



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV MECHANIKY TĚLES, MECHATRONIKY A BIOMECHANIKY

INSTITUTE OF SOLID MECHANICS, MECHATRONICS AND BIOMECHANICS

VLIV ZMRAZENÍ ARTERIÁLNÍ TKÁNĚ NA JEJÍ DEFORMAČNĚ-NAPĚŤOVOU ODEZVU

THE IMPACT OF FREEZING OF ARTERIAL TISSUE ON ITS STRESS-STRAIN RESPONSE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

František Horák

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE

Ing. Anna Hrubanová

SUPERVISOR

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Ústav:	Ústav mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky
Student:	František Horák
Studijní program:	Základy strojního inženýrství
Studijní obor:	Základy strojního inženýrství
Vedoucí práce:	Ing. Anna Hrubanová
Akademický rok:	2022/23

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Vliv zmrazení arteriální tkáně na její deformačně–napět'ovou odezvu

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Zmrazování tkání pro experimentální testování je běžný postup v praxi. Skladování tkání při teplotě okolo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je často využívanou metodou pro její snadnou dostupnost, avšak vliv této metody na mechanické vlastnosti tkání dosud není jednoznačně ověřen. Na základě literární rešerše bude zjištěn současný stav problematiky týkající se zmrazování tkání. Budou provedeny biaxiální tahové zkoušky na čerstvých a zmrazených prasečích aortách a na základě měření určeno, zda tento postup skladování tkáně významně ovlivňuje mechanické vlastnosti.

Cíle bakalářské práce:

Na základě literární rešerše zjistit současný stav poznání v problematice zmrazování tkání. Provést biaxiální zkoušky na prasečích aortách v čerstvém a zmrazeném stavu. Na základě znalostí z bakalářského studia určit pomocí statistické analýzy vliv zmrazování na mechanické vlastnosti prasečí aortální tkáně.

Seznam doporučené literatury:

- BURŠA, J.: Biomechanika srdečně-cévní soustavy. Elektronické studijní opory VUT v Brně.
- Mechanics of biological tissue, eds. HOLZAPFEL, G. A., OGDEN, R. W., Springer, 2006.
- KRAJÍČEK, M., PEREGRIN, J. H., ROČEK, M.: Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění. Grada, 2007.
- ROSS, Michael H. a Wojciech PAWLINA. Histology: a text and atlas : with correlated cell and molecular biology, 2016.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2022/23

V Brně, dne

L. S.

prof. Ing. Jindřich Petruška, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jiří Hlinka, Ph.D. děkan
fakulty

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou zmrazení arteriální tkáně při teplotách $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a jeho vlivem na mechanické vlastnosti tepny. Úvodní teoretická část se ve stručnosti věnuje základním medicínským pojmům souvisejících s problematikou. Následující rešeršní část se zaměřuje na vědecké publikace, které se věnují zmrazování arteriální tkáně. Pozornost je zde věnována hlavně metodice měření, vyhodnocení a interpretaci výsledků. Hlavní část práce obsahuje kompletní popis metodiky biaxiální tahové zkoušky prasečí arteriální tkáně spolu s postupem zjišťování Youngova modulu pružnosti před a po zmrazení. V rámci vyhodnocení naměřených dat je použita statistická analýza k posouzení vlivu zmrazení na mechanické vlastnosti tepny. V závěru jsou obsaženy vymezení a možné nedostatky experimentu.

Klíčová slova

Aorta, mechanické vlastnosti, Youngův modul pružnosti, zmrazení tkáně, biaxiální tahová zkouška

Abstract

This bachelor thesis deals with freezing of the arterial tissue at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and its impact on mechanical properties of artery. The introductory part focuses on basic medical terms related to the issue followed by presentation of scientific publications dealing with artery tissue freezing. The attention is mainly paid to measurements and evaluation of results. The main part of the thesis contains description of the methodology of biaxial tensile test of porcine artery tissue with process of measuring the artery's Young's modulus. Statistical analysis is used to determine the impact of freezing on mechanical properties of the artery. Description of limitations of this experiment is also included.

Keywords

Aorta, mechanical properties, Young's modulus, tissue freezing, biaxial tensile test

Bibliografická citace

HORÁK, František. *Vliv zmrazení arteriální tkáně na její deformačně-napětovou odezvu*. Brno, 2023, 41 s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky. Vedoucí bakalářské práce Ing. Anna Hrubanová

Poděkování

Rád bych poděkoval svojí vedoucí Ing. Anně Hrubanové za pevné nervy, profesionální vedení, čas a ochotu při psaní této práce.

Rád bych také poděkoval svým rodičům za psychickou podporu a za ty nejlepší podmínky pro zdárný průchod celým studium.

Prohlášení autora o původnosti práce

Prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně, pod odborným vedením Ing. Anny Hrubanové. Současně prohlašuji, že všechny zdroje obrazových a textových informací, ze kterých jsem čerpal, jsou řádně citovány v seznamu použitých zdrojů.

.....

Podpis autora

Obsah

1. Úvod	12
2. Základní lékařské pojmy	13
2.1. Cévní soustava.....	13
2.2. Velký krevní oběh	13
2.3. Malý krevní oběh.....	13
2.4. Tepny (arterie)	14
2.5. Aorta	14
2.6. Stavba tepny	15
2.7. Mechanické vlastnosti tepen.....	16
3. Vliv zmrazení na arteriální tkáň – rešerše.....	18
3.1. Vliv dlouhodobého zmrazení prasečí aortální tkáně na její mechanické vlastnosti.....	18
3.2. Mechanika čerstvé, zchlazené a zmrazené arteriální tkáně	19
3.3. Charakterizace změn mechanických vlastností tepen vlivem uchování v chladu za použití nanoindentačních testů.....	20
3.4. Změny mechanických a biomechanických vlastností aortální tkáně v důsledku skladování v chladném prostředí	21
3.5. Vliv zmrazení a kryoprezervace na mechanické vlastnosti tepen	22
4. Vliv zmrazení na mechanické chování arteriální tkáně – biaxiální tahové zkoušky	25
4.1. Příprava vzorků	25
4.2. Měření – biaxiální tahová zkouška.....	28
4.3. Vyhodnocení tahových zkoušek.....	29
5. Výsledky.....	31
5.1. Vliv doby zmrazení	34
5.2. Limitace výsledků	35
6. Závěr.....	37
7. Seznam použitých citací.....	38
8. Seznam použitých zkratk, symbolů a veličin	40

1 Úvod

Vlivem vědeckého pokroku spojeného s usnadněním fyzické práce je velké množství lidí čím dál náchylnější k sedavému a nezdravému životnímu stylu. Proto i přes vysokou úroveň zdravotnictví je zde stále velké množství onemocnění tepen (ateroskleróza karotid, aneurysma břišní aorty).

Správný popis mechanických vlastností tepen je nezbytný k důvěryhodnému výpočtovému modelování a slouží pro vytvoření dílčího modelu materiálu. Výpočtové modelování umožňuje řešení deformačních a napěťových stavů, například aneurysmatu, a pomocí analýzy těchto stavů lze ověřovat a srovnávat pozorování získané z klinické praxe lékařů.

Aby bylo možné správně popsat mechanické vlastnosti daného materiálu, je nutné jej podrobit mechanickým zkouškám, jako je například zkouška tahem. Takto lze experimentálně zjistit hodnoty materiálových charakteristik, které je možné následně použít ve výpočtovém modelování. U biologických tkání není vždy možné podrobit je testům okamžitě po jejich získání, proto se mezitím zmrazují, aby nedošlo k jejich znehodnocení. Prezervace chladem je však proces, který může samotné vlastnosti tkáně nějakým způsobem ovlivnit.

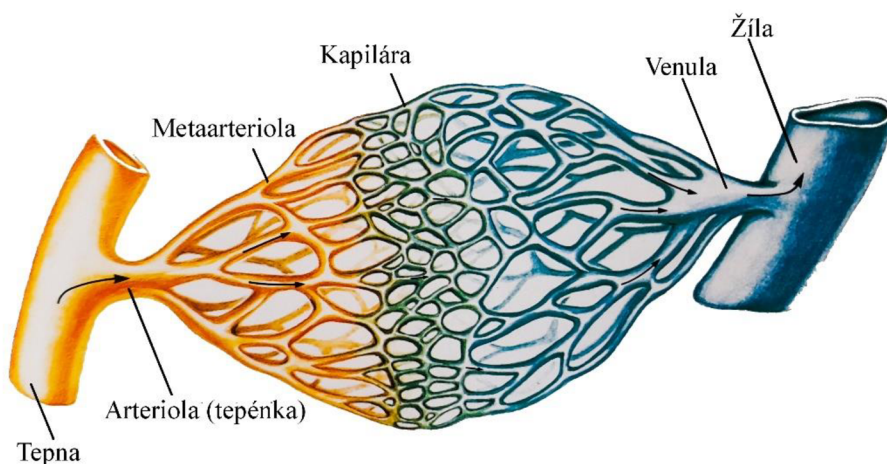
Existují 2 hlavní způsoby prezervace chladem. Kryoprezervace, což je zmrazení při teplotách kolem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zmrazení při běžných teplotách mrazáků kolem $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kryoprezervace byla již popsána poměrně velkým množstvím studií a bylo potvrzeno, že kryoprezervace určitým způsobem ovlivňuje vlastnosti měkkých tkání [13], [14] a [15]. Naproti tomu u prezervace při teplotách běžných mrazáků stále neexistuje dostatečné množství studií, které by vliv chladu na tkáň potvrzovaly nebo zamítaly. Správné pochopení této problematiky může odpovědět na otázku, zda je uchování v mrazáku vhodnou metodou pro prezervaci tkání.

Tato práce se bude zabývat tahovými zkouškami prasečí aortální tkáně a následně bude pomocí statistické analýzy posouzeno, zda uchování v mrazáku při teplotách $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ovlivňuje mechanické vlastnosti tepny.

