vzorků.

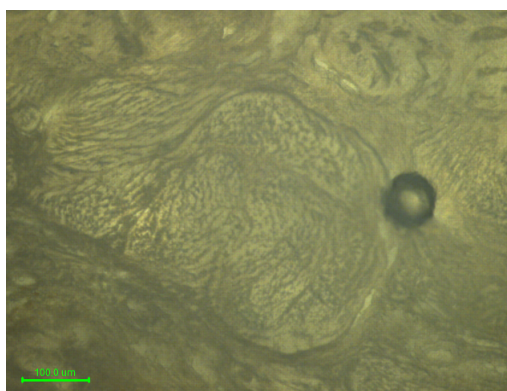
6.1 Zhodnocení naměřených dat

Z ukázky grafů indentačních křivek (viz Obr. 5.5, Obr. 5.6 a Obr. 5.7) je patrné, že naměřená data získaná testováním daného vzorku se v některých případech podstatně liší. To platí zejména pro *lig. fibulotalare anterioris* (Vzorek 3). U tohoto vazů pro dosažení téměř stejné hloubky (viz modrá a černá indentační křivka na Obr. 5.7) je zapotřebí v případě nanoindentace znázorněné modrou barvou téměř čtyřikrát větší zatížení hrotu, než je tomu u nanoindentace podle černé křivky. Vysoké hodnoty směrodatných odchylek ukazují na skutečnost, že se od sebe hodnoty získané jednotlivým měřením daného vazů podstatně liší. V případě vzorku 3 je dokonce směrodatná odchylka redukovaného modulu pružnosti větší než jeho střední hodnota (relativní směrodatná odchylka $s_r = 100,8 \%$). Podobně je tomu i u ostatních hodnot. Relativní směrodatná odchylka redukovaného modulu pružnosti vzorku 1 je $s_r = 55,3 \%$ a vzorku 2 $s_r = 39,3 \%$. Směrodatná odchylka kontaktního tlaku je také ve všech případech vysoká.

Vysoké směrodatné odchylky jen potvrzují nehomogenitu zkoumaného materiálu. Ukázka struktury vazů je vidět na snímcích pořízených pomocí světelného mikroskopu, který je zabudovaný v nanoindentoru (viz Obr. 6.2, Obr. 6.3 a Obr. 6.4). Uprostřed těchto snímků byla provedena nanoindentace. Je zde vidět rozmanitá struktura vazů, kde tmavěji ohraničené oblasti by měly představovat jednotlivé svazky kolagenních vláken. Velký rozptyl hodnot je pravděpodobně způsoben právě rozdílným mechanickým chováním jednotlivých částí struktury, jež byly podrobeny testování.



Obrázek 6.2: Snímek struktury - Vzorek 1. Obrázek 6.3: Snímek struktury - Vzorek 2.



Obrázek 6.4: Snímek struktury - Vzorek 3.

Pro srovnání výsledků experimentu s již naměřenými hodnotami Youngova modulu pružnosti mohou posloužit data získaná tahovou zkouškou provedenou Sieglerem a spol. z roku 1988 (viz kapitola 3.3). V následující tabulce je porovnán redukovaný modul pružnosti stanovený nanoindentací s Youngovým modulem pružnosti z tahové zkoušky (viz Tab. 6.1). Redukovaný modul pružnosti je veličina popisující rovinnou deformaci. Při známém Poissonově čísle může být přepočítán na Youngův modul pružnosti dle vztahu 4.6 (pouze část popisující vzorek). Rozdíl původního redukovaného a přepočítaného Youngova modulu pružnosti by byl však vzhledem k nízkým hodnotám Poissonova čísla velmi malý. V tomto případě je tedy přímo porovnán redukovaný modul pružnosti stanovený nanoindentací s Youngovým modulem pružnosti z tahové zkoušky. Přesnější srovnání není vzhledem k řádově odlišným hodnotám potřeba. Při porovnání výsledků je vidět zásadní rozdíl. Hodnoty naměřené nanoindentací jsou v řádech kPa, zatímco hodnoty získané tahovou zkouškou jsou v řádech MPa. Vysvětlení pro takto velké odchylky mezi jednotlivými metodami měření mohou být různá a jsou podrobněji rozebrány v následující části.

