

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta strojní – Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Nanoindentace měkkých tkání pánevního dna

2015

Lucie Kotanová



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta strojní, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

Technická 4, 166 07 Praha 6

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

pro: Lucii Kotanovou

program: **Teoretický základ strojního inženýrství**

obor: bez oboru

Název tématu:

Nanoindentace měkkých tkání pánevního dna

Title:

Nanoindentation of soft tissues of pelvis

Zásady pro vypracování:

1. Kritická rešerše (klíčová slova: nanoindentace, měkká tkáň, pánevní dno)
2. Příprava a provedení nanoindentačního experimentu
3. Interpretace nanoindentačních dat naměřených na měkkých tkáních pánevního dna

Rozsah grafických prací: 10 stran

Rozsah průvodní zprávy: 35 stran

Seznam odborné literatury:

1. ČIHÁK, R. Anatomie 1. 3. vydání. Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN: 978-80-247-3817-8.
2. OLIVER, W.C.; PHARR, G.M. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*. June 1992, 6, s. 1564-1583.
3. JOHNSON, K. L.; KENDALL, K.; ROBERTS, A. D. Surface Energy and the Contact of Elastic Solids. *Proceedings of the Royal Society London A*. September 1971, 324, s. 301-313.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Josef Šepitka, Ph.D.

Konzultant: Ing. Jaroslav Lukeš, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce: 30. 4. 2015

Datum odevzdání bakalářské práce: 19. 6. 2015

Neodevzdá-li student bakalářskou nebo diplomovou práci v určeném termínu, tuto skutečnost předem písemně zdůvodnil a omluva byla děkanem uznána, stanoví děkan studentovi náhradní termín odevzdání bakalářské nebo diplomové práce. Pokud se však student řádně neomluvil nebo omluva nebyla děkanem uznána, může si student zapsat bakalářskou nebo diplomovou práci podruhé

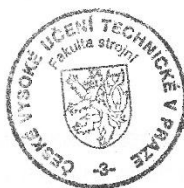
Posluchač bere na vědomí, že je povinen vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

Zadání diplomové práce převzal dne:

Kolmanová
.....
diplomant

Milan Růžička
.....
prof. Ing. Milan Růžička, CSc.

vedoucí Ú 12 105



Michael Valášek
.....
prof. Ing. Michael Valášek, DrSc.

děkan FS ČVUT v Praze

V Praze dne 30. 4. 2015

Anotační list

Jméno autora: Lucie Kotanová

Název BP: Nanoindentace měkkých tkání pánevního dna

Anglický název: Nanoindentation of soft tissues of pelvis

Rok: 2015

Obor studia: Bez oboru

Ústav/odbor: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky/odbor biomechaniky

Vedoucí: Ing. Josef Šepitka, Ph.D.

Konzultant: Ing. Jaroslav Lukeš, Ph.D.

Bibliografické údaje:	počet stran	31
	počet obrázků	14
	počet tabulek	1
	počet příloh	0

Klíčová slova: Nanoindentace, mechanické vlastnosti, pánevní dno, měkká tkáň

Key words: Nanoindentation, mechanical properties, pelvis, soft tissue

Anotace:

Tato bakalářská práce se zabývá měřením mechanických vlastností měkkých tkání pánevního dna pomocí nanoindentačního experimentu. Cílem této práce je stanovit redukovaný modul pružnosti pánevních vazů vhodnou nanoindentační analýzou. Práce obsahuje rešeršní studii, zabývající se anatomií pánevního dna a popisem nanoindentačních metod, a experimentální část.

Abstract:

This bachelor thesis deals with a measuring of mechanical properties of pelvic soft tissues by using a nanoindentation experiment. The aim of this thesis is to determinate the reduced modulus of pelvic ligaments through a suitable nanoindentation analysis. The thesis contains a research study, which deals with the anatomy of pelvic floor and with the description of nanoindentation methods, and an experimental part.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci zpracovala samostatně s využitím podkladů uvedených v seznamu použité literatury. Souhlasím, že výsledky práce mohou být dále využity dle uvážení vedoucího této práce Ing. Josefa Šepitky, Ph.D. jako jejího spoluautora. Souhlasím také s případnou publikací výsledků bakalářské práce nebo její podstatné části, pokud budu uvedena jako její spoluautor.

Datum.....

Podpis.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Josefovi Šepitkovi, Ph.D. za jeho ochotu, cenné rady a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za jejich podporu při studiu.

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Rešeršní studie	9
2.1 Anatomie pánevního dna.....	9
2.2 Nanoindentační analýza	11
2.2.1 Obecný princip nanoindentace	11
2.2.2 Analytický model – Oliver a Pharr	12
2.2.3 Vliv adheze	13
2.2.4 Analytický model - JKR	15
3 Cíle práce	19
4 Experiment.....	20
4.1 Příprava vzorků	20
4.2 Nanoindentace.....	20
4.2.1 Měřicí soustava.....	20
4.2.2 Postup měření	21
4.2.3 Kalibrace indentační plochy	22
5 Výsledky	24
6 Diskuze	27
7 Závěr	29
Seznam použité literatury	30
Seznam použitých symbolů	31

1 Úvod

Pánevní dno je součástí života každého z nás, ale málokdo si uvědomuje jeho přesnou funkci a ještě méně lidí přemýšlí nad jeho mechanickými vlastnostmi.

Komplex pánevního dna tvoří podpůrný systém pro pánevní a břišní orgány, podílí se na jejich fixaci a odpružení. Pro dnem prostupující orgány (vagina u žen, svěrač konečníku, močová trubice) plní také funkci uzávěrnou. [1]

Pánevní dno je tvořeno složitou sítí vazů a svalů, jejichž mechanické vlastnosti nebyly zcela prozkoumány. Tyto biologické tkáně můžeme považovat za vysoce adaptabilní viskoelastické anizotropní nehomogenní kompozitní materiály, což značně komplikuje určení mechanických vlastností jednotlivých tkání.

Jedinečnou metodu pro stanovení mechanických vlastností tkání v mikroskopickém měřítku představuje nanoindentace. Tato technika spočívá v zatlačování miniaturního (nejčastěji diamantového) hrotu do materiálu předepsanou silou, při čemž zaznamenáváme závislost působící síly na hloubce vpichu. Z naměřených závislostí pak nejčastěji získáváme redukovaný modul pružnosti a nanoindentační tvrdost zkoumaného materiálu.

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením mechanických vlastností pánevních vazů. Nanoindentace těchto měkkých tkání bývá doprovázena adhezí, což do standardní nanoindentační analýzy vnáší nepřesnosti, neboť do analýzy nezahrnuje celou nanoindentační křivku. V tom případě je vhodné použít rozšířený analytický model, který tuto skutečnost zohledňuje.

2 Rešeršní studie

2.1 Anatomie pánevního dna

Pánevní dno (*diaphragma pelvis*) má tvar mělké nálevky, která začíná na stěně malé pánve a sbíhá se konečníku. Rozkládá se mezi kostí stydkou (*os pubis*), kostrčí (*os coccygis*) a hrboly kostí sedacích (*tuberi ischiadici*). Kostěný kruh spojuje chrupavčitá symfýza (*symphysis pubica*) v přední části a silné pánevní vazy (*ligamenta coxae*). Svalové pánevní dno tvoří vpředu a na bocích sval *musculus levator ani* (zdvíhač konečníku) a dorzolaterálně sval *musculus coccygeus*. [2], [1] Viz Obr. 1.

Vzhledem k tomu, že analýze budeme podrobovat vazy pánevního dna, zaměříme se dále pouze na ně a na kosti a chrupavky, na které se tyto vazy přímo upínají.