2 Základní lékařské pojmy

2.1 Cévní soustava

Celá cévní soustava je postavena na myšlence uzavřeného systému obsahující mnoho trubic různých rozměrů, které se následně v jednotlivých segmentech odlišují svou stavbou, a tedy i vlastnostmi [1]. Dle typu tekutiny, která v cévách proudí, můžeme odlišit systém cév krevních a systém cév mízních [2]. Srdce spolu s cévami formuje tzv. krevní oběh, jenž je vhodně uspořádán, aby zajišťoval transportní funkci [1]. Stálý pohon krve je zajišťován pomocí dvou sériově řazených pump (srdeční komory), které jsou rovněž sériově řazeny do dvou oběhů: velkého krevního oběhu (kde je pumpa levá komora) a oběhu plicního (pumpa je pravá komora). Oba tyto oběhy jsou dále uspořádány do menších, opět sériově řazených jednotek: tepen, žil a kapilár (obrázek 1).



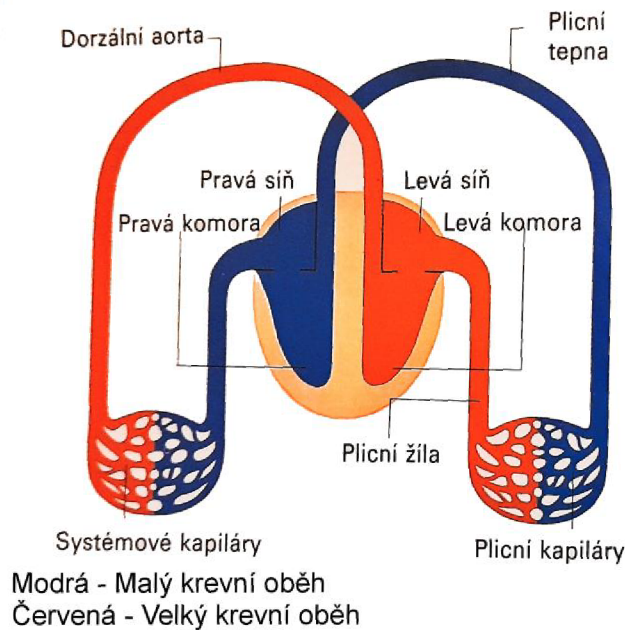
Obrázek 1: Postupné vrstvení cév (převzato a upraveno z [3])

2.2 Velký krevní oběh

Vede okysličenou krev z plic do levé poloviny srdce odkud je dále pumpována přes aortu do dalších cév a posléze orgánů [4]. V samotném srdci se kříží s malým krevním oběhem, avšak neprotínají se, protože obě části srdce jsou odděleny přepážkou [5]. Oba oběhy jsou však poháněny srdečním svalem současně.

2.3 Malý krevní oběh

Z pravé strany srdce získává odkysličenou krev, kterou vede do plic, kde se zbaví oxidu uhličitého a obohatí se o kyslík [4]. Odsud dále pokračuje do levé části srdce a posléze do velkého krevního oběhu. Oba oběhy a jejich propojenost v srdci je zobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma oběhové soustavy člověka (převzato a upraveno z [3])

2.4 Tepny (arterie)

Jedná se o velice důležitou část oběhového ústrojí, neboť právě do nich srdce pumpuje krev [6]. Přímo ze srdce vystupuje největší tepna nazývaná aorta neboli srdečnice. Aorta se následně větví do dalších velkých cév, které se rovněž dále dělí a vstupují do tkání a orgánů [1]. Tímto dělením a postupným zužováním zmenšují cévy svůj průsvit tzv. kalibr. Vnitřní průsvit aorty se pohybuje kolem 30 mm, zatímco u běžných tepen zásobujících orgány a svaly, se průsvit pohybuje v rozmezí 5–15 mm. Pakliže se průsvit sníží až na cca 3 mm, mluvíme již o tzv. arteriolách. Na arterioly se následně napojují vlásečnice neboli kapiláry, jež tvoří cévní síť. Jejich průsvit se pohybuje v rozmezí zhruba 6–50 μm .

Tepny s menším průsvitem mají ve své stěně velký obsah svaloviny, jež svým stažením vyvolá změnu jejich průsvitů [1]. Tato vlastnost umožňuje řízení průtoku krve. Vnitřní průměr tepny má také vliv na regulaci krevního tlaku. Děje se tomu tak z důvodu ovlivňování odporu v krevním řečišti.

2.5 Aorta

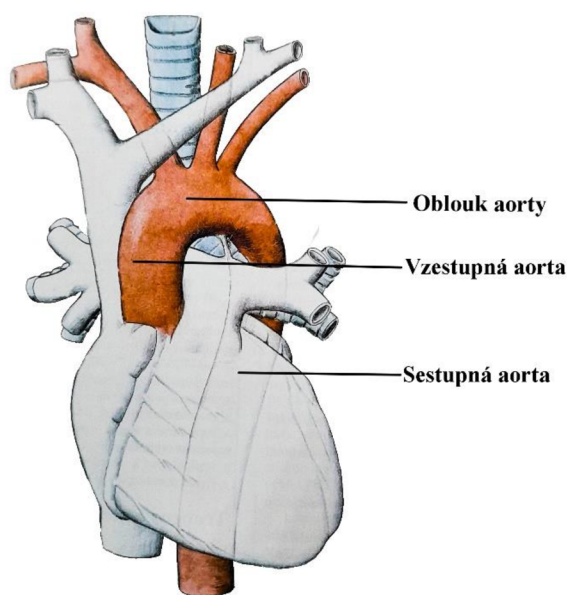
Aorta je největší tepna lidského těla, která vystupuje kraniálně z levé srdeční komory [7]. Zároveň se dělí na několik úseků:

Vzestupná aorta – Je dlouhá asi 5 cm a napojuje se na oblouk aorty.

Oblouk aorty – Dosahuje až levého boku třetího a čtvrtého hrudního obratle, kde následně přechází v sestupnou aortu [2].

Sestupná aorta – Line se před břišní a hrudní páteří a následně je rozdělena bránicí na část hrudníkovou a na část, která pokračuje v břišní dutině – břišní aorta [7].

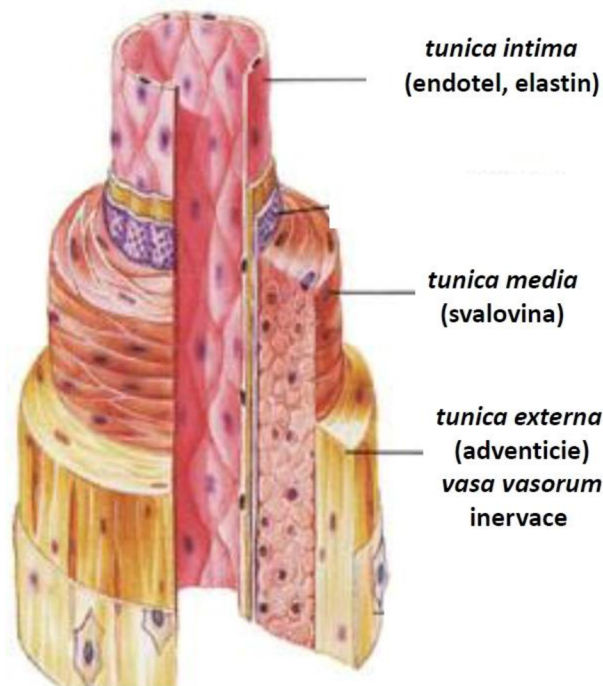
Část hrudníková se nazývá *aorta thoracica*. Tento hrudníkový úsek [2] se nejdříve táhne při levém boku hrudních obratlů, až se následně dostává před ně [7]. Druhá část s pokračováním v břišní dutině má název *aorta abdominalis*. Ta se line až před čtvrtý hrudní obratel, kde se následně dále větví.



Obrázek 3: Dělení a průběh aorty (převzato a upraveno z [7])

2.6 Stavba tepny

Stěna artérií se dělí na tři vrstvy: *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventicia*, jak lze vidět v řezu na obrázku 4 [6]. Vnitřní vrstva (*tunica intima*) se skládá z vrstvy endotelových buněk a od střední vrstvy (*media*) je oddělena elastickou membránou, která je tvořena vlákny z tzv. elastinu. *Tunica media* – stavební kostra – je tvořena buňkami hladké svaloviny, které jsou vmezeřeny mezi elastickými membránami a jsou omotány kolagenními vlákny. Na hranici střední a vnější vrstvy (*tunica adventicia*) se nachází membrána složená z elastických vláken a spirálových snopců kolagenních vláken [6]. Vnější vrstva se skládá převážně z vláken elastických, které jsou uspořádány podélně. V této vrstvě se navíc nacházejí *vasa vasorum* tzv. cévy cév, které slouží k transportu živin do tepenné stěny.

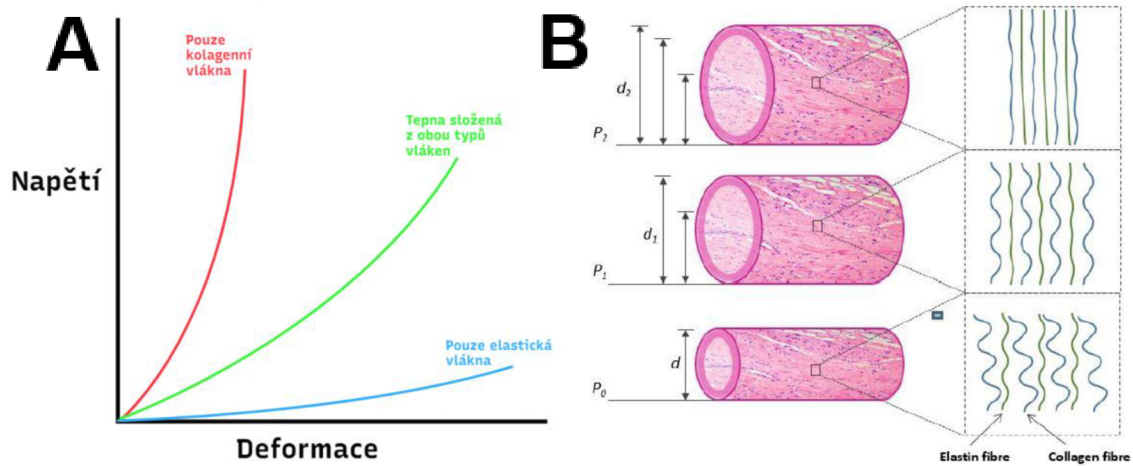


Obrázek 4: Stavba stěny tepny (převzato a upraveno z [8])

2.7 Mechanické vlastnosti tepen

Obecné mechanické vlastnosti měkkých tkání [6]:

1. Vykazují závislost na historii namáhání.
2. Při konstantní deformaci se u nich projevuje relaxace napětí; při cyklickém namáhání vykazují hysterezi, která však po určitém množství cyklů zmizí.
3. Závislost napětí-deformace neodpovídá Hookovu zákonu.
4. Během experimentů je náročné určit počáteční stav (v organismu jsou cévy předejaty v radiálním směru přibližně o 70 % a v podélném směru asi o 50 %, tedy jejich přirozená délka je jednou z nejméně přesných hodnot experimentálních měření).
5. Mechanické vlastnosti jsou závislé na teplotě.
6. V první fázi deformace se zapojují pouze vlákna elastinu, zatímco při velkých deformacích se projevuje vliv vláken kolagenních [9]. Při běžném fyziologickém fungování tepny se projevují oba typy vláken. Deformačně-napětíovou odezvu obou typů vláken a celé tepny lze vidět na obrázku 5.