Tabulka 6.1: Tabulka porovnávající výsledný redukovaný modul pružnosti získaný nanoindentací a Youngův modul určený tahovou zkouškou.

		Nanoindentace	Tahová zkouška
		Redukovaný modul pružnosti	Youngův modul pružnosti
		[kPa]	[kPa]
Vzorek1	D / PTiT	24.05 ± 13.30	99 540 ± 79 320
Vzorek2	ATiF	27.77 ± 10.91	-
Vzorek 3	ATaF	24.67 ± 24.86	255 500 ± 181 300

6.2 Možné příčiny odlišných hodnot

Průběh experimentu provedeného Sieglerem a spol.

Byly zjištěny velké rozdíly hodnot Youngova modulu pružnosti stanoveného Sieglerem a spol. tahovou zkouškou a redukovaného modulu pružnosti stanoveného nanoindentacním měřením, které je předmětem této práce (viz Tab. 6.1). Jedním z důvodů takto vysokého rozdílu výsledků obou experimentů může být proces zacházení se vzorky od operace až do chvíle jejich testování nebo průběh samotného měření. V experimentálním měření provedeném Sieglerem a spol. byly odebrány čerstvé vzorky kost-vaz-kost. Ty byly otestovány do 48 hodin od operace, což je čtyřikrát delší čas než v případě experimentálního měření, kterým se tato práce zabývá. Měření bylo provedeno na spojení vazy s kostí. I přesto, že Youngův modul pružnosti kosti je mnohonásobně vyšší než vazy, nemůže být vyloučeno přídavné prodloužení, které může do výsledků vnést malé nepřesnosti. Hlavním problémem se však může jevit hydratace vzorku v průběhu měření. V popisu experimentu Sieglera a spol. je uvedeno, že byl vzorek pravidelně zvlhčován 10% solným roztokem [16]. Vzhledem k tomu, že některé měkké tkáně obsahují až 80% vody, jednou z nejdůležitějších věcí je, aby byly testy prováděny ve vhodném médiu [6]. Je tedy možné, že při takto provedeném měření, kdy nebyla zaručena dokonalá hydratace vzorku, není v důsledku vysychání vzorku dosaženo správných výsledků.

Jelikož vaz je viskoelastický materiál, jeho mechanické vlastnosti jsou závislé na rychlosti deformace. Aby mohla být viskoelastická vaz zanedbána, je potřeba, aby měření probíhalo v kvazistatickém režimu, kdy je vzorek testován při nízkých hodnotách rychlosti deformace. Tahová zkouška provedená Sieglerem a spol. probíhala při rychlosti deformace 0.32 cm/min (0.05 mm/s) [16]. V případě nanoindentačního měření, kterým se tato práce zabývá, vnikal hrot do vzorku rychlostí 0.001 mm/s . Rychlosti deformace se pro jednotlivá měření liší. Jelikož je však za kvazistatické testování považováno i měření při rychlosti deformace 0.53 mm/s , oba experimenty spadají do oblasti kvazistatického testování a rozdíly ve výsledných hodnotách modulu pružnosti nemohou být připisovány viskoelastickému chování vazů.