Stydká kost

Stydká kost tvoří přední část kosti pánevní. Skládá se ze tří částí - těla (*corpus ossis pubis*) a dvou ramen. Z těla vybíhá horní rameno (*ramus superior ossis pubis*), které pokračuje k symfýze, kde přechází do dolního ramena (*ramus inferior ossis pubis*). [1]

Sedací kost

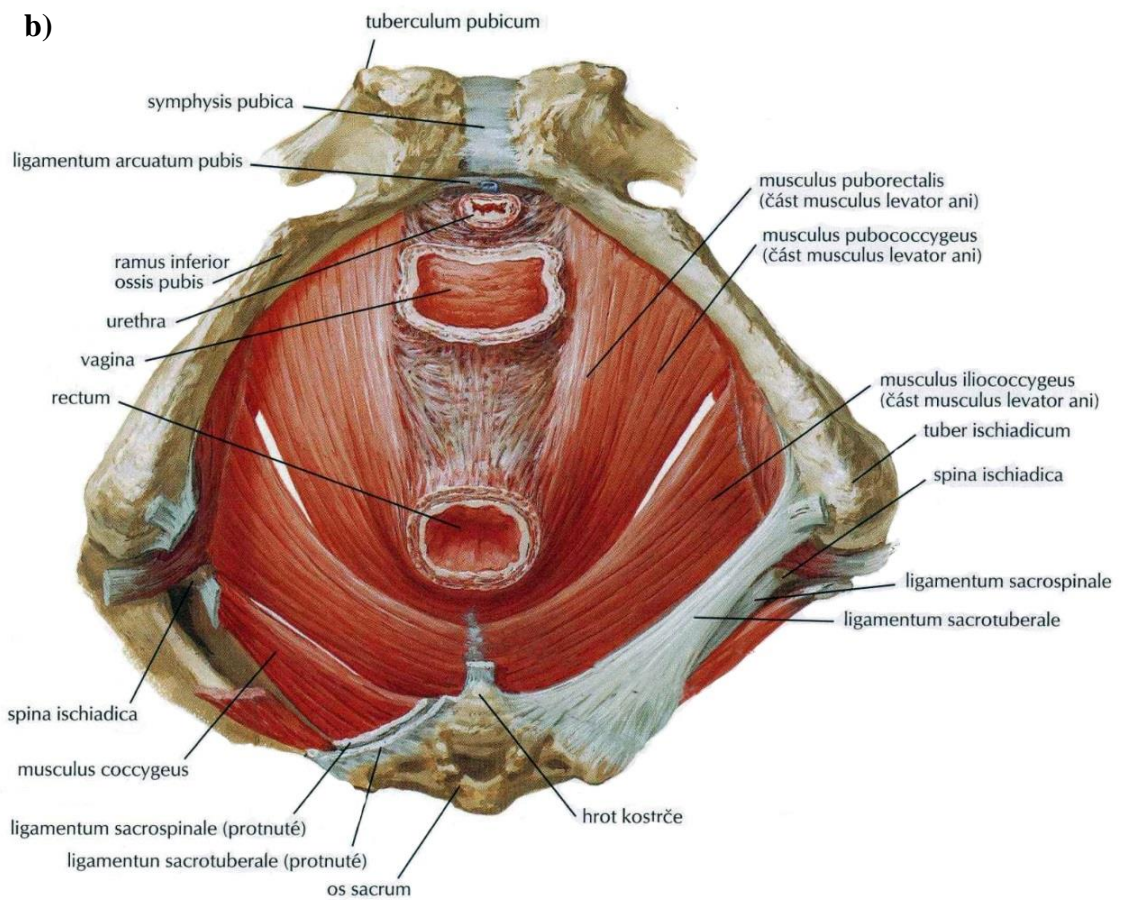
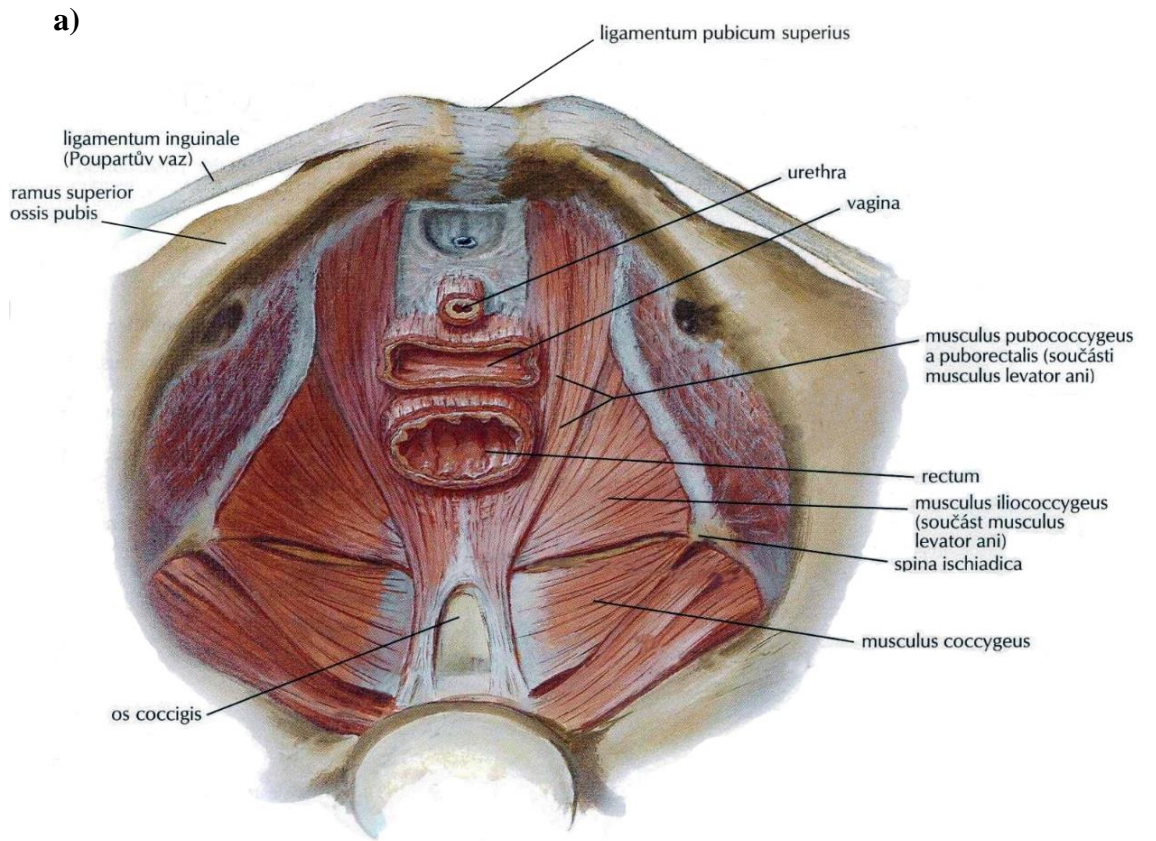
Sedací kost (*os ischii*) je poměrně masivní kost tvořící dolní okraj pánevní kosti. Široké rameno sedací kosti (*ramus ossis ischii*) směřuje dolů a dopředu, kde tvoří hrbol sedací kosti. Nad sedacím hrbolem je ostrý kostěný sedací trn (*spina ischiadica*). [1]

Křížová kost

Křížová kost (*os sacrum*) je původně složená z 5 obratlů, které postupně osifikují a srůstají v jedinou kost. Křížová kost je tedy jak součástí pánve, tak i nepohyblivou součástí páteře. Díky tomuto uspořádání dochází prostřednictvím křížové kosti k přenosu a rozložení zatížení trupu, hlavy a horních končetin do kostry pánevního kruhu a k přenosu zatížení na dolní končetiny. [1]

Kostrč

Kostrč je malá kost trojúhelníkového tvaru, která tvoří zakončení páteře. Obvykle se skládá z 3 - 5 spojených obratlů (výjimečně z 6 - 7 obratlů). Kostrč je ve většině případů spojená s křížovou kostí chrupavkou. Tento chrupavčitý disk je z vazivové chrupavky, ve které jsou početné ostrůvky hyalinní (sklovité) chrupavky, která je i na styčných plochách obou kostí. Tento spoj umožňuje kývavé pohyby a "pružení". [1]



Obr. 1: Pánevní dno ženy: a) pohled shora, b) pohled zdola (převzato z [3])

Symphysis pubica

Symfýza je chrupavčité spojení stydkých kostí. Mezi kontaktní plochy obou kostí je vložena 45 mm (žena) a 50 mm (muž) vysoká destička, kterou v partiích přiléhajících ke kostem tvoří hyalinní a uprostřed vazivová chrupavka. Vazivová chrupavka je pevná a pružná. Ve střední čáře může vzniknout vertikálně orientovaná štěrbina, takže symfýza pak připomíná kloub. [1]

Pánevní vazy

Vazy pánevního dna jsou velmi silné pruhy kolagenního vaziva, které nejsou součástí kloubních pouzder kostí a zpevňují pánev jako celek. [1]

Ligamentum inguinale (vaz tříselný) není pravý vaz, jedná se o dolní okraj aponeurózy břišních svalů. Rozpíná se od *spina iliaca anterior superior* (přední horní trn kyčelní) k *tuberculum pubicum*. [2]

Ligamentum sacrospinale je silný vaz, který jde jako vějíř od trnu sedací kosti ke křížové kosti a ke kostrči. Z vnějšku překrývá *musculus coccygeus* se kterým je částečně srostlý. [1]