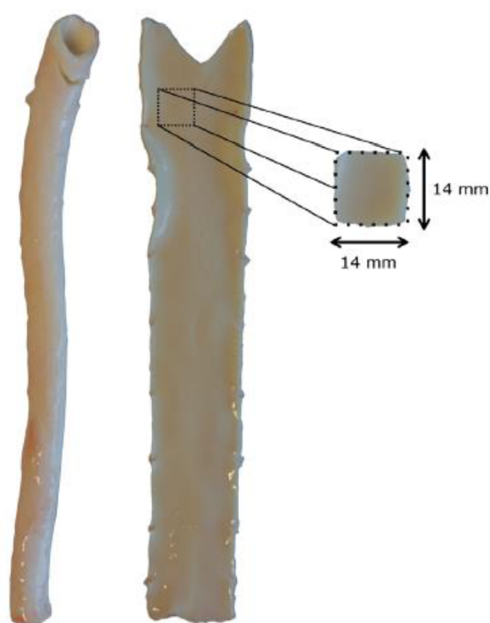


Obrázek 5: A – Ilustrační deformačně-napěťová odezva tepny a jejich vláken (převzato a upraveno z [10]); B – Vliv elastických a kolagenních vláken na nelineární chování tepenné stěny (převzato z [11])

3 Vlivy zmrazení na arteriální tkáň – rešerše

3.1 Vliv dlouhodobého zmrazení prasečí aortální tkáně na její mechanické vlastnosti

Metodika, příprava a měření: Aorty byly získány z pěti prasat asi 6 měsíců starých, vyříznuty byly do 20 minut po utracení a poté vloženy do fyziologického roztoku [12]. Tepny byly poté očištěny, podélně rozříznuty a následně byly z tkáně vyříznuty vzorky o velikosti 14 x 14 mm, jak lze vidět na obrázku 6. Každý vzorek byl vyříznut tak, aby jedna jeho strana byla rovnoběžná s axiálním směrem aorty a druhá strana s obvodovým směrem. Rovněž bylo také zaznamenáno, z jaké části aorty byl vzorek získán. Celkem bylo takto získáno 89 vzorků. Před samotným měřením byl na vzorky nakreslen tečkový patern pro následné vyhodnocení.



Obrázek 6: Vypreparovaný vzorek z tkáně (převzato a upraveno z [12])

U každého vzorku byla měřena, s použitím mikrometru, jeho tloušťka na pěti místech a hmotnost před zmrazením [12]. Následně byly všechny vzorky mechanicky testovány dvojosou tahovou zkouškou. Celé měření bylo limitováno na fyziologické napětí v rozsahu 75-92,5 kPa, aby nedošlo k trvalému poškození tkáně. Testovací zařízení se skládalo ze čtyř hlav s pěti dlouhými háčky sloužícími k uchycení vzorku. Každý vzorek byl vždy uchycen tak, aby byl napnut v axiálním i obvodovém směru. Během testování byly vzorky ponořeny ve fyziologickém roztoku o teplotě 37 °C. Nejprve byly vzorky předcyklovány po dobu deseti cyklů. Data z posledního cyklu byla použita v následné analýze. Vše zaznamenávala kamera a následovalo vyhodnocení pomocí softwaru, který snímal tečkový patern dříve nakreslený na vzorky.

Po měření byly vzorky umístěny do kádinek s fyziologickým roztokem a zamrazeny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [12]. Aby došlo k omezení nepřesností vyvolaných místem odběru vzorku na aortě, byly všechny vzorky získané ze stejné aorty vždy zamrazeny po stejnou dobu, tj. 1 den, 1 týden, 1 měsíc, 6 měsíců a 12 měsíců. Po uplynutí zadané doby a pomalém rozmrazení proběhlo znovu měření tloušťky, hmotnosti a mechanických vlastností stejným způsobem, jako při prvním měření.

Analýza dat: K určení Cauchyho napětí byla uvažována nestlačitelnost tkáně. Cauchyho napětí je určeno dle rovnic (1) a (2):

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{F_{\theta}\lambda_{\theta}}{TX_{\theta}} \text{ a } \sigma_{LL} = \frac{F_L\lambda_L}{TX_{\theta}} \quad (1), (2)$$

kde F je měřená síla, λ je protažení, X je počáteční délka, T je průměrná počáteční tloušťka vzorku a indexy θ a L znamenají axiální a obvodový směr. Protažení bylo měřeno v centrální oblasti pomocí výpočtu:

$$\lambda_{\theta} = \chi_{\theta}/X_{\theta} \text{ a } \lambda_L = \chi_L/X_L \quad (3), (4)$$

kde χ značí konečnou délku v každém směru.

Modul pružnosti tkáně byl vypočítán ze sklonu křivky Cauchyho napětí v počáteční a koncové oblasti. Následné vztahy mezi procentuální změnou v tloušťce, hmotnosti a mechanických vlastnostech byly, s přihlédnutím na vzdálenost umístění vzorku od srdce, určeny pomocí statistické analýzy s použitím Pearsonova korelačního koeficientu.

Výsledek: Porovnáním měření tloušťky před a po zmrazení bylo zjištěno, že průměrná změna se nacházela v rozmezí $6,9 \pm 9,5\%$. Průměrná tloušťka po zmrazení vzrostla, i když tento fakt nebyl vždy statisticky významný [12]. Zároveň, s přihlédnutím k chybám spojeným s měřením tloušťky, nešlo s určitostí prohlásit, že tato změna byla čistě dílem zmrazení.

Všeobecně výsledky indikovaly, že není významný rozdíl mezi počátečním (LSM) a koncovým (HSM) modulem pružnosti před a po zmrazení při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, nehledě na dobu uložení v mrazáku. Jedinou výjimkou byly LSM a HSM v axiálním směru po 6 měsících, které vykazovaly nárůst alespoň $6,2\%$ a $21,3\%$ v tomto pořadí. Při uvážení, že žádné významné změny nebyly zaznamenány v dalších časových úsecích, je nepravděpodobné, že tuto změnu způsobilo samotný efekt nebo doba zmrazení.

3.2 Mechanika čerstvé, zchlazené a zmrazené arteriální tkáně

Metodika, příprava a měření: Aorty byly získány z 23 dospělých prasat [13]. Následně byly rozříznuty podél osy tepny, aby z nich bylo možné vytvořit vzorky tvaru „I“, v podélném směru. Celkem bylo vytvořeno 131 vzorků o velikosti 4 cm ze tří oblastí cévy (proximální, střední a distální). Vzorky byly umístěny do laktátovaného Ringerova roztoku. Náhodně bylo vytvořeno 5 skupin podle doby skladování a teploty – čerstvé, ochlazené po dobu 1 dne, ochlazené po dobu 2 dnů, zmrazené při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zmrazené při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zchlazené vzorky byly uchovány při teplotě +4 °C a testovány 1 hodinu po vyjmutí z chladného prostředí. Čerstvé vzorky byly testovány v den celkové přípravy experimentu. Skupiny zmrazených vzorků byly testovány 3 měsíce po uložení do mrazáku hodinu potom, co byly rozmrazeny ve vodní lázni ohřáté na teplotou 37 °C.

Spodní konec každého vzorku byl připevněn k rámu testovacího zařízení a vrchní byl připojen na píst elektrohydraulického měřicího přístroje [13]. Pomocí posuvného měřidla byly zjištěny geometrické vlastnosti vzorku – šířka, délka mezi uchycenými konci a tloušťka stěny. Následně byly vzorky kvazistaticky natahovány v podélném směru při rychlosti zatížení 1 mm/s. Tento proces pokračoval až do úplného přetržení stěny cévy. Měření probíhala při pokojové teplotě a všechny vzorky byly zároveň pravidelně vlhčeny pomocí laktátového Ringerova roztoku. Pomocí siloměru byla měřena zatížení v podélném směru a pomocí diferenciálního převodníku bylo určeno posunutí horního uchycení vzorku. Celý proces zatížení byl nasnímán při rychlostí 125 snímků za sekundu ze strany *intimy* a *adventicie*.

Analýza dat: Konečný bod přetržení byl na křivce napětí-deformace definován v místě, kde měl nárůst deformace za následek snížení napětí [13]. Youngův modul pružnosti byl vypočítán jako sklon lineárně elastické oblasti na křivce napětí-deformace. K určení statisticky významných rozdílů ($p < 0,05$) Youngova modulu pružnosti, napětí a deformace v okamžiku přetržení byla použita analýza rozptylu (ANOVA).

Výsledky: Na celkem 82 % vzorků byly zaznamenány dílčí trhliny vnitřní vrstvy před úplným přetržením [13]. Vrstva *adventicie* zůstala během zatížení nedotčena až do úplného přetržení. Díky analýze dat bylo zjištěno, že napětí změřené při vzniku počátečních mikrotrhin bylo závislé na skladovací technice, zatímco deformace nikoliv. Skladovací technika také významně ovlivnila maximální napětí při přetržení. Čistě zchlazené vzorky měly toto napětí nižší než čerstvé a zmrazené.