Experimentální měření nanoindentací

Na druhou stranu, pro nanoindentaci byly vazy odebrány ze subjektu staršího věku. Jeho věk a zdravotní stav mohl mít určitý vliv na naměřené hodnoty. Je potvrzeno, že se vazy přetvoří podle mechanických požadavků, jež jsou na ně kladeny [6][16]. Proto starší, nemocné nebo imobilizované vazy vykazují vyšší hodnoty Youngova modulu pružnosti. To vede k závěru, že věk subjektu nemohl přispět ke snížení hodnot zjištěných tímto experimentem ve srovnání s tahovou zkouškou provedenou Sieglerem a spol. Dalším případným problémem by mohl být proces přípravy vzorků. Ten zahrnoval jejich zalití do *O.C.T.*TM Compound Tissue-Tek, fixačního média, které by ale dle výrobce nemělo nijak ovlivňovat strukturu a vlastnosti tkáně. Jeho účinky na mechanické chování vzorku by však měly být dále přezkoumány.

Při vyhodnocování výsledků tohoto experimentu nebyla data přiřazována jednotlivým oblastem struktury. Byly pouze určeny průměrné hodnoty redukovaného modulu pružnosti a kontaktního tlaku, jež byly následně přiřazeny celému testovanému vazu. U takto nehomogenního materiálu by bylo vhodnější jednotlivé oblasti struktury rozlišit. Následně brát toto rozlišení struktury v potaz při vyhodnocování naměřených hodnot nebo nejlépe již v průběhu experimentu. Zmenšila by se tak směrodatná odchylka, a tím i přesnost výsledků. V důsledku by se také zpřesnily aplikace výsledných dat. Mechanické vlastnosti konkrétního vazy by mohly být dále stanoveny pomocí zastoupení jednotlivých složek v jeho struktuře. Takto vzniklé nepřesnosti však nemohly mít za důsledek výsledky lišící se ve třech řádech.

Metody testování ve spojení se strukturou vazy

Důvod pro vznik takto velkých odchylek mezi naměřenými hodnotami může být hledán již v metodě testování. V případě nanoindentace dochází k měření pouze určité části struktury daného materiálu. Při tahové zkoušce je naopak testován materiál jako celek a určují se tak mechanické vlastnosti celé jeho struktury. Jednotlivé části struktury mohou tedy vykazovat zcela jiné mechanické chování, než jejich funkční uspořádání. Analogii můžeme najít například u vláknových kompozitů. Skutečná pevnost jednotlivých vláken v kompozitech je mnohem nižší než pevnost celého kompozitu. Kompozit jako celek snáší i zatížení, pod kterým by se jednotlivá vlákna již dávno trhala. Je zde ale otázka, jestli se tyto vlastnosti mohou lišit tak podstatně, jako tomu je v případě tohoto experimentálního měření.

Jiné vysvětlení pro takto rozdílné výsledky může být nalezeno ve složité struktuře vazy. Při tahové zkoušce vazy má získaná funkce zatížení na jeho prodloužení nelineární charakter a může být rozdělena do několika částí (podrobněji kapitola 3.2). Na počátku existuje oblast zvaná *toe region*, kde dochází k postupnému natažení zvlhčených kolagenních vláken a vaz vykazuje

velmi nízké hodnoty Youngova modulu pružnosti. Následuje lineární část, kde jsou již vlákna natažená a postupným navyšováním zátěžné síly dochází k jeho prodloužení. Z této části jsou při tahových zkouškách získány výsledné hodnoty Youngova modulu pružnosti vazy [6]. Výsledky redukováného modulu pružnosti stanoveného nanoindentací jsou oproti zjištěným hodnotám Youngova modulu pružnosti z lineární části diagramu tahové zkoušky velmi nízké. Je možné, že podobně jako v oblasti *toe region*, je mechanické chování vazy při nanoindentaci v důsledku jeho složité struktury jiné, než v oblasti lineárního diagramu tahové zkoušky, kde jsou kolagenní vlákna natažená. To by se mohlo dít v důsledku zvlnění vláken, jehož perioda je v řádech 100 μm a vzhledem k rozměru testovaného vzorku, který má tloušťku 50 μm , se nejedná o zanedbatelný rozměr [6].