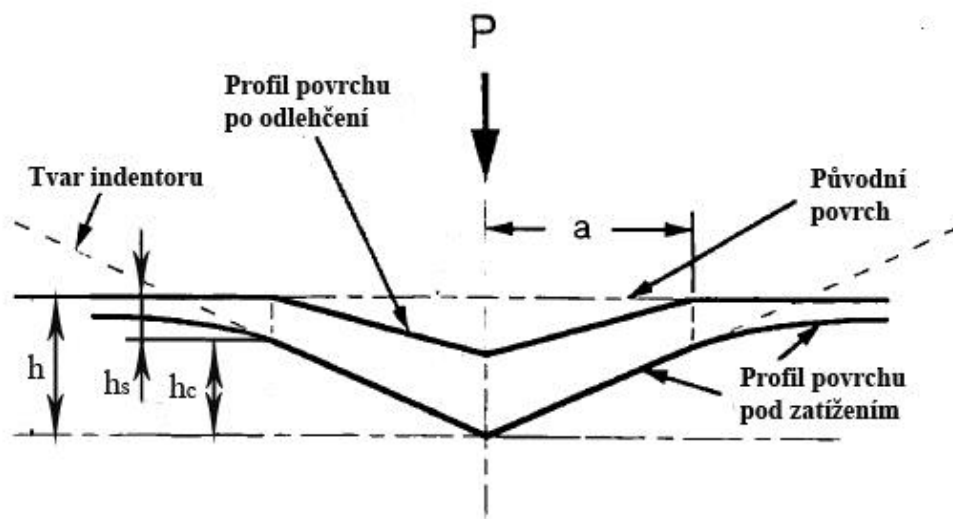
Ligamentum sacrotuberale jde od okraje křížové kosti na hrbol sedací kosti. Kříží *ligamentum sacrospinale* po jeho dorzální straně a spolu s ním ohraničuje velký a malý sedací otvor. Těmito otvory vystupují z pánve svaly a vzniklými štěrbinami cévy a nervy. [2], [1]

Podél horního a dolního okraje symfýzy se nacházejí velmi pevné vazy - *ligamentum pubicum superius* a *ligamentum arcuatum pubis*. Zvláště druhý jmenovaný je schopen, v případě roztržení spony, samostatně udržet spojení obou pánevních kostí. [2], [1]

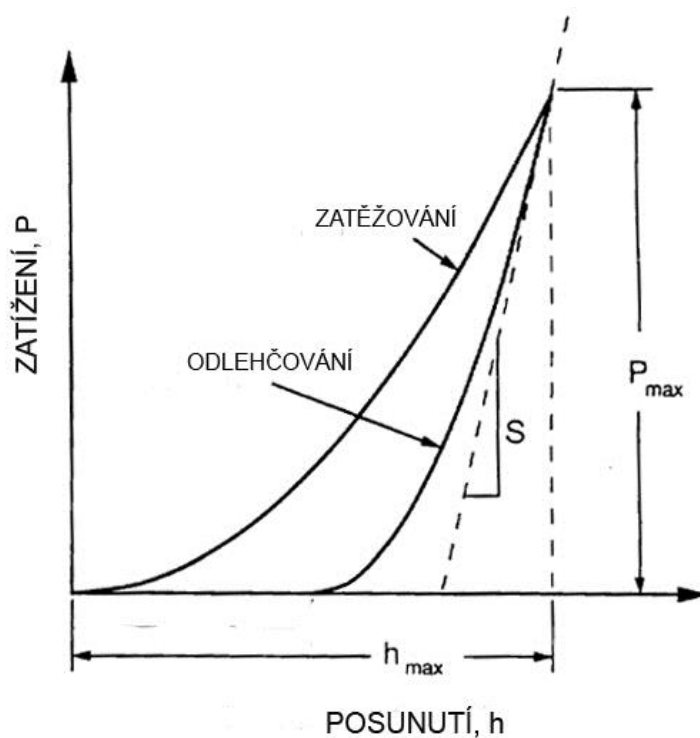
2.2 Nanoindentační analýza

2.2.1 Obecný princip nanoindentace

Obecný princip nanoindentace spočívá v zatlačování hrotu (indentoru) známé geometrie do povrchu zkoumaného materiálu (Obr. 2). Hrot je zatížen silou P v řádech μN , následkem čehož dojde k posunutí hrotu do hloubky h v řádech nm . Pro výpočet mechanických vlastností jsou výchozími data získaná během cyklu zatěžování a odlehčování (Obr. 3).



Obr. 2: Schematické znázornění nanoindentace: h - indentační hloubka, h_c - kontaktní hloubka, h_s - posunutí obvodu kontaktu oproti původnímu povrchu, a - kontaktní poloměr, P - zatížení (převzato z [3])



Obr. 3: Příklad nanoindentační křivky zátěž-posunutí (převzato z [3])

2.2.2 Analytický model – Oliver a Pharr

Standardně se pro vyhodnocení naměřených dat používá analytický model popsany v roce 1992 Oliverem a Pharrem v [4]. Tento model používá k určení mechanických vlastností odlehčovací křivku, z jejíž směrnice se určí kontaktní tuhost S :

$$S = \frac{dP}{dh} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} E_r \sqrt{A}, \quad (1)$$

kde A je kontaktní plocha a E_r je redukovaný modul pružnosti. Ten vyjadřuje skutečnost, že k pružným deformacím dochází jak ve vzorku, tak v indentoru a je dán rovnicí:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2}, \quad (2)$$

kde E_1 a ν_1 , jsou Youngův modul pružnosti a Poissonovo číslo pro indentor a E_2 a ν_2 jsou tytéž parametry pro vzorek. Kontaktní plocha A je dána vztahem:

$$A = C_0 h_c^2 + C_1 h_c^1 + C_2 h_c^{1/2} + C_3 h_c^{1/4} + \dots + C_8 h_c^{1/128}, \quad (3)$$

kde konstanty C_0 až C_8 musí být stanoveny experimentálně a h_c je kontaktní hloubka daná vztahem:

$$h_c = h_{max} - h_s, \quad (4)$$

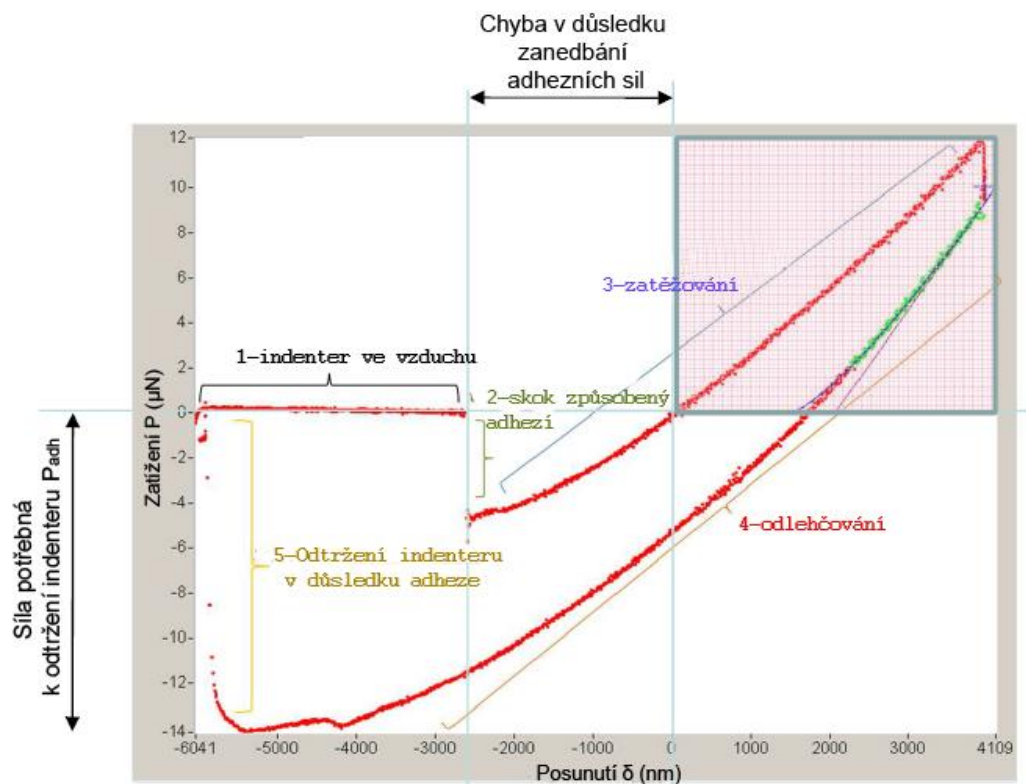
kde h_{max} je hloubka naměřená při maximálním zatížení P_{max} a h_s je pro konický hrot dáno jako:

$$h_s = \epsilon \cdot \frac{P_{max}}{S}, \quad (5)$$

kde ϵ je geometrická konstanta závisící na tvaru indentoru (pohybuje se v rozmezí od 0,72 pro kuželový indentor do 1 pro rovinný indentor).