U zmrazených vzorků nebyla zaznamenána výrazná změna modulu pružnosti vzhledem k čerstvým vzorkům, zatímco u zchlazených vzorků došlo k významnému snížení Youngova modulu pružnosti v porovnání s čerstvými a zmrazenými vzorky.

3.3 Charakterizace změn mechanických vlastností tepen vlivem uchování v chladu za použití nanoindentačních testů

Metodika, příprava a měření: Bylo shromážděno 14 prasečích aort, které byly ihned po extrakci vloženy do fyziologického roztoku [14]. Po očištění byly tkáně rozřezány v příčném směru na válcové vzorky o délce 8–10 mm. Do vzorků byl navíc ještě vložen válec polyethylenové pěny, aby došlo k zamezení nadměrného přehýbání tkáně. Takto bylo celkem vytvořeno 74 vzorků, jež byly rozděleny do tří skupin podle doby uskladnění: umístěny do chladničky při +4 °C; zmrazeny při -20 °C a zmrazeny při -80 °C. Čas uložení v chladničce byl 24 a 48 hodin a čas uchování v mrazáku 48 hodin, 1 týden a 3 týdny. Pro

každou z uskladněných skupin byly vytvořeny sousední vzorky a otestovány začerstva jako kontrola. Aby došlo k omezení chyby kvůli umístění vzorků po délce aorty, nebyla osová vzdálenost mezi zmrazeným a příslušným kontrolním vzorkem větší než 10 mm.

Měření bylo provedeno na speciálním zařízení pro nanoindentační testování s kónickým indentorem [14]. Celé zařízení bylo namontováno na stůl zabraňující vibracím.

Aby se předešlo dehydrataci tkáně, byly vzorky vloženy do nádoby, kde byly ponořeny ve fyziologickém roztoku. Celé měření bylo prováděno v podélném směru v různých bodech podél tloušťky stěny vzorku. Celkem bylo takto zaznamenáno 611 bodů vtisku. Veškeré experimenty byly prováděny při pokojové teplotě.

Byly zavedeny předpoklady, že mechanické vlastnosti tepny jsou lokálně homogenní, izotropní a viskoelastické [14]. Rovněž byla provedena kalibrace testu a kontrola možnosti opakovatelnosti.

Výsledky: Výsledky ukázaly, že okamžitý Youngův modul pružnosti (E) se u zchlazených vzorků snížil [14]. Po uplynutí 48 hodin začala být tato změna významná – až 10 a 13 %.

U zmrazených vzorků bylo zjištěno, že E se obecně zvýšil [14]. Tyto změny byly velice malé a nebyl mezi nimi pozorován žádný významný rozdíl pro obě teploty zmrazení. Nicméně pro delší dobu uložení byly změny E při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ větší než při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Samostatné srovnání vrstev *medie* a *adventicie* objevilo významné změny v Youngově modulu pružnosti [14]. Porovnání hodnot E mezi zmrazenými a čerstvými vzorky ukázalo, že změny v *medii* byly významnější než v *adventicii*. Porovnáním hodnot získaných z čerstvých vzorků a vzorků uložených při teplotách $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se ukázalo, že hodnota okamžitého modulu pružnosti se statisticky významně liší.

3.4 Změny mechanických a biomechanických vlastností aortální tkáně v důsledku skladování v chladném prostředí

Metodika, příprava a měření: Testovaná tkáň v případě této studie byla získána z hovězí sestupné hrudní aorty [15]. Oblasti aorty s tloušťkou přibližně 1,5 mm byly rozřezány na čtverečky o straně 2 cm. U všech vzorků byla jedna jejich hrana rovnoběžná s obvodovým směrem a druhá s axiálním směrem tepny. Z 9 tepen bylo vytvořeno celkem 36 vzorků. Následovalo měření dvouosou tahovou zkouškou všech vzorků za čerstvého stavu (do 4 hodin od odebrání). Po ukončení měření byly vzorky ponořeny do Ringerova roztoku a uloženy do prostředí o různých teplotách: $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tkáň byla uložena po dobu 48 hodin, 1 týdne nebo 3 týdnů. Po uplynutí této skladovací doby následovalo retestování pro porovnání s naměřenými hodnotami u čerstvých aort. Vzorek byl po stranách uchycen pomocí háčků k lineárním polohovadlům. Při měření každého vzorku probíhalo vždy předcyklování 8 cyklů, přičemž data pro vyhodnocení byla brána z posledního cyklu. Celý proces zachycuje kamera, která sleduje změnu rozvržení 4 teček dřívě nanesených na vzorek.

Analýza dat: Pro analýzu dat byly zavedeny následující předpoklady: uvažuje se rovinná napjatost a předpokládá se nestlačitelnost tepen [15]. Díky těmto zjednodušením lze Cauchyho napětí určit pomocí rovnic (5) a (6),

$$\sigma_1 = F_1 \lambda_1 / L_{20} t \text{ a } \sigma_2 = F_2 \lambda_2 / L_{10} t \quad (5), (6)$$

přičemž σ značí Cauchyho napětí, F je působící síla, t je počáteční tloušťka, L_0 je počáteční délka a λ je protažení. Použité indexy 1 a 2 označují axiální a obvodový směr. Rozdíly mezi čerstvými a zmrazenými vzorky byly posuzovány pomocí párového t-testu, přičemž porovnávaná veličina byl počáteční a koncový modul pružnosti.

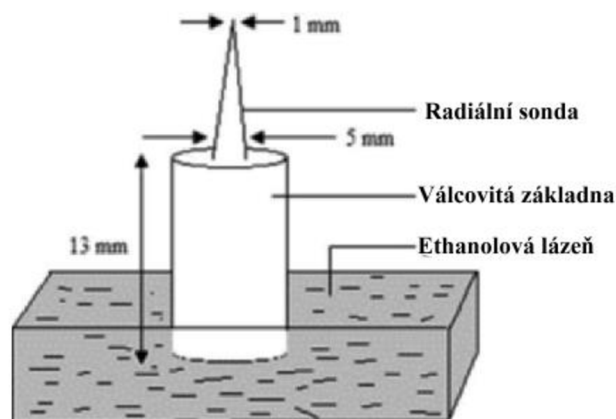
Výsledky: Výsledky potvrdily anizotropní chování tkáně v tom smyslu, že je v obvodovém směru tužší než v axiálním [15]. Pro porovnávání měření byl zaveden předpoklad linearit křivky napětí a deformace v počáteční oblasti, ze které byl vyhodnocen počáteční modul pružnosti. Obdobný předpoklad byl zaveden i v oblasti mezi 70-80 kPa, odkud byl vyhodnocen koncový modul pružnosti.

Vzorky uložené při teplotě +4 °C vykazovaly pokles počátečního modulu pružnosti a nárůst koncového modulu pružnosti ve srovnání s čerstvým stavem [15]. Pro teploty uskladnění –20 °C a –80 °C nebyla zjištěna žádná změna pro počáteční modul pružnosti, avšak zmrazení vedlo k nárůstu koncového modulu pružnosti. Celkově lze říct, že oba druhy uskladnění měly určitý vliv na mechanické vlastnosti z důvodu mikrostrukturálních a biomechanických změn v tkáni.

3.5 Vliv zmrazení a kryoprezervace na mechanické vlastnosti tepen

Metodika, příprava a měření: Z prasat starých 3-4 měsíce byly zhruba hodinu po smrti vyříznuty stehenní tepny [16]. V laboratoři byly poté zbaveny tukové tkáně, omyty fyziologickým roztokem a rozřezány na kroužky široké 3 mm.

Byly zvoleny 2 procedury, podle kterých bylo provedeno samotné zmrazení [16]. Vzorky byly vloženy do regulovatelného mrazáku, kde zůstaly po dobu 5 minut při teplotě –20 °C. V druhé proceduře byla použita zúžená hliníková sonda, jejíž válcová část byla vložena do ethanolové lázně, viz obrázek 7. Díky udržování lázně při teplotě –20 °C byla v zúžené části sondy vytvořena stejná teplota. Některé ze vzorků byly zmrazeny v zatíženém stavu s radiálním předpětím. V obou případech byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě a následně umístěny do fyziologického roztoku. Hmotnost se měřila vždy před zmrazením a po následném roztátí, aby došlo k posouzení změny nahromaděné vody ve vzorku.



Obrázek 7: Druhá procedura zmrazení (převzato a upraveno z [16])

Bylo také zjišťováno, jaký vliv na mechanické vlastnosti má kryoprezervace [16]. Zmrazení probíhalo ve stejném typu mrazáku jako v předchozí proceduře s tím rozdílem, že vzorky byly mrazeny rychlostí 1 °C/min až do -80 °C, kde proběhlo 4minutové podržení. Po uplynutí 4 minut byly vzorky rozmrazeny ve vodní lázni s teplotou 37 °C.

Rozměry vzorků byly změřeny ihned po rozmrazení [16]. Tloušťka stěny byla zjištěna pomocí fotografií vzorku a následného převedení pixelů na mm. Nafukováním kruhového vzorku v obvodovém směru byla provedena jednoosá zkouška. Vzorky byly předcyklovány do přetvoření 20 %, až dokud křivka napětí-deformace nevykazovala zásadní změnu. Kroužky byly poté roztahovány rychlostí 2 mm/min až do dosažení limitu siloměru. Skutečné (Cauchy) napětí σ a skutečné (Cauchy) přetvoření γ se následně vypočetlo podle vztahů (7) a (8):

$$\sigma = \frac{F(t)}{A_0 \frac{L_0}{L(t)}} \quad (7)$$

$$\gamma = \ln \left(\frac{L(t)}{L_0} \right) \quad (8)$$

kde F je zatížení v čase t , A_0 je počáteční plocha průřezu kroužku, L_0 je počáteční posun a L je posun v čase t . Moduly jsou určeny jako sklon lineární oblasti na křivce skutečného napětí – skutečné přetvoření.