Rozdíl zjištěných hodnot modulů by mohl být způsoben anizotropií vazy. Youngův modul pružnosti je v případě zatěžování vazy ve směru kolagenních vláken výrazně větší, než ve směru kolmém [6]. V případě tahové zkoušky působí zátěžná síla ve směru vláken a uvedená perioda zvlnění vláken na tento směr nemá vliv, jelikož je v makroměřítku zanedbatelná. Při nanoindentacním měření, kterému se tato práce věnuje, se však hrot dostával do hloubky až 15 μm . Velikost periody zvlnění vláken vůči způsobené deformace je tedy významná. Zátěžná síla v mikroměřítku, ve kterém se nanoindentace pohybuje, nepůsobí ve směru vlákna, pouze ve směru kolmém na příčný řez vazy. Anizotropie vlastností by tedy v tomto případě mohla mít určitý vliv na výsledné hodnoty. Pro větší rozbor vlivu struktury vazy na výsledky měření by bylo potřeba podrobněji prozkoumat mechanické chování vazy při jeho testování nanoindentací a věnovat se otázce, zda je možné k vyhodnocení naměřených dat použít metodu analýzy Olivera a Pharra.

Shrnutí hlavních možných příčin vzniku odlišných výsledků:

1. průběh experimentu provedeného Sieglerem a spol.:
 - vazy pouze zvlhčovány, není zaručena úplná hydratace
 - měření mechanických vlastností na vzorku vazy s kostí (vznik pouze malých nepřesností)
 - vazy testovány 48 hodin od operace
2. vyhodnocení výsledků experimentálního měření nanoindentací:
 - vyhodnocena průměrná hodnota redukováného modulu pružnosti, kde není brána v potaz nehomogenita struktury (vznik pouze malých nepřesností)
3. odlišné metody testování:
 - rozdílné mechanické chování jednotlivých prvků struktury vazy (měřené nanoindentací) oproti mechanickému chování celé struktury, kde jsou tyto prvky funkčně uspořádány (měřené tahovou zkouškou)
 - vzhledem ke složité struktuře vazy by Youngův modul pružnosti určený kvazistatickou metodou analýzy Olivera a Pharra při nanoindentaci nemusel odpovídat Youngovu modulu pružnosti určenému tahovou zkouškou

6.3 Návrh vylepšení metodiky testování

Především je zapotřebí zlepšit přesnost naměřených dat, jelikož směrodatné odchylky jsou příliš vysoké na to, aby mohly být hodnoty dále použity. Toho by se dalo docílit odebráním vzorků s větší příčnou plochou a následným provedením matice indentů v celé jejich ploše. Dále by byly získané hodnoty mechanických vlastností rozděleny a přiřazeny konkrétní testované části struktury. Rozdělení a přiřazení hodnot by bylo možné především díky pořizování snímků struktury v průběhu měření a jejím odborným popisem ve spolupráci s lékaři. Hranice jednotlivých částí struktury by byly přesněji určeny skokovou změnou vlastností, ke které dochází na rozhraní dvou fází. Mechanické vlastnosti by tak byly přiřazovány jednotlivým částem struktury vazů, což by přesněji vypovídalo o jeho celkovém chování. Přiřazení průměrné hodnoty stanovené testováním těchto jednotlivých částí totiž nemusí vůbec vypovídat o chování vazů jako celku. Složení konkrétního vazů by pak bylo určující pro stanovení jeho mechanických vlastností.

Jelikož je vaz považován za viskoelastický materiál, pro přesné určení jeho mechanických vlastností by bylo vhodné použít dynamický režim nanoindentace a výsledky vyhodnocovat za použití DMA. V tomto experimentu však nebylo možné tento postup aplikovat, jelikož byl použit stolek s rozšířeným rozsahem posuvu v ose z . Při kvazistatickém testování vzorku dochází k nepřesnostem vzniklým při volbě zatěžovací funkce z důvodu creepu a závislosti výsledných dat na rychlosti deformace. Kdyby bylo možné rozšířit posuv hrotu ve směru osy z jinou cestou, dynamickým testováním vzorků by bylo dosaženo přesnějších hodnot a zjištění mechanických vlastností, které by byly pro popis viskoelastického materiálu vhodnější.