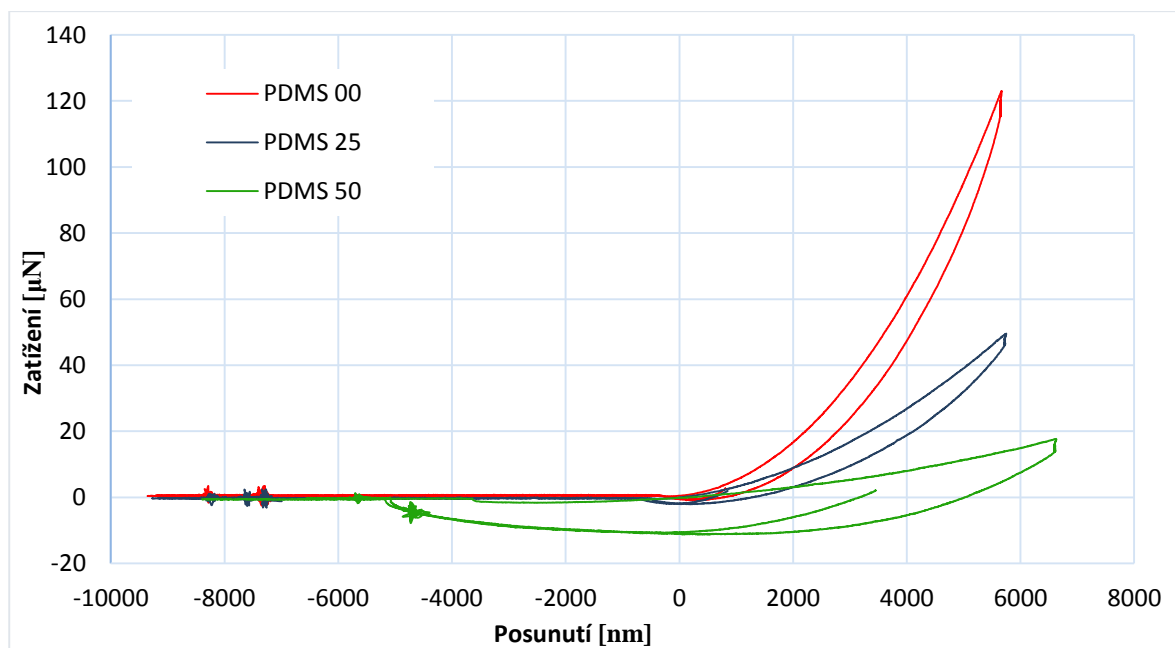
2.2.3 Vliv adheze

Jak již bylo řečeno v úvodu, pánevní vazy patří mezi měkké tkáně a jejich nanoindentace by tedy mohla být doprovázena adhezními silami. V takovém to případě můžeme v důsledku přilnutí vzorku na indentor pozorovat oblasti záporného zatížení (Obr. 4). Analytický model Olivera a Pharra by tedy v tomto případě uvažoval pouze část skutečné odlehčovací křivky a při určení mechanických vlastností tímto způsobem bychom se dopustili nepřesnosti.



Obr. 4: Příklad nanoindentační křivky naměřené za přítomnosti adheze (převzato z [8])

Přítomnost adhezních sil má také značný vliv na vývoj odlehčovací křivky, kdy je pro nanoindentaci zapotřebí menší zatížení a zvětšuje se velikost síly potřebné k odtržení indentoru. Tato skutečnost je zde ukázána na nanoindentačních křivkách tří vzorků polydimethylsiloxanu (PDMS) modifikovaných UV zářením, viz Obr. 5.



Obr. 5: Vliv adheze na průběh odlehčovací křivky vzorků PDMS modifikovaných UV zářením. Vzorky byly ozařovány po různou dobu (čísla 00, 25 a 50 jsou indexy vypovídající o různé době ozařování)

Pro případy, kdy uvažujeme přítomnost adheze, existují tři analytické modely řešení – DMT, JKR a Maugis-Dugdaleův. DMT model se používá pro pevné materiály s malou adhezí a pro malé poloměry indentoru. Naopak model JKR je vhodný pro materiály poddajné s výraznou adhezí a pro velké poloměry indentoru. Maugis-Dugdaleův model řeší stavy mezi JKR a DMT. [5]

Měkké tkáně můžeme charakterizovat jako velmi poddajný materiál, a proto se dále budeme věnovat analýze JKR, kterou v roce 1971 popsali Johnson, Kendall a Roberts v [7].

2.2.4 Analytický model - JKR

Johnson, Kendall a Roberts ve své práci vycházeli z Hertzova odvození kontaktního poloměru a mezi dvěma hladkými elastickými tělesy kulového tvaru o poloměrech R_1 a R_2 zatížených normálovou silou P (Obr. 6):

$$a^3 = \frac{3}{4} \pi (k_1 + k_2) \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} P, \quad (6)$$

kde k_1 a k_2 jsou elastické konstanty materiálů obou koulí, tedy

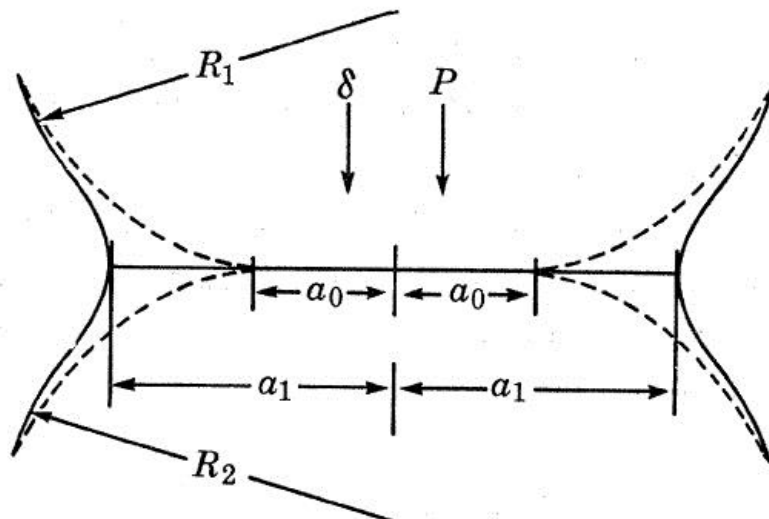
$$k_1 = \frac{1 - \nu_1^2}{\pi E_1} \quad (7)$$

a obdobně

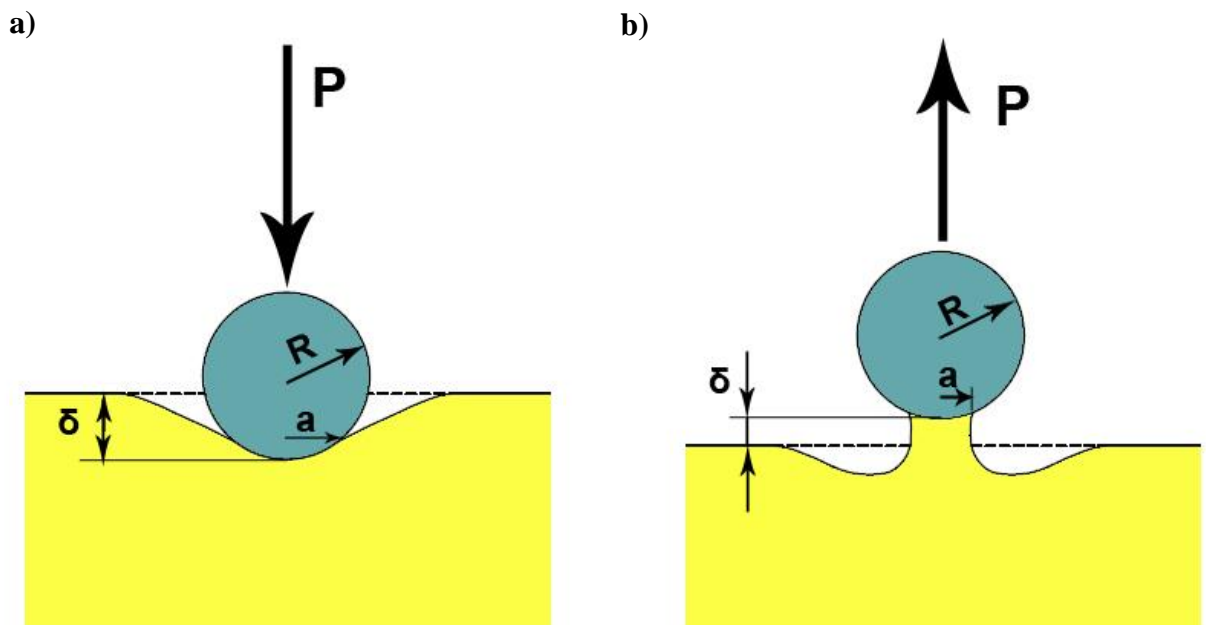
$$k_2 = \frac{1 - \nu_2^2}{\pi E_2}, \quad (8)$$

kde ν je Poissonovo číslo a E Youngův modul pružnosti pro jednotlivé materiály koulí. Hertz dále určil, že díky lokální kompresi v těsné blízkosti kontaktní oblasti dochází k vzájemnému přiblížení bodů obou koulí o vzdálenost δ , která je dána:

$$\delta^3 = \frac{9}{16} \pi^2 (k_1 + k_2)^2 \frac{R_1 + R_2}{R_1 R_2} P^2. \quad (9)$$