Výsledky: Byl zjištěn nárůst délky vzorků vlivem zmrazení [16]. Čerstvé vzorky vykazovaly větší hysteretní chování při porovnání se vzorky zmrazenými. Byly zjištěny značné rozdíly v oblasti malých přetvoření křivky napětí-deformace mezi zmrazenými a čerstvými vzorky. Lineární oblast samotné křivky začínala u čerstvých vzorků až při vyšších deformacích než u vzorků zmrazených. Zmrazené vzorky se začaly svým chováním blížit čerstvým až po rozehrání a 24hodinové kultivaci při 37 °C. U zmrazených vzorků byl zaznamenán pokles modulu pružnosti v lineární oblasti křivky, zatímco při fyziologickém zatížení (tedy nižších přetvořeních) byl průměrný modul pružnosti vyšší při porovnání s čerstvými vzorky.

Vzorky po kryoprezervaci zaznamenaly podobné chování. Vzorky zmrazené s kryoprezervačními činidly vykazovaly chování nejbližší čerstvým vzorkům.

4 Vliv zmrazení na mechanické chování arteriální tkáně – biaxiální tahové zkoušky

4.1 Příprava vzorků

Aorty byly získány z prasat na jatkách Steinhauser ve Skalici nad Svitavou do 1 hodiny po usmrcení. Ihned po vyjmutí byly aorty uloženy do fyziologického roztoku, převezeny do laboratoře a následně testovány.

Pro testování bylo vybráno 6 dost velkých aort tak, aby vystačily na celkem 56 vzorků. Poté byly tepny očištěny od přebytečné tkáně a horní tukové vrstvy cévní stěny. Takto předpřipravené aorty byly rozříznuty v podélném směru. Řez byl veden přes dílčí malé tepny, které z aorty vycházejí, aby bylo zajištěno, že ve vzorku nevzniknou díry, což by znatelně ovlivnilo následné měření. Poté byly pomocí vysekávacího nože vyřezány z tkáně čtverečky velikosti 18x18 mm. Tato velikost je volena z důvodu, aby bylo možné vypreparovat z aorty dostatečný počet vzorků a aby při tom byla použita celá délka aorty. Vysekávací nůž lze vidět na obrázku 8. Při vyřezávání bylo třeba dodržet, aby byla vždy jedna strana vzorku rovnoběžná s podélným směrem aorty a druhá strana pak rovnoběžná se směrem obvodovým. Vzorky byly rozmístěny po celé délce aorty z důvodu různorodosti tloušťky a mechanických vlastností, které se mění v závislosti na vzdálenosti od srdce. Ukázkou dodržení těchto předpokladů při přípravě lze vidět na obrázku 9. Celkem bylo získáno 56 vzorků, ze dvou aort po 10 vzorcích a ze zbylých čtyř aort po 9 vzorcích.



Obrázek 8: Vysekávací nůž na vzorky



Obrázek 9: Rozmístění vzorků po délce aorty

Všechny vzorky byly umístěny do fyziologického roztoku, aby nedocházelo k osychání tkáně. Poté byly vzorky označeny v pravém dolním rohu velkou tečkou pro rozeznání obvodového a axiálního směru a číslem, kdy první číslice označuje číslo aorty a druhá číslice místo odběru. Pro účely měření a vyhodnocení byly na čtverečky nakresleny značky pro uchycení svorek a 4 tečky v střední části vzorku pro vyhodnocení deformace, jak lze vidět na obrázku 10.



Obrázek 10: Vzorek připravený na testování

Po nachystání byly všechny čerstvé vzorky podrobeny biaxiální zkoušce. Po ní následovalo měření tloušťky na pěti místech – na každé z teček a uprostřed nich, pro další hodnocení byla uvažována průměrná hodnota z těchto 5 měření. Čerstvé vzorky byly následně umístěny do 4 kádinek podle doby uložení v mrazáku – 1 den, 7 dnů, 30 dnů a 90 dnů. Vzorky byly do těchto skupin rozděleny tak, aby se zamezilo diverzitě vlivem místa odběru, přičemž z každé části aorty (proximální, střední a distální) byly alespoň 2 vzorky zmrazeny na daný časový úsek. Plán rozdělení je zobrazen na obrázku 11. Zmrazení bylo provedeno při běžné konzervační teplotě mrazáků, tedy $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vzorky byly uloženy ve fyziologickém roztoku. Po uplynutí předurčené doby byly vzorky rozmrazeny ve vodní lázni ohřáté na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tímto principem byla provedena 2 měření, každé pro vlastní trojici aort, kvůli časové náročnosti

měření. Zároveň kvůli časovým možnostem nebyla provedena měření pro vzorky zmrazené po dobu 90 dnů. Celkem tedy bylo otestováno 42 vzorků ze 6 aort.

1	11	30	21	90	31	Proximální část (blíže srdci)
7	12	90	22	7	32	
30	13	1	23	30	33	
90	14	7	24	90	34	Střední část
7	15	30	25	1	35	
1	16	90	26	30	36	
7	17	1	27	7	37	Distální část (dál od srdce)
30	18	7	28	90	38	
90	19	30	29	1	39	
1	20					

Po 24 hod: 11, 16, 20, 23, 27, 35, 39

Po 7 dnech: 12, 15, 17, 24, 28, 32, 37

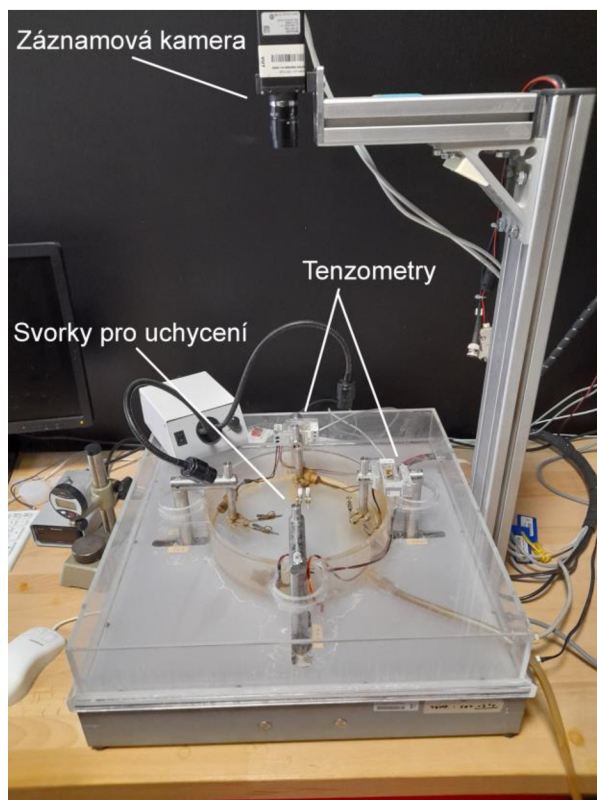
Po 30 dnech: 13, 18, 21, 25, 29, 33, 36

Po 90 dnech: 14, 19, 22, 26, 31, 34, 38

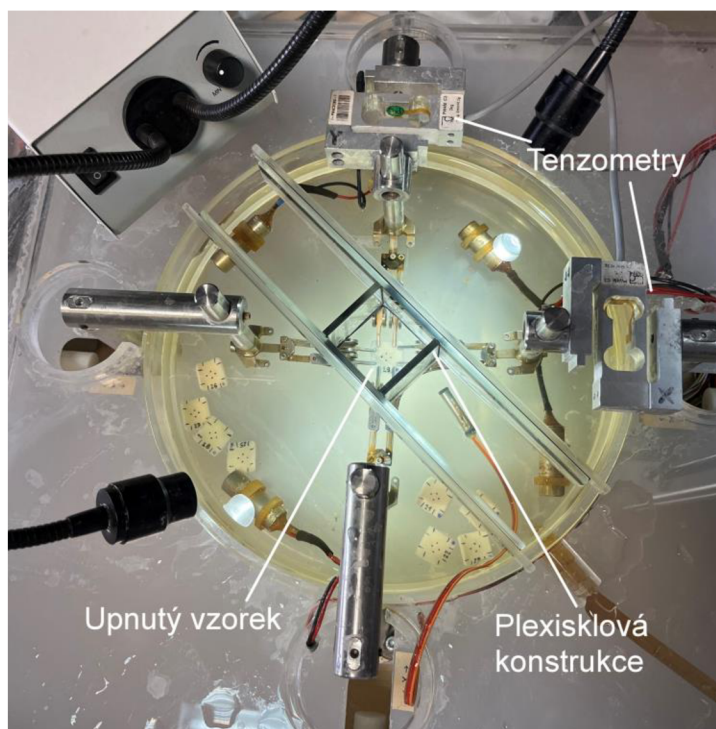
Obrázek 11: Plán rozdělení vzorků

4.2 Měření – biaxiální tahová zkouška

Celá zkouška se realizovala na experimentálním zařízení zobrazeném na obrázku 12.1.



Obrázek 12.1: Experimentální zařízení pro biaxiální tahovou zkoušku



Obrázek 12.2: Upnutí vzorku v měřícím zařízení

Připravené vzorky byly uchyceny na svých vyznačených místech do 8 svorek. Vzorky byly vždy upnuty tak, aby tečka označující axiální a obvodový směr byla v pravém dolním rohu. Během celého testu byl vzorek ponořen ve fyziologickém roztoku, který byl topnými tělesy udržován na teplotě 37 °C, aby došlo k simulaci fyziologických podmínek. Pro eliminaci odlesků z hladiny byla nad testovací oblast položena malá konstrukce z plexiskla. Popsané upnutí je ukázáno na obrázku 12.2.

Před začátkem měření bylo na vzorku nastaveno předpětí 0,05 N, aby došlo k počátečnímu napnutí tkáně. Poté byl vzorek předcyklován pěti cykly, po nichž následovalo samotné měření, kdy byl vzorek natahován rychlostí 0,333 mm/s až do 20 % délky v každém směru. Z kamerového záznamu bylo získáno pro každý vzorek zhruba 140 snímků, které zobrazovaly postupné natahování vzorku a změnu polohy teček. Síla byla měřena pomocí 2 tenzometrů.