Kapitola 7

Závěr

Cíl této práce, kterým bylo experimentálně stanovit mechanické vlastnosti vazů lidského hlezenního kloubu, byl splněn. Pro jeho dosažení byly postupně plněny stanovené dílčí úkoly. Nejprve byla provedena literární rešerše experimentů zabývajících se touto problematikou. Účelem bylo zjistit postup realizace těchto experimentů a získat naměřená data Youngova modulu pružnosti pro porovnání s výsledky této práce.

Základním nedostatkem publikovaných experimentů bylo testování kadaverózní tkáně nebo nedostatečné zvlhčování vzorku. Úkolem experimentálního měření, kterým se tato práce zabývá, bylo naměřit mechanické vlastnosti co nejpřesněji odpovídající mechanickému chování vazů v lidském těle. Aby toho bylo docíleno, musely být především vzorky odebrány peroperačně, otestovány v co nejkratším čase od operace a bylo potřeba zamezit jejich vysychání.

Při samotné realizaci experimentu bylo zjištěno, že tkáň vykazuje velmi malé hodnoty redukovaného modulu pružnosti. Rozsah posuvu hrotu ve směru osy z proto nebyl dostačující a musel být navíc použit stolek s rozšířeným rozsahem posuvu ve směru osy z . V případě použití tohoto stolku však není možné provést dynamickou analýzu, která je vhodná právě pro testování viskoelastických materiálů. Z tohoto důvodu byly vzorky testovány nanoindentací v kvazistatickém režimu a data byla dále vyhodnocena metodou analýzy Olivera a Pharra.

Zjištěné hodnoty redukovaného modulu pružnosti a kontaktního tlaku mají velké směrodatné odchylky. Byla proto navržena možná vylepšení metodiky testování, která by vedla ke zpřesnění výsledků. Snížení směrodatné odchylky by mohlo být dosaženo rozlišením testovaných částí struktury vazů, kterým by pak byly přiřazeny dané mechanické parametry. Následně by mohly být stanoveny mechanické vlastnosti konkrétních vazů na základě zastoupení těchto jednotlivých částí v jeho struktuře. Správnost výsledků by byla potřeba ověřit dalším testováním s důrazem na zpřesnění naměřených hodnot.

Výsledkem experimentálního měření jsou hodnoty o tři řády nižší než ty, které byly naměřeny v roce 1988 Sieglerem a spol. tahovou zkouškou. Rozdíl mezi naměřenými hodnotami Youngova modulu pružnosti mohl být způsoben již samotným průběhem experimentu tahové zkoušky. Při testování je důležitá dokonalá hydratace vzorku, která nemusela být v tomto případě jeho pouhým zvlhčováním dosažena. Důvodem odchylky výsledných dat obou experimentů však může být odlišná metoda testování, kterou byla hodnota modulu pružnosti stanovena. Vliv na naměřená data mohla mít také složitá struktura vazů. Mechanické chování vazů při testování nanoindentací by mělo být podrobněji prozkoumáno.