Obr. 6: Kontakt mezi dvěma elastickými kulovými tělesy: a_0 – kontaktní poloměr při absenci povrchových sil, a_1 – kontaktní poloměr za přítomnosti povrchových sil, R_1, R_2 – poloměry koulí, P – zatížení, δ – elastické posunutí (převzato z [6])



Obr. 7: Kontakt mezi kulovým indentorem a rovinným povrchem za přítomnosti adheze: a) zatěžování vzorku, b) odlehčování

Johnson, Kendall a Roberts poté na základě Hertzovi teorie odvodili funkční vztah, který popisuje kontaktní poloměr mezi kulovým indentorem a rovinným povrchem vzorku, za předpokladu působení adhezních sil (Obr. 7):

$$a^3 = \frac{R}{K} \cdot \left(P + 3\gamma\pi R + \sqrt{\{6\gamma\pi RP + (3\gamma\pi R)^2\}} \right), \quad (10)$$

kde a je kontaktní poloměr, R je poloměr indentoru, P je zatížení vzorku a γ je mezifázová energie vztážená na jednotku plochy kontaktu. K je konstanta definovaná jako:

$$K = \frac{4}{3} \left(\frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right), \quad (11)$$

kde výraz v závorce odpovídá převrácené hodnotě redukovaného modulu. Při nulovém zatížení je tedy plocha kontaktu konečná a rovnice (10) přejde do tvaru:

$$a_0^3 = \frac{6\gamma\pi R^2}{K}, \quad (12)$$

kde a_0 značí kontaktní poloměr při nulovém zatížení. V souvislosti s těmito vztahy bylo v [6] dále odvozeno, že k odtržení indentoru od materiálu je zapotřebí síla:

$$P_{adh} = -\frac{3}{2}\gamma\pi R. \quad (13)$$

Síla P_{adh} tedy není závislá na modulu pružnosti, ale závisí pouze na poloměru indentoru a na velikosti mezifázové energie.

Pro posunutí δ , v případě kdy uvažujeme adhezní síly, platí zobecněná přechodová rovnice, kterou odvodili Pietrement and Troyon v [7]:

$$\delta = \frac{a_0^2}{R} \left(\frac{\alpha + \sqrt{1 - \frac{P}{P_{adh}}}}{\alpha + 1} \right)^{\frac{4}{3}} - \frac{2a_0^2}{3R} \left(\frac{\alpha + \sqrt{1 - \frac{P}{P_{adh}}}}{\alpha + 1} \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (14)$$

kde α je přechodový parametr, který je pro metodu JKR roven 1.

Při vyhodnocování dat odečteme P_{adh} přímo z naměřené křivky, a protože nanoindentaci je prováděna hrotem o známém poloměru R , můžeme z rovnice (13) rovnou stanovit mezifázovou energii γ :

$$\gamma = -\frac{P_{adh}}{1,5\pi R}. \quad (15)$$

Pokud dále do rovnice (12) dosadíme vztahy (11) a (2) a upravíme, dostaneme finální vztah pro výpočet redukovaného modulu:

$$E_r = \frac{9\pi R^2 \gamma}{2a_0^3}. \quad (16)$$

Kontaktní poloměr při nulovém zatížení a_0 získáme nafilováním odlehčovací křivky podle rovnice (14).

3 Cíle práce

Z předešlých kapitol vyplývají tyto cíle práce:

- Provést nanoindentační experiment na vazech pánevního dna.
- Zvolit vhodný analytický model pro vyhodnocení naměřených dat.
- Stanovit redukovaný modul pružnosti pro vazivové tkáně pánevního dna.
- Zhodnotit výsledky provedeného experimentu.

4 Experiment

4.1 Příprava vzorků

Vzorky pro nanoindentaci jsou odebrané peroperačně a nejde tudíž o kadaverózní tkáň. Ihned po odebrání jsou vzorky označeny stehem a uzavřeny do odběrové nádoby se sterilním fyziologickým roztokem o pokojové teplotě.

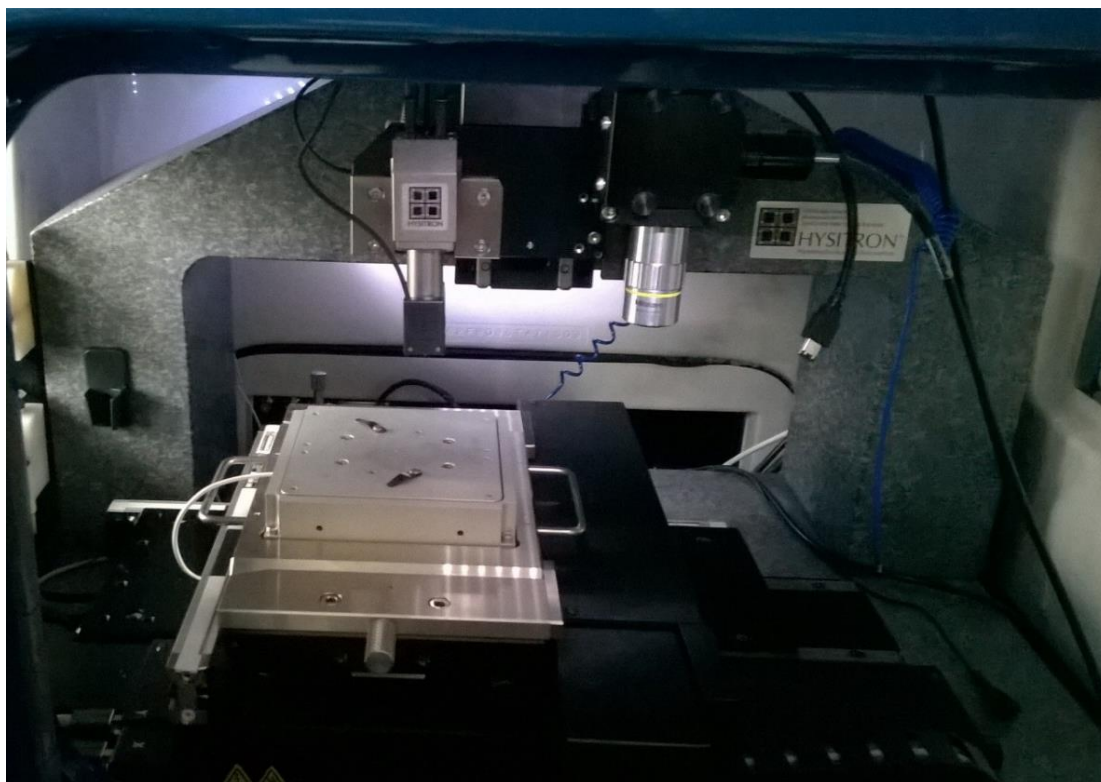
Následně musí být vzorky co nejrychleji dopraveny ze sálu do laboratoře (čas hraje důležitou roli pro viabilitu tkáně). Vzorky se jemně osuší a pod lupou se zorientují a očistí. Poté se rychle zmrazí pomocí kryospreje a nechají se 20 minut v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro zalití tkáně na krájecí bloček se používá montovací medium O.C.TTM Compound Tissue-Tek® (od firmy Sakura Finetek USA, Inc.), které je rozpustné ve vodě a neovlivňuje tkáň. Řezy se krájí tenké 50 mikrometrů, za použití kryotomu Leica CM1850 (od německé firmy Leica Biosystems Nussloch GmbH), při konstantní teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Řezy se natahují na sklíčka pokrytá tenkou vrstvou Entellanu® (od německé firmy Merck KGaA) a následně se na 5 vteřin ponoří do nesterilního fyziologického roztoku o pokojové teplotě. Ihned poté musí vzorky do lednice ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Aby se zabránilo vysychání, umístí se k nim do kontejneru i trocha fyziologického roztoku.

4.2 Nanoindentace

4.2.1 Měřicí soustava

Nanoindentace vazivových tkání pánevního dna proběhla na přístroji TI 950 TriboIndenterTM od americké firmy Hysitron, Inc. (Obr. 8). Vzorek byl během indentace připevněn na stolek s rozšířeným rozsahem posuvu $500\text{ }\mu\text{m}$ v ose Z. V případě použití tohoto stolku nedochází k posuvu indentoru, ale indentace se realizuje posuvem stolku. Nanoindentace byla prováděna konosferickým hrotem s vrcholovým úhlem 90° a poloměrem zaoblení $R = 10\text{ }\mu\text{m}$. Tento hrot se používá speciálně pro měkké tkáň, protože větší poloměr zajistí větší kontakt s plochou.