4.3 Vyhodnocení tahových zkoušek

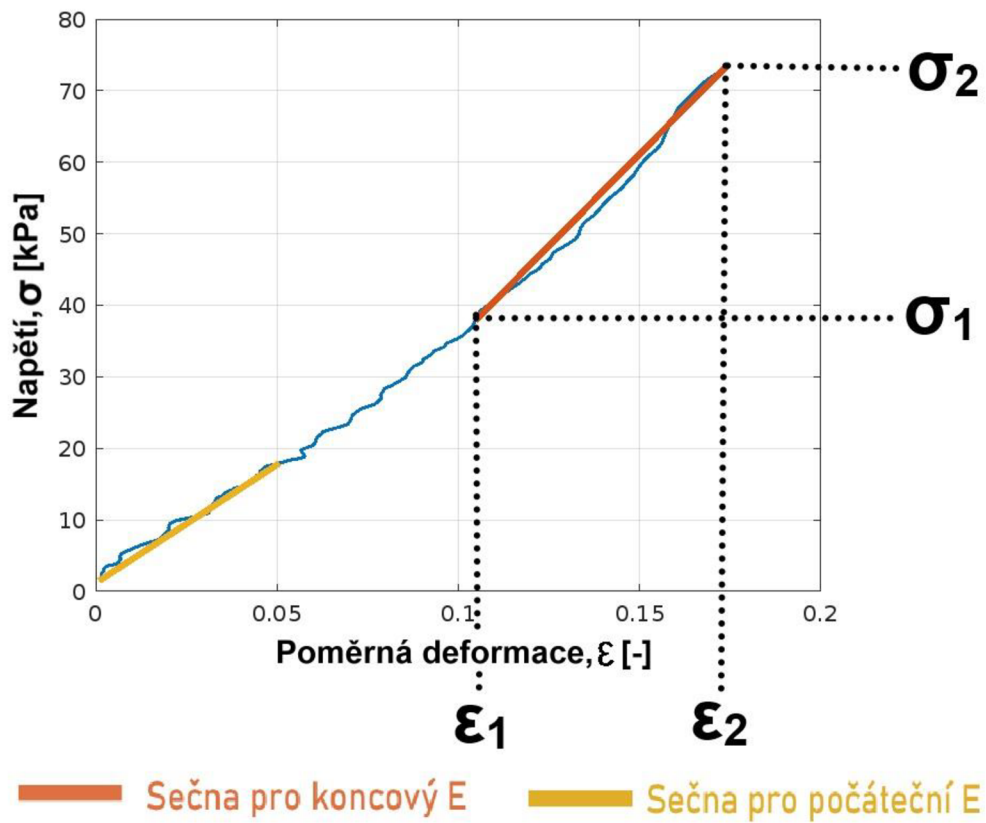
Na vyhodnocení tahových křivek byl použit program Tibixus [17]. Deformace byla vyhodnocena pomocí trasování polohy 4 teček pomocí digitální korelace obrazu. Smluvní napětí bylo vypočítáno podle vztahu (9) a smluvní přetvoření podle vztahu (10).

$$\sigma = \frac{T_z}{L_0 * T_0} \quad (9)$$

$$\varepsilon = L_d - 1 \quad (10)$$

přičemž T_z označuje aktuální sílu, L_0 původní délku strany vzorku, T_0 průměrnou tloušťku a L_d protažení. Z každého měření byly získány 2 nelineární deformačně-napětíové křivky zvlášť pro obvodový a axiální směr. Modul pružnosti se vždy vyhodnocoval v počáteční a koncové části křivky, kde proběhlo největší zpevnění. U nelineárních křivek lze použít vyhodnocení pomocí sečny, nebo tečny. Pro účely této práce bylo zvoleno vyhodnocení pomocí sečny, kdy E je zároveň její sklon neboli směrnice, kterou lze získat dosazením do vztahu (11). Příklad grafu pro jedno měření se sečnami pro počáteční a koncový úsek je zobrazen na obrázku 13.

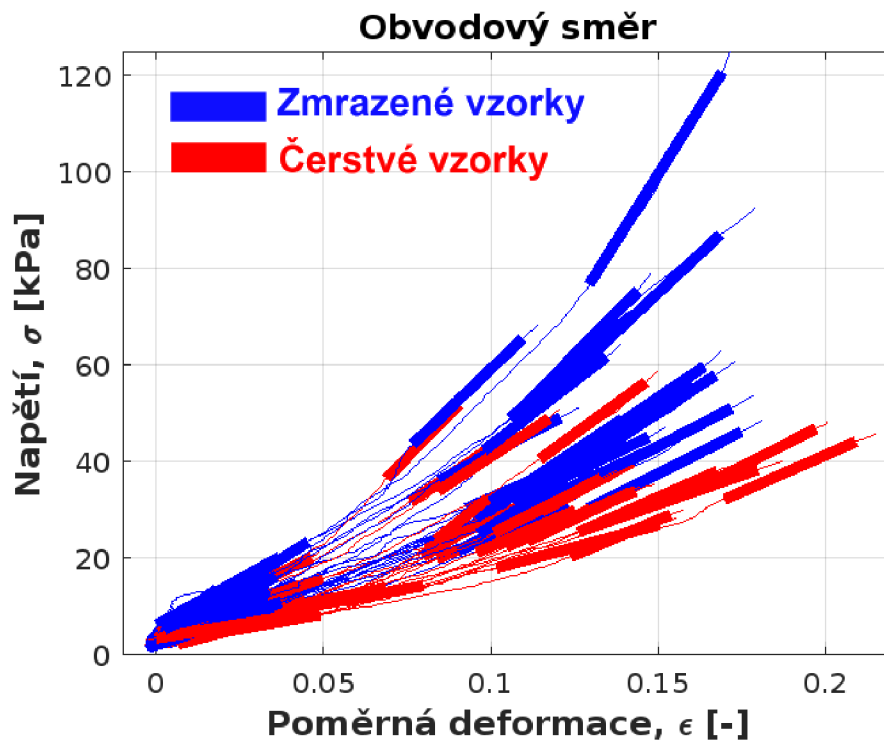
$$E = \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1} \quad (11)$$



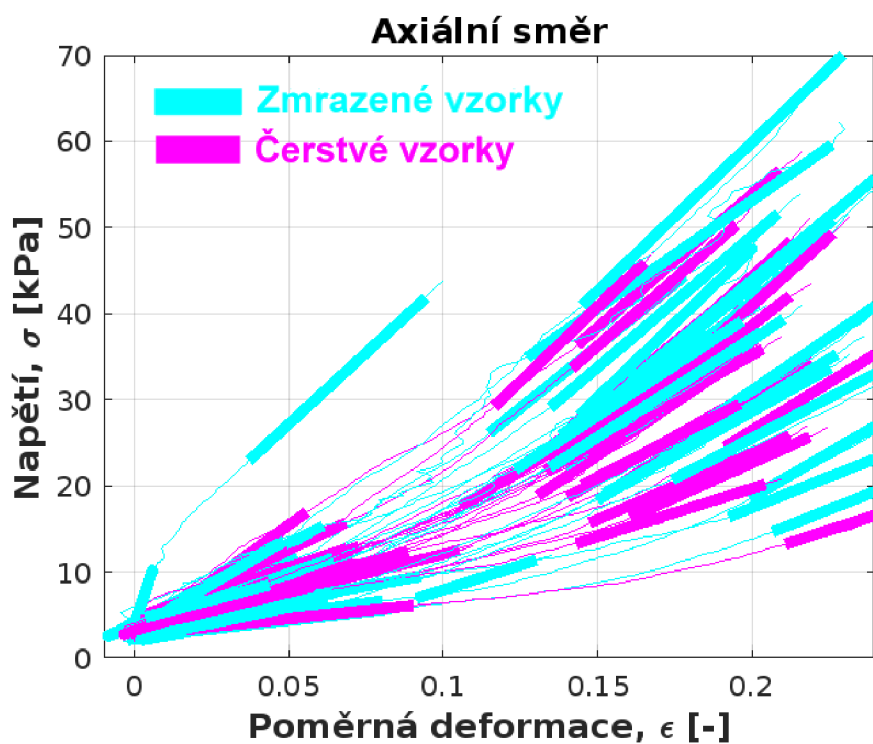
Obrázek 13: Ilustrační graf napětí-deformace se sečnami pro jeden vzorek

5 Výsledky

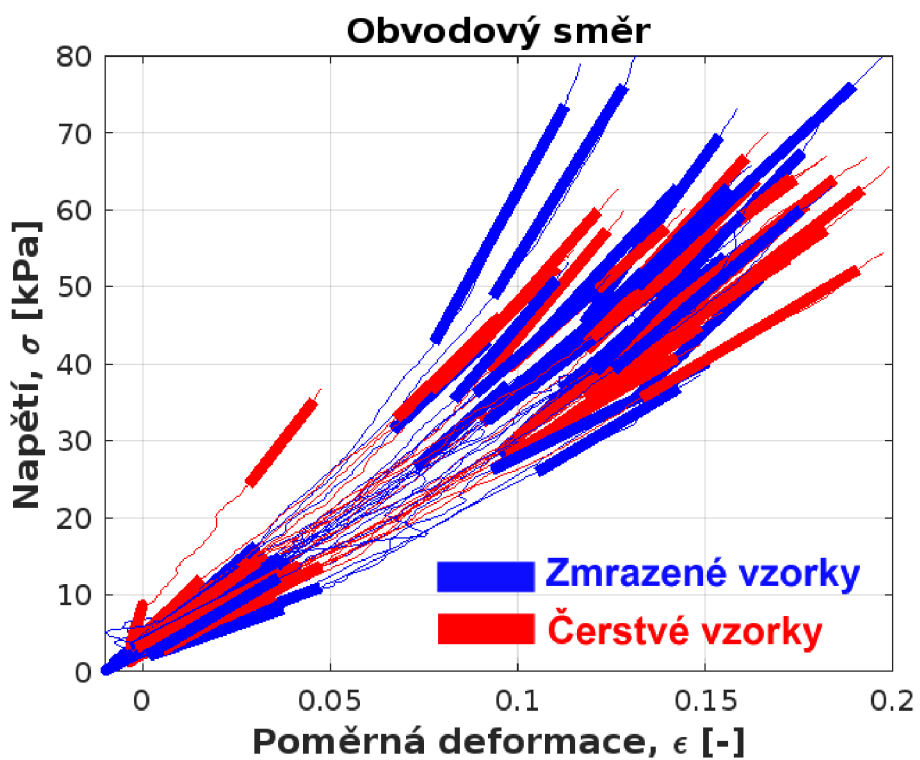
Zpracování dat probíhalo pomocí programu MATLAB [18]. Na obrázcích 14.1, 14.2, 14.3 a 14.4 lze vidět křivky napětí-deformace pro všechny vzorky (celkem 42 vzorků) spolu s příslušnými počátečními a koncovými moduly pružnosti. Z důvodu lepší přehlednosti jsou grafy rozděleny podle 2 celkových setů měření. Z grafů je patrné nelineární chování aort a typický nárůst modulu pružnosti se zvětšující se deformací.