Seznam použitých zdrojů

- [1] ASIF, S:A.S., K.J WAHL a R.J. COLTON. Nanoindentation and contact stiffness measurement using force modulation with a capacitive load-displacement transducer. *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*. 1999, roč. 70, č. 5, s. 2408-2413. ISSN 0034-6748.
- [2] ATTARIAN, David E., Hugh J. MCCRACKIN, Dennis P. DEVITO, James H MCELHANEY a William E. GARRETT. Biomechanical Characteristics of human ankle ligaments. *FOOT & ANKLE*. 1985, roč. 6, č. 2, s. 54-58. ISSN 0198-0211.
- [3] BARTONÍČEK, Jan. *Základy klinické anatomie pohybového aparátu*. Praha: Maxdorf, 2004, s.23-24,211-218. ISBN 80-734-5017-8.
- [4] BUTLER, Adam M. a William R. WALSH. Mechanical response of ankle ligaments at low loads. *FOOT & ANKLE INTERNATIONAL*. 2004, roč. 25, č. 1, s. 8-12. ISSN 1071-1007.
- [5] COLVILLE, Mark R., Richard A. MARDER, John J. BOYLE a Bertram ZARINS. Strain measurement in lateral ankle ligaments. *AMERICAN JOURNAL OF SPORTS MEDICINE*. 1990, roč. 18, č. 2, s. 196-200. ISSN 0363-5465.
- [6] COWIN, Stephen C a Stephen B DOTY. *Tissue mechanics*. New York: Springer, 2007, 682 s. ISBN 03-873-6825-6.
- [7] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 1*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2001, s. 309. ISBN 80-7169-970-5.
- [8] FRANKE, O., M. GOEKEN a A. M. HODGE. The nanoindentation of soft tissue: Current and developing approaches. *JOM*. 2008, roč. 50, č. 6, s. 49-53. ISSN 1047-4838.
- [9] FUNK, J.R., G.W. HALL, J.R. CRANDALL a W.D. PILKEY. Linear and quasi-linear viscoelastic characterization of ankle ligaments. *JOURNAL OF BIOMECHANICAL ENGINEERING-TRANSACTIONS OF THE ASME*. 2000, roč. 122, č. 1, s. 15-22. ISSN 0148-0731.
- [10] MESA, Bernard. Spherical and rounded cone nano indenters. *Micro Star Technologies* [online]. [cit. 2015-06-08]. Dostupné z: <http://www.microstartech.com>.
- [11] MUNZAR, Martin a Tomáš ČERNOHORSKÝ. Testování mechanických vlastností nanomateriálů. *CHEMagazín*. 2009, roč. 14, č. 4, s. 8-10.
- [12] NETTER, Frank H. *Atlas of human anatomy*. Sixth edition. Saunders, 2014, 1 v. 640. ISBN 978-1455704187.

- [13] OLIVER, W.C. a G.M. PHARR. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *JOURNAL OF MATERIALS RESEARCH*. 1992, roč. 7, č. 6, s. 1564-1583. ISSN 0884-2914.
- [14] OLIVER, W.C. a G.M. PHARR. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *JOURNAL OF MATERIALS RESEARCH*. 2004, roč. 19, č. 1, s. 3-20. ISSN 0884-2914.
- [15] RAMAZANOGLU, N. a A. H. UCISIK. Comparative mechanical behavior of human ankle ligaments. *WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING*. 2007, roč. 14, č. 1-6, s. 3331-3332. ISSN 1680-0737.
- [16] SIEGLER, Sorin, John BLOCK a Carson D. SCHNECK. The mechanical characteristics of the collateral ligaments of the human ankle joint. *FOOT & ANKLE*. 1988, roč. 8, č. 5, s. 234-242.
- [17] SUN, J., M. LING, Y. WANG, D. CHEN, S. ZHANG, J. TONG a S. WANG. Quasi-static and dynamic nanoindentation of some selected biomaterials. *JOURNAL OF BIONIC ENGINEERING*. 2014, roč. 11, č. 1, s. 144-150. ISSN 1672-6529.
- [18] TAKEBAYASHI, T., T. YAMASHITA, N. SAKAMOTO, Y. YAMADA, Y. MINAKI a S. ISHII. Biomechanical characteristics of the lateral ligament of the ankle joint. *THE JOURNAL OF FOOT AND ANKLE SURGERY*. 2002, roč. 41, č. 3, s. 154-157.