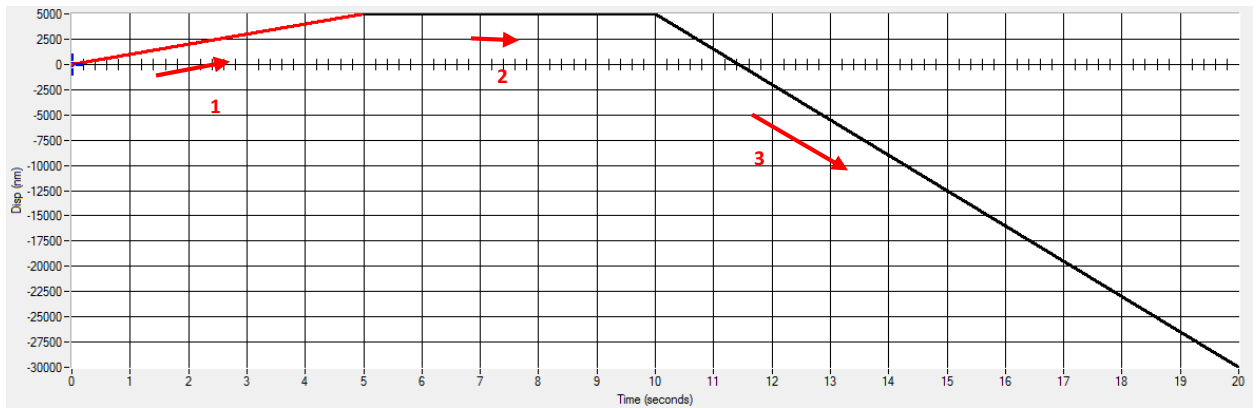
Obr. 8: TI 950 TriboIndenter™

4.2.2 Postup měření

Pro analýzu pánevních vazů byla použita kvazistatická nanoindentace. Analýze byly konkrétně podrobeny vazy *lig. arcuatum pubis* a *lig. pubicum superius*. Nanoindentační experiment proběhl do 12 hodin od odebrání vzorků. Pro indentaci byly použity řezy s tloušťkou 50 μm , což je největší možná tloušťka histologických řezů. Vzorek byl během měření lubrikován fyziologickým roztokem, který byl průběžně doplňován. Vzorek byl lokalizován pomocí mikroskopu, indenty byly umístovány s přesností 1,5 μm . Vzdálenost mezi jednotlivými indenty byla 40 μm .

Na počátku měření jsme vzorek předběžně zatížili silou cca 0,5 μN , abychom zjistili nulovou pozici. Vlastní nanoindentace byla poté řízena zatěžovací funkcí, která byla nastavena následovně (Obr. 9):

0. Vysunutí hrotu ze vzorku 30 μm za 10 sekund a následovné přiblížení ke vzorku za 30 sekund.
1. Zapíchnutí hrotu do vzorku s předepsanou hloubkou 5 μm za 5 sekund.
2. Udržování předepsané hloubky 5 μm po dobu 5 sekund – relaxační segment.
3. Vysunutí hrotu ze vzorku o 5 + 30 μm za 10 sekund.



Obr. 9: Zatěžovací funkce: **0.** Vysunutí hrotu ze vzorku 30 µm za 10 sekund a následovné přiblížení ke vzorku za 30 sekund. **1.** Zapíchnutí hrotu do vzorku s předepsanou hloubkou 5 µm za 5 sekund. **2.** Udržování předepsané hloubky µm po dobu 5 sekund – relaxační segment. **3.** Vysunutí hrotu ze vzorku o 5 + 30 µm za 10 sekund

4.2.3 Kalibrace indentační plochy

Tvar hrotu není ideální, a je tedy nutno provést kalibraci, která přesně popíše jeho tvar. Standardně se kalibrace provádí nanoindentací taveného křemenu se známou indentační tvrdostí $H_{IT} = 9,25$ GPa a známým redukovaným modulem $E_r = 69,6$ GPa. Nastaví se zatěžovací funkce a prostřednictvím módu CMX (hrot je s rostoucí kvazistatickou zatěžovací silou zatlačován do materiálu a zároveň je buzen harmonickou silou) je vytvořen hloubkový profil mechanických vlastností, pomocí něhož se získá polynomická funkce popisující tvar hrotu.

V případě, že nanoindentace je prováděna v indentačních hloubkách přesahujících vliv zaoblení indentoru, je možné vyhodnotit kontaktní plochu analyticky. Nejprve je třeba určit indentační hloubku h_T , která je v místě přechodu kulového vrcholu indentoru v kužel (bod T na Obr. 10). V případě, že je indentační hloubka $h \leq h_T$, je kontaktní plocha vyhodnocována jako plocha sférického indentoru pomocí [9]:

$$r^2 = 2Rh - h^2, \quad (17)$$

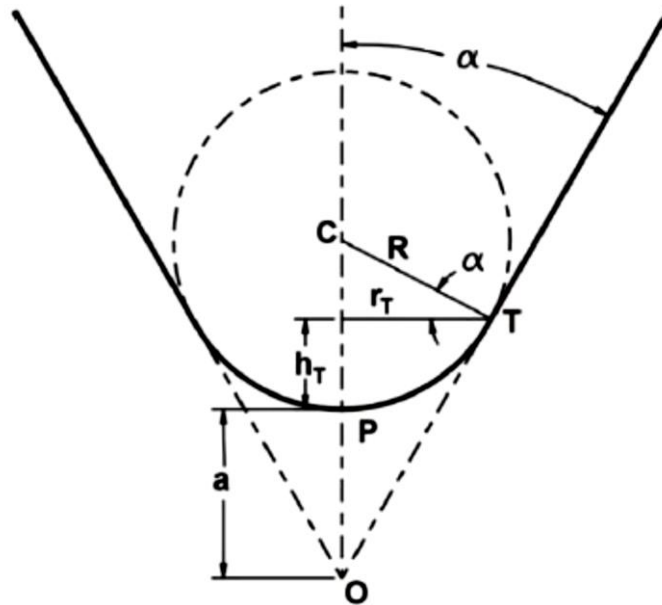
$$A = \pi(2Rh - h^2), \quad (18)$$

kde r poloměr kontaktní plochy. Pokud $h \geq h_T$, vyhodnocujeme kontaktní plochu jako plochu kuželového indentoru a určíme ji pomocí [9]:

$$r = tg \alpha(a + h), \quad (19)$$

$$A = \pi \cdot [tg \alpha(a + h)]^2, \quad (20)$$

kde α je poloviční vrcholový úhel indentoru a a je vzdálenost skutečného vrcholu konosferického indentoru od vrcholu ideálního kuželového indentoru.

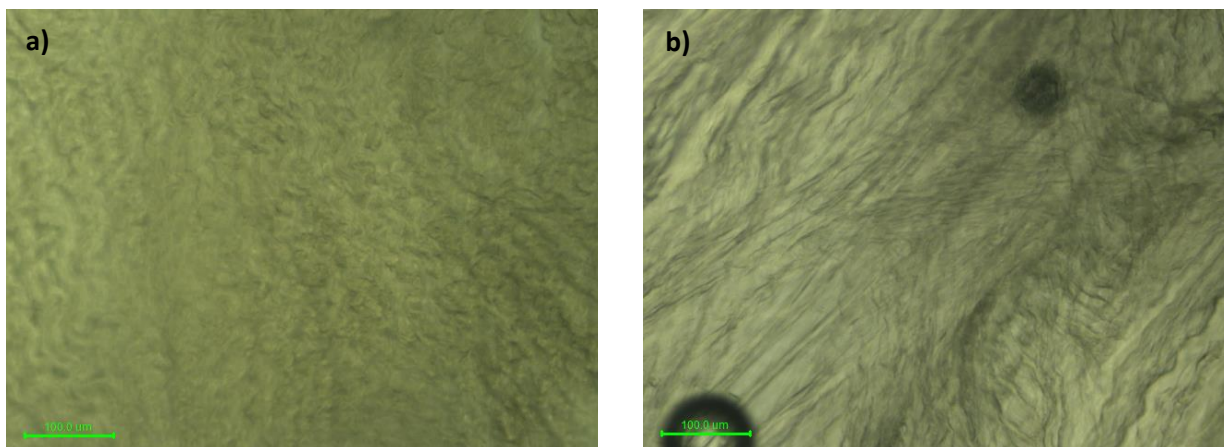


Obr. 10: Schéma geometrie konosferického indentoru: T – místo přechodu mezi koulí a kuželem, h_T – indentační hloubka v bodě T , r_T – poloměr indentační plochy v bodě T , R – poloměr zaoblení indentoru, α – poloviční vrcholový úhel indentoru, a – vzdálenost skutečného vrcholu konosferického indentoru od vrcholu ideálního kuželového indentoru (převzato z [9])