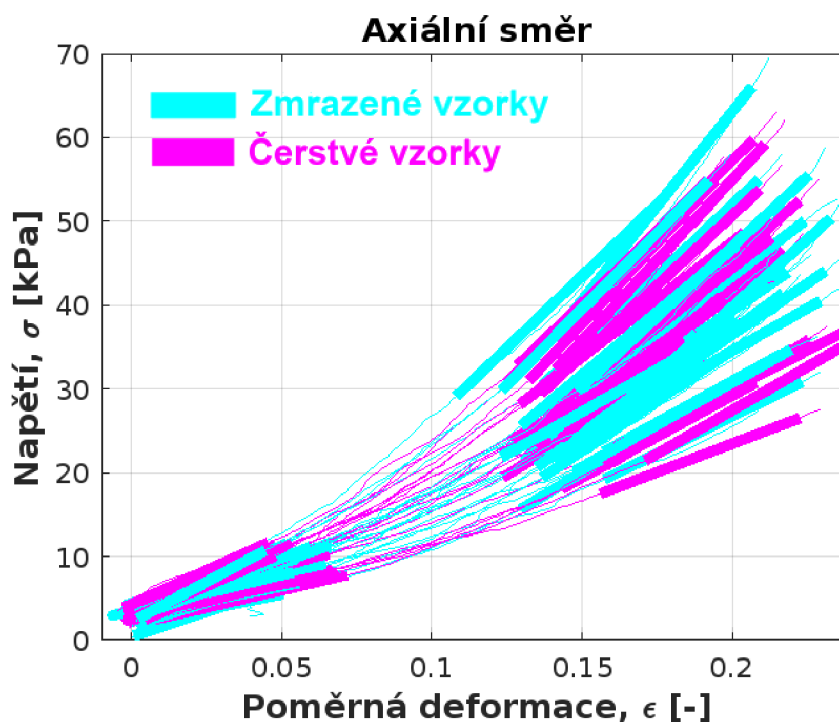
Obrázek 14.1: Vykreslení modulů pružnosti pro 1.set aort – obvodový směr (3 aorty – 21 vzorků)



Obrázek 14.2: Vykreslení modulů pružnosti pro 1.set aort – axiální směr (3 aorty – 21 vzorků)



Obrázek 14.3: Vykreslení modulů pružnosti pro 2.set aort – obvodový směr (3 aorty – 21 vzorků)



Obrázek 14.4: Vykreslení modulů pružnosti pro 2.set aort – axiální směr (3 aorty – 21 vzorků)

Pro analýzu byly vždy brány moduly pružnosti z počáteční a koncové části deformačně-napěťové křivky jak pro axiální, tak pro obvodový směr. Celkem takto vznikly 4 skupiny modulů pružnosti: E_{pa} počáteční axiální – E_{ka} koncový axiální – E_{po} počáteční obvodový – E_{ko} koncový obvodový. Vždy docházelo k porovnání konkrétního modulu pružnosti stejného vzorku před a po zmrazení. Statistická analýza byla provedena pro celou skupinu daného modulu pružnosti. Jako předpoklad byla vzata nulová hypotéza, že se průměrné hodnoty E před a po zmrazení nezměnily. Celkem tedy vyšly 4 p-hodnoty z jednoho testu. Všechny testy byly prováděny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ s tím, že pokud vyšly hodnoty $p < \alpha$, tak se nulová hypotéza zamítá a změna E po zmrazení může být statisticky významná.

Díky již importovaným statistickým funkcím v programu Matlab bylo možné použít více testů. Nejprve byl proveden Anderson-Darling (AD) test pro ověření, zda mají data normální rozdělení. Následně byl proveden párový T-test (TT), který pracuje s normálním rozdělením a poté neparametrický Wilcoxonův test (WT), který ověřuje rovnost mediánů a zároveň uvažuje závislost vzorků.

	AD	TT	WT
E_{pa}	0,0005	0,5606	0,5035
E_{ka}	0,9639	0,2456	0,2424
E_{po}	0,0005	0,1742	0,3023
E_{ko}	0,0395	$0,0007 \cdot 10^{-1}$	$0,0007 \cdot 10^{-1}$

Tabulka 1: Přehled p-hodnot z celého měření

V tabulce 1 lze vidět, že p-hodnoty AD testu pro části E_pa, E_po a E_ko jsou menší než zvolená hladina významnosti. Data tedy nemají normální rozdělení a v tomto případě je vhodnější přihlédnout k výsledkům z WT. Přesto lze vidět, že p-hodnoty TT a WT jsou takřka identické, nehledě na normalitu rozdělení. Testy ukázaly, že změna E je významná pouze pro E_ko. P-hodnota pro E_ko je dokonce o mnoho menší než zvolená α , lze tedy předpokládat, že změna byla značná a mezi čerstvými a zmrazenými vzorky je tedy statisticky významný rozdíl.

Medián E_ko [kPa]	
Čerstvé	Zmrazené
363,339	445,356

Tabulka 2: Mediány E_ko před a po zmrazení

Z hodnot mediánů v tabulce 2 lze vyčíst, že hodnota E v obvodovém směru v koncové části vzrostla. Jedná se o nárůst zhruba 22 %.

5.1 Vliv doby zmrazení

Po vyhodnocení všech vzorků jako jeden celek byla znovu provedena statistická analýza. Tentokrát ale probíhalo vyhodnocení pro rozdílné doby zmrazení zvlášť. Jednalo se o dobu 24 hodin, 7 dnů a 30 dnů, přičemž každá skupina obsahovala 14 vzorků, viz obrázek 11.

24 hodin	AD	TT	WT
E_pa	0,0005	0,4847	0,583
E_ka	0,9571	$0,0003 \cdot 10^{-1}$	0,0002
E_po	0,0005	0,0018	0,0001
E_ko	0,374	$0,0004 \cdot 10^{-2}$	0,0001

Tabulka 3: P-hodnoty vzorků zmrazených na 24 hodin

V tabulce 3 lze vidět, že části E_ka a E_ko mají normální rozdělení a je tedy vhodnější přihlédnout k p-hodnotám TT. Ty ukázaly, že v obou těchto částech je změna E významná. V částech E_pa a E_po je přihlédnuto k WT kvůli nesplnění normality. Zde lze podle p-hodnot usuzovat, že změna je významná pouze v části E_po. Statistika tedy ukázala, že zmrazení po dobu 24 hodin nemá významný vliv pouze na počáteční axiální modul pružnosti.

7 dnů	AD	TT	WT
E_pa	0,285	0,5014	0,5016
E_ka	0,2177	$0,0001 \cdot 10^{-2}$	0,0001
E_po	0,0833	$0,0001 \cdot 10^{-1}$	0,0001
E_ko	0,0124	$0,0004 \cdot 10^{-2}$	0,0001

Tabulka 4: P-hodnoty vzorků zmrazených na 7 dnů

Podle p-hodnot AD v tabulce 3 lze říci, že části E_pa, E_ka a E_po mají normální rozdělení a podle výsledků TT je možné usuzovat, že změna E byla významná pouze v částech E_ka a E_po. Podle WT byla změna významná také v části E_ko. Výsledky jsou tedy analogické s dobou zmrazení na 24 hodin.

30 dnů	AD	TT	WT
E_pa	0,7348	0,7945	0,8552
E_ka	0,0818	$0,0002 \cdot 10^{-4}$	0,0001
E_po	0,4452	$0,0001 \cdot 10^{-2}$	0,0001
E_ko	0,003	$0,0002 \cdot 10^{-2}$	0,0001

Tabulka 5: P-hodnoty vzorků zmrazených na 30 dnů

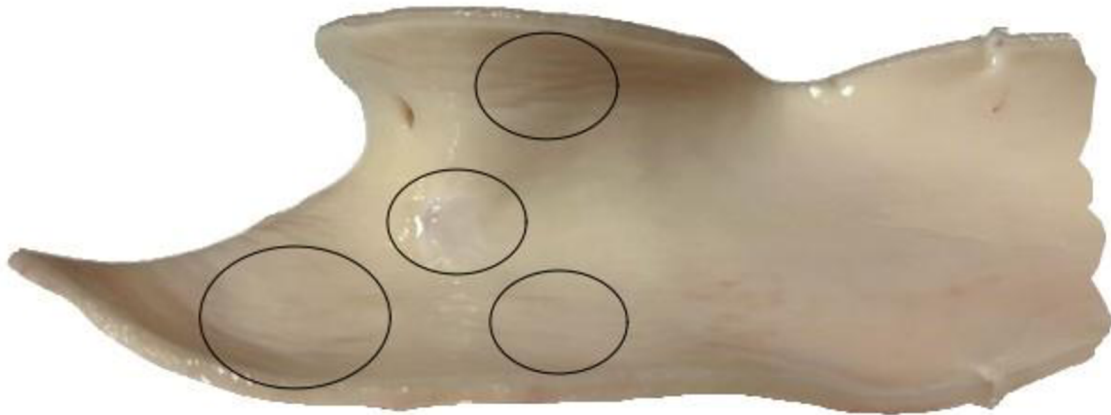
V tabulce 4 lze vidět, že normalita byla opět splněna v částech E_pa, E_ka a E_po. A podle výsledků TT lze říct, že změna E byla významná v částech E_ka a E_po. Změna byla také významná v části E_ko po přihlédnutí k WT. Z analýzy tedy opět vyplývá, že zmrazení významně neovlivňuje pouze počáteční axiální modul pružnosti.

Po porovnání jednotlivých závěrů pro každou tabulku je zřejmé, že všechny jejich hodnoty korelují v částech E_pa a E_ko. Z tohoto lze usuzovat, že v části E_ko se vždy hodnota E významně změní neohledně na dobu zmrazení a zároveň v části E_pa změna nenastane opět neohledně na dobu pobytu v mrazáku. Tabulky 3, 4 a 5 také korelují v částech E_ka a E_po, tedy že v obou těchto částech je změna E rovněž významná neohledně na dobu zmrazení. Tento závěr ale nelze potvrdit, protože nekoreluje s tabulkou 1, ve které jsou zahrnuty všechny vzorky.

Z výsledků tohoto experimentu a ze znalosti stavby tepny s jejím uspořádáním vláken lze usoudit, že proces zmrazení ovlivňuje převážně kolagenní vlákna. Ty jsou totiž v aortě uspořádány v obvodovém směru a zapojují se až při větších deformacích (obrázek 4 - A), přičemž statistická analýza ukázala, že změna E nastala až v koncové části v obvodovém směru (tabulka 1), což značí, že jsou ovlivněna právě kolagenní vlákna. Nutno podotknout, že tato hypotéza nebyla doposud v současné literatuře publikována, avšak bylo by vhodné ji podpořit větším počtem vzorků.

5.2 Limitace výsledků

Vzhledem ke komplikovanosti a délce celého experimentu je zde spousta vlivů, které mohly výsledky ovlivnit. Tkáň aorty je nelineární materiál a má obrovskou variabilitu. Samotná struktura aortální tkáně je také ovlivněna stářím a zdravím prasete. Proto je vhodné brát aorty z většího počtu zdrojů. Na aortách použitých v této práci byly při čištění na několika místech nalezeny zvláštní drobné uzliny vláken (obrázek 15). Tyto deviace v tkáni mohly mít podíl na určitém zkreslení výsledků.



Obrázek 15: Neobvyklé uzliny vláken na aortě

Chyby mohly vzniknout také při upínání vzorků do svorek pro biaxiální zkoušku. Nejlepší by bylo upnout všechny vzorky úplně stejně, což však není při ručním provedení možné i přesto, že na vzorcích jsou nakresleny orientační čáry pro uchycení svorek.

Samotný výpočet E z naměřených křivek je závislý na polohách a délkách vyhodnocovaných sečen, kde by změna těchto parametrů mohla dále výsledek ovlivnit. Pro statistickou analýzu pro různou délku doby zmrazení bylo použito poměrně malé množství hodnot (v každé skupině pouze 14 vzorků). Tento počet vzorků je pro statistickou analýzu poměrně malý, nutno tedy podotknout, že výsledky získané pro rozdílné délky zmrazení mohou být ovlivněny právě malým statistickým souborem.

Bohužel kvůli časovým možnostem nebylo možné provést měření pro vzorky zmrazené na 90 dnů. Zde se však nabízí možnost návaznosti na tuto práci s případnými dalšími měřeními pro ověření výsledků experimentu.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se věnuje vlivu zmrazení prasečí aorty při teplotách běžných mrazáků na její mechanické vlastnosti.

V první části je rozpracována nezbytná lékařská terminologie oběhového systému a stavby tepen pro uvedení čtenáře do problematiky. Následuje stručný přehled současné literatury zabývající se problematikou zmrazování měkkých tkání.

V druhé, praktické části byla provedena dvojosá tahová zkouška prasečích aort v čerstvém a zmrazeném stavu. Nejprve proběhla příprava celého měření s očištěním aort, přípravou vzorků a posléze následovala samotná zkouška všech čerstvých vzorků. Následně byly vzorky umístěny do mrazáku a zmrazeny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté, vždy po uplynutí daného časového úseku, bylo provedeno druhé měření vzorku po rozmrazení, aby bylo možné zjistit případné změny počátečního a koncového modulu pružnosti.

Následně byla provedena statistická analýza pro posouzení vlivu zmrazení na deformačně-napěťovou odezvu prasečí aorty. Ta ukázala, že změna E je významná pouze v koncovém úseku křivky napětí-deformace v obvodovém směru, přičemž došlo ke zvýšení koncového modulu pružnosti přibližně o 22 %. Na závěr jsou uvedena omezení a možné chyby celého experimentu.

7 Seznam použitých citací

- [1] KŘEN, Jiří, Josef ROSENBERG a Přemysl JANÍČEK. *Biomechanika*. 2. vyd. Plzeň: Západočeská univerzita, 2001. ISBN 80-708-2792-0.
- [2] ELIŠKA, Oldřich, Pavel PETROVICKÝ a Miloslava ELIŠKOVÁ. *Systematická, topografická a klinická anatomie: Srdce a cévní systém*. Praha: Karolinum, 1995. ISBN 80-718-4108-0.
- [3] HOŘEJŠÍ, Mgr. Jaroslav a kolektiv. *Lidské tělo: srozumitelný a zevrubný průvodce po strukturách a funkcích lidského organismu*. 2. vyd. Bratislava: Gemini, 1992. ISBN 80-852-6559-1.
- [4] MCMILLAN, Beverly. *Velký ilustrovaný atlas lidského těla*. Praha: Svojtka & Co., 2009. ISBN 978-802-5601-525.
- [5] ČAPEK, Lukáš, Petr HÁJEK a Petr HENYŠ. *Biomechanika člověka*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-802-7103-676.
- [6] VALENTA, Jaroslav a kolektiv. *Biomechanika*. Praha: Academia, 1985.
- [7] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Praha: Grada, 1997. ISBN 80-716-9140-2.
- [8] BURŠA, Jiří. *Studijní opory* [online]. (nedatováno) [cit. 2023-05-19]. Dostupné z: <http://www.old.umt.fme.vutbr.cz/~jbursa/>
- [9] PATEL, D. J. a R. N. VAISHNAV. The rheology of large blood vessels. *Cardiovascular fluid dynamics*. London, 1972.
- [10] DOCTORLIB, Medical library. Medical Physiology, 3rd Edition Elastic Properties of Blood Vessels. Doctorlib: Medical library [online]. (nedatováno) [cit. 2023-05-19]. Dostupné z: <https://doctorlib.info/physiology/medical/104.html>
- [11] SINGH, Charanpreet, Cynthia WONG a Xungai WANG. Medical Textile as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2015, 6(3), 500-525 [cit. 2023-05-19]. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb6030500
- [12] O'LEARY, Siobhan A., Barry J. DOYLE a Tim M. MCGLOUGHLIN. The impact of long term freezing on the mechanical properties of porcine aortic tissue. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2014, 37, 165-173 [cit. 2023-05-19]. ISSN 17516161. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2014.04.015
- [13] STEMPER, Brian D., Narayan YOGANANDAN, Michael R. STINEMAN, Thomas A. GENNARELLI, Jamie L. BAISDEN a Frank A. PINTAR. Mechanics of Fresh, Refrigerated, and Frozen Arterial Tissue. *Journal of Surgical Research* [online]. 2007, 139(2), 236-242 [cit. 2023-05-19]. ISSN 00224804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2006.09.001

- [14] HEMMASIZADEH, Ali, Kurosh DARVISH a Michael AUTIERI. Characterization of Changes to the Mechanical Properties of Arteries due to Cold Storage Using Nanoindentation Tests. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2012, **40**(7), 1434-1442 [cit. 2023-05-19]. ISSN 0090-6964. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-011-0506-z
- [15] CHOW, Ming-Jay a Yanhang ZHANG. Changes in the Mechanical and Biochemical Properties of Aortic Tissue due to Cold Storage. *Journal of Surgical Research* [online]. 2011, **171**(2), 434-442 [cit. 2023-05-19]. ISSN 00224804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2010.04.007
- [16] VENKATASUBRAMANIAN, Ramji T., Erin D. GRASSL, Victor H. BAROCAS, Daniel LAFONTAINE a John C. BISCHOF. Effects of Freezing and Cryopreservation on the Mechanical Properties of Arteries. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2006, **34**(5), 823-832 [cit. 2023-05-19]. ISSN 0090-6964. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-005-9044-x
- [17] SKÁCEL, Pavel. Vysoké učení technické v Brně. Tibixus [software]. 2010.
- [18] MathWorks. *MATLAB R2020b* [software]. 2020

8 Seznam použitých zkratek, symbolů a veličin

σ_{00}, σ_1	[Pa]	Cauchyho napětí pro axiální směr
σ_{LL}, σ_2	[Pa]	Cauchyho napětí pro obvodový směr
F	[N]	Měřená síla
λ	[mm]	Protážení
X	[Pa]	Počáteční délka
T, t	[mm]	Průměrná počáteční tloušťka
χ	[mm]	Konečná délka
E	[Pa]	Youngův modul pružnosti v tahu
L_0	[mm]	Počáteční délka, Počáteční posun
σ	[mm]	Skutečné napětí, Smluvní napětí
γ, ε	[-]	Přetvoření (poměrná deformace)
t	[s]	Čas
A_0	[mm ²]	Počáteční plocha průřezu
L	[mm]	Posun
T_z	[N]	Aktuální síla
T_0	[mm]	Průměrná tloušťka
L_d	[mm]	Protážení
α	[-]	Hladina významnosti
p	[-]	P-hodnota

L, 2 Obvodový směr

$\theta, 1$ Axiální směr

LSM Počáteční modul pružnosti

HSM Konečný modul pružnosti

AD Anderson-Darling test

TT Párový T-test

WT Neparametrický Wilcoxonův test

E_pa E počáteční axiální

E_ka E koncový axiální

E_po E počáteční obvodový

E_ko E koncový obvodový