Při našem experimentu se pohybujeme v indentačních hloubkách větších než $10 \mu\text{m}$, které přesahují vliv zaoblení hrotu (v našem případě je $h_T = 2,93 \mu\text{m}$). Proto jsme kontaktní plochu vyhodnocovali jako plochu kuželu, čímž jsme získali funkci kontaktní plochy, která odpovídá přesnému tvaru hrotu:

$$A = \pi h_c^2 + 26\,025,806 h_c \quad (21)$$

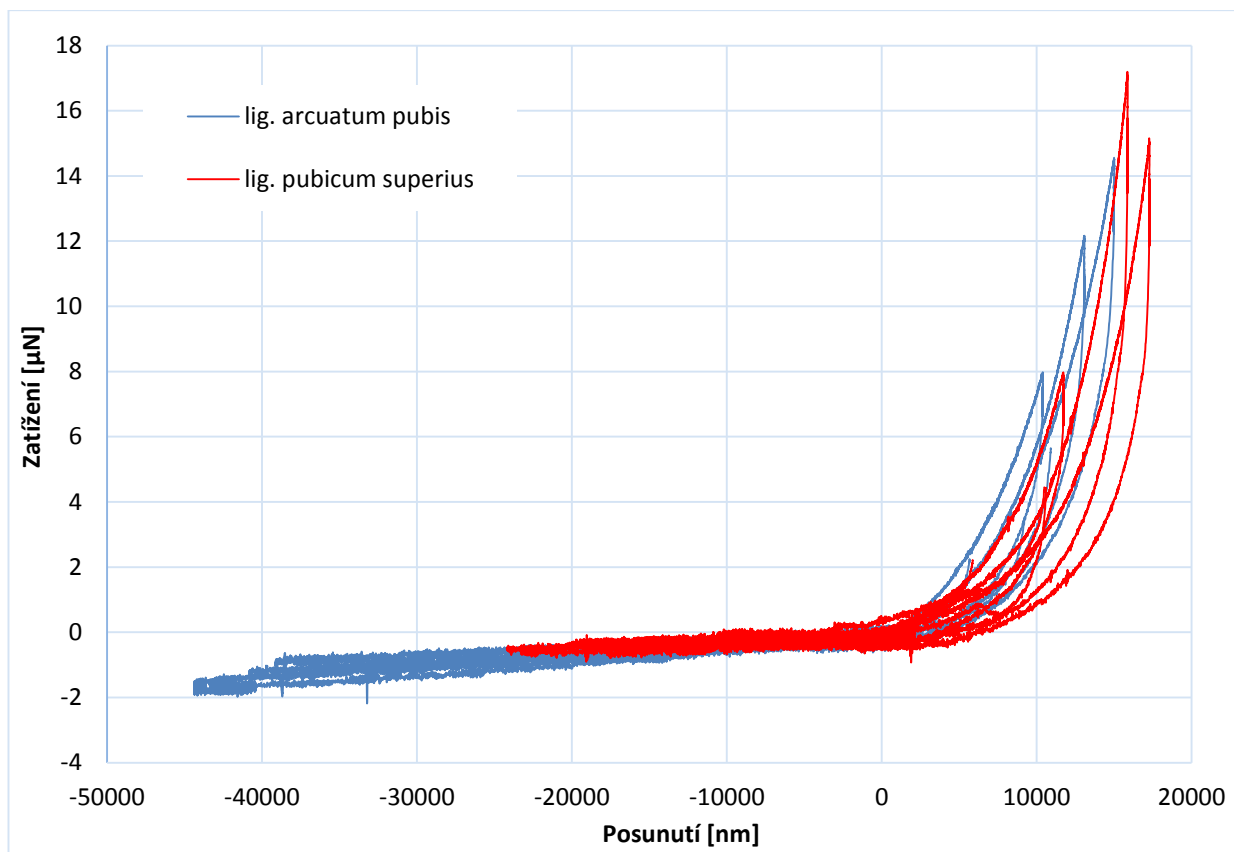
5 Výsledky



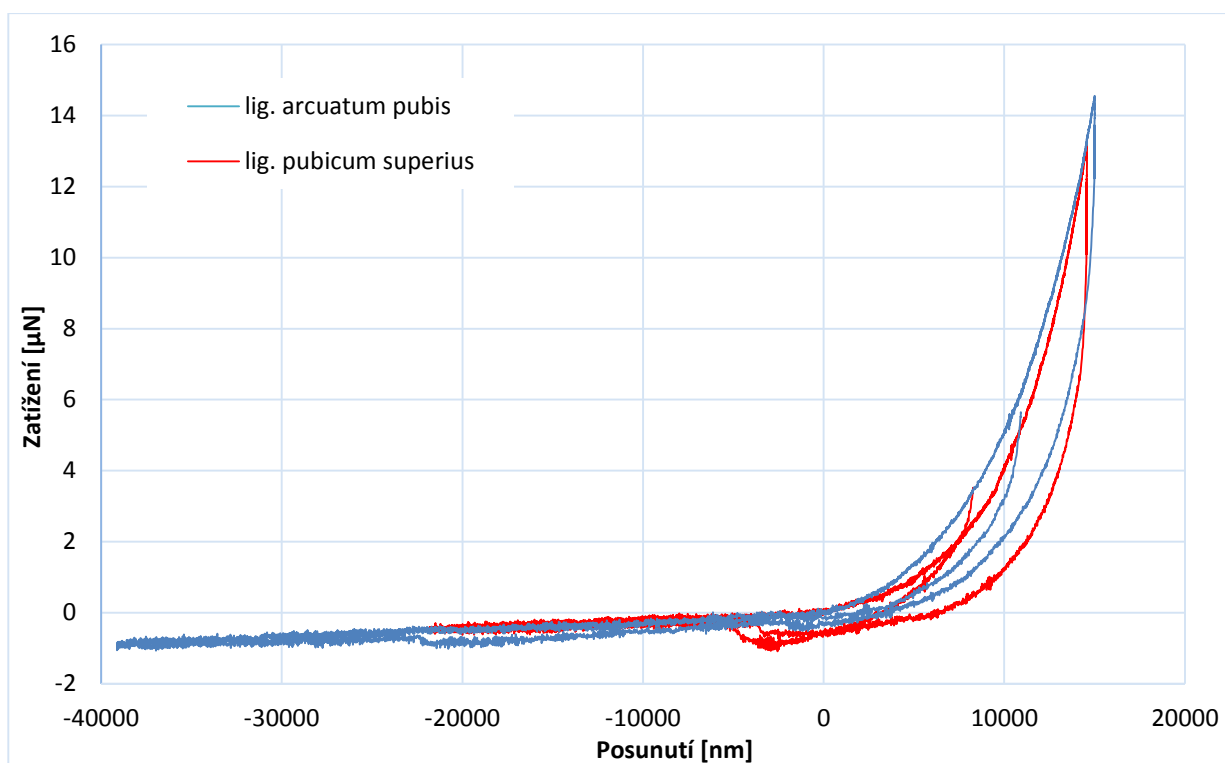
Obr. 11: Snímky pořízené pomocí světelného mikroskopu, který je zabudovaný v nanoindentoru: a) *lig. arcuatum pubis*, b) *lig. pubicum superius*. Na snímcích je patrná zvlňená struktura vazů tvořená svazky kolagenních vláken.

Na každém vzorku bylo provedeno 18 indentů a z těch bylo analyzováno 7 nanoindentačních křivek pro *lig. arcuatum pubis* a 14 nanoindentačních křivek pro *lig. pubicum superius* (některé křivky byly vyřazeny kvůli špatnému kontaktu mezi hrotem a povrchem vzorku, nebo např. vlivu podkladového sklíčka na mechanické vlastnosti). Pro názornost jsou 3 nanoindentační křivky od každého vazy uvedeny na Obr. 12, kde je vidět rozdílné dosažené zatížení a indentační hloubky jak mezi oběma vazy navzájem, tak i v rámci jednoho vazy.

Adhezní síly se při experimentu výrazněji projevíly pouze ve dvou měřeních (Obr. 13). V ostatních případech byl jejich vliv zanedbatelný, a proto jsme pro vyhodnocení použili analytický model Olivera a Pharra.



Obr. 12: Nanoindentační křivky: červená - *lig. pubicum superius*, modrá - *lig. arcuatum pubis*. Na červených křivkách dosahujeme větších indentačních hloubek než na modrých.



Obr. 13: Naměřené nanoindentační křivky s adhezními silami: červená - *lig. pubicum superius*, modrá - *lig. arcuatum pubis*. Na těchto křivkách jsou pozorovatelné (oproti křivkám na Obr. 12) skoky v zatěžovací síle způsobené adhezí. Adheze se více projevuje na červené křivce, na modré velmi málo.

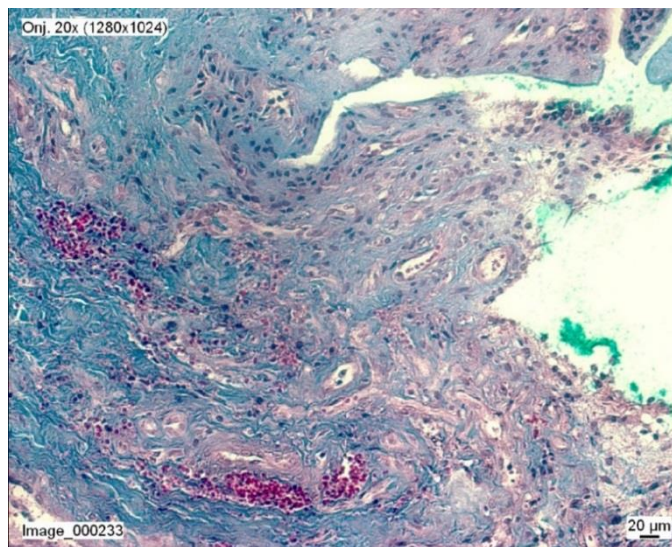
Aplikací modelu Olivera a Pharra jsme získali redukovaný modul vazů *lig. arcuatum pubis* $E_r = 88,00 \pm 17,15$ kPa a vazů *lig. pubicum superius* $E_r = 95,29 \pm 40,68$ kPa (Tab. 1). Minimální hodnota redukovaného modulu vazů *lig. arcuatum pubis* byla $E_r = 70$ kPa a jeho maximální hodnota pak $E_r = 115$ kPa. U vazů *lig. pubicum superius* byl stanoven minimální redukovaný modul $E_r = 32$ kPa a maximální $E_r = 173$ kPa.

Tab. 1: Výsledné hodnoty kontaktní hloubky - h_c , redukovaného modulu - E_r a jejich směrodatná odchylka - SD_{h_c} a SD_{E_r}

	h_c [μm]	SD_{h_c} [nm]	E_r [kPa]	SD_{E_r} [kPa]
Ligamentum arcuatum pubis	11,42	1,76	88,00	17,15
Ligamentum pubicum superius	13,46	2,83	95,29	40,68

6 Diskuze

Jak můžeme vidět v Tab. 1, u obou vazů jsou poměrně velké rozptyly hodnot naměřených redukovaných modulů (u vazů *lig. arcuatum pubis* je rozptyl 34,3 kPa a u *lig. pubicum superius* dokonce 81,36 kPa). Tato skutečnost by mohla vypovídat o nehomogenní struktuře vazů (detailní struktura vazů je ukázána na Obr. 14), neboť pomocí nanoindentace vyhodnocujeme vždy pouze mechanické vlastnosti určitého místa, nikoli vazů jako celku a můžeme tak tedy získat lepší představu o mikrostruktuře vazů a jeho chování.



Obr. 14: Detailní struktura vazivové tkáně ukázána na vazů *ligamentum tibiofibulare anterius* (vaz nacházející se v oblasti kotníku). Modře jsou nabarvena kolagenní vlákna, červenofialově granulační vazivo, červeně jsou zobrazeny erythrocyty a tmavě modrá jsou jádra fibroblastů.

Dále můžeme v Tab. 1 vidět, že výsledné průměrné hodnoty redukovaných modulů obou vazů jsou téměř shodné, obecně jsme však naměřili vyšší hodnoty modulů u vazů *lig. pubicum superius*. Pokud ale vezmeme v úvahu fakt, že *lig. arcuatum pubis* by měl sám udržet spojení pánevních kostí i v případě roztržení symfýzy (kapitola 2.1), měl by být tento vaz pevnější než *lig. pubicum superius*. Z toho důvodu bychom měli také uvážit možné ovlivnění morfologie vazů v důsledku nemoci či stáří pacienta, jemuž byly vzorky odebrány a možný vliv chemických přípravků použitých při přípravě vzorků.

Adhezní síly se při nanoindentaci uvedených vazů projevíly pouze ve dvou případech (opět možné ovlivnění chemickými přípravky) a proto jsme pro vyhodnocení použili analytický model Olivera a Pharra. Tento model je standardně používán pro vyhodnocení nanoindentací lineárně elastických materiálů, které nevykazují přítomnost adhezních sil a kontaktní plocha je v tomto případě určena pouze geometrií indentoru.

Abychom tedy získali lepší představu o globálních mechanických vlastnostech obou vazů, bylo by dále vhodné, zaměřit se na důkladné proměření celé tkáně včetně vnitřní mikrostruktury. Pro ověření správnosti získaných výsledků a celého postupu našeho nanoindentačního experimentu by rovněž bylo žádoucí zahrnout do experimentu vzorky od širokého spektra pacientů a ověřit vliv přípravy vzorků.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit redukovaný modul pružnosti vazů pánevního dna pomocí nanoindentace.

V rešeršní studii jsme se zabývali anatomii pánevního dna a analytickými modely pro vyhodnocení nanoindentčního měření v souvislosti s možnou přítomností adhezních sil.

Nanoindentční experiment byl proveden na pánevních vazech *ligamentum arcuatum pubis* a *ligamentum pubicum superius*, histologické řezy pro měření byly připraveny na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Měření mechanických vlastností proběhlo na přístroji TI 950 TriboIndenter™ od firmy Hysitron a měřena byla nativní tkáň.

Z důvodu projevení adhezních sil pouze ve dvou případech, byl pro vyhodnocení zvolen analytický model Olivera a Pharra a redukované moduly byly stanoveny: $E_r = (88,00 \pm 17,15)$ kPa pro *ligamentum arcuatum pubis* a $E_r = (95,29 \pm 40,68)$ kPa pro *ligamentum pubicum superius*. Diskuse k získaným výsledkům je uvedena v kapitole 6.

Všechny stanovené cíle práce byly splněny, nicméně bylo by vhodné v nanoindentčních měřeních dále pokračovat, abychom získali lepší představu o globálních mechanických vlastnostech pánevních vazů a ověřili správnost získaných výsledků.

Seznam použité literatury

- [1] DYLEVSKÝ, I. *Funkční anatomie*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-32404
- [2] ČIHÁK, R. *Anatomie I*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2001. ISBN 80-7169-970-5
- [3] NETTER, F. H. *Anatomický atlas člověka*. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0517-6
- [4] OLIVER, W. C., PHARR, G. M. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. In: *Journal of Materials Research*. Vol. 7, No. 6, 1992, p. 1564-1583. ISSN 2044-5326
- [5] GRIERSON, D. S., FLATER, E. E., CARPICK, R. W. Accounting for the JKR–DMT transition in adhesion and friction measurements with atomic force microscopy. In: *Journal of Adhesion Science and Technology*, Vol. 19, No. 3-5, 2005, pp. 291–311. ISSN 0169-4243
- [6] JOHNSON, K. L., KENDALL, K., ROBERTS, A.D. Surface energy and the contact of elastic solids. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, Vol. 324, No. 1558, 1971, pp. 301-313. ISSN 1364-5021
- [7] PIÉTREMENT, O., TROYON, M. General equations describing elastic indentation depth and normal contact stiffness versus load. In: *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 226, No. 1, 2000, pp. 166-171. ISSN 0021-9797
- [8] WAHL, K. J., ASIF, S. A. S., GREENWOOD, J. A., JOHNSON, K. L. Oscillating adhesive contacts between micron-scale tips and compliant polymers. In: *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 296, No. 1, 2006, pp. 178–188. ISSN 0021-9797
- [9] MESA, B. Spherical and rounded cone nanoindenters. In: *Micro Star Tech* [online]. Micro Star Technologies Inc., [vid. 3.6.2015]. Dostupné z:
<http://www.microstartech.com/index/ConicalIndenters2.pdf>

Seznam použitých symbolů

A	Kontaktní plocha
a	Kontaktní poloměr
a	Vzdálenost skutečného vrcholu konosferického indentoru od vrcholu ideálního kuželového indentoru
a_0	Kontaktní poloměr při nulovém zatížení
E	Youngův modul pružnosti
E_r	Redukovaný modul pružnosti
h	Indentační hloubka
h_c	Kontaktní hloubka
h_{max}	Maximální indentační hloubka
h_s	Hloubka posunutí obvodu kontaktu oproti původnímu povrchu
h_T	Indentační hloubka v místě přechodu kulového vrcholu indentoru v kužel
H_{IT}	Indentační tvrdost
K	Elastická konstanta
k_1, k_2	Elastické konstanty
P	Zatížení
P_{adh}	Síla potřebná k odtržení indentoru od materiálu
P_{max}	Maximální zatížení
R	Poloměr indentoru
R_1, R_2	Poloměry kulových elastických těles
r	Poloměr kontaktní plochy
S	Kontaktní tuhost
SD	Směrodatná odchylka
α	Přechodový parametr
α	Poloviční vrcholový úhel indentoru
γ	Mezifázová energie
δ	Elastické posunutí
ϵ	Geometrická konstanta
ν	Poissonovo číslo