



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV MECHANIKY TĚLES, MECHATRONIKY A
BIOMECHANIKY

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF SOLID MECHANICS, MECHATRONICS AND
BIOMECHANICS

ANALÝZA ODEZVOVÝCH VELIČIN VZORKŮ KOSTNÍ TKÁNĚ V RŮZNÉM STAVU DEMINERALIZACE NEBO DEPROTEINIZACE

ANALYSIS OF RESPONSE VARIABLES OF BONE SAMPLES IN A DIFFERENT STATE OF
DEMINERALIZATION OR DEPROTEINIZATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ANDREJ WEISS

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PETR VOSYNEK

BRNO 2015

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

student(ka): Andrej Weiss

který/která studuje v **bakalářském studijním programu**

obor: **Základy strojního inženýrství (2341R006)**

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:

Analýza odezvových veličin vzorků kostní tkáně v různém stavu demineralizace nebo deproteinizace

v anglickém jazyce:

Analysis of response variables of bone samples in a different state of demineralization or deproteinization

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Student se v bakalářské práci bude zabývat experimentem z oblasti biomechaniky. V rešeršní části si nastuduje patřičné znalosti k realizaci měření na zařízení, které je dostupné v laboratořích ÚMTMB. Praktická část bude zaměřena na přípravu vzorků, měření a na analýzu výsledků.

Cíle bakalářské práce:

Rešeršní studie (experimentální modelování: plánování, realizace, použité metody/zařízení; soustava na které je problém řešen)

Příprava a realizace měření

Analýza výsledků

Seznam odborné literatury:

CHEN, Po-Yu a Joanna MCKITTRICK, 2011. Compressive mechanical properties of demineralized and deproteinized cancellous bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. roč. 4, č. 7, s. 961–973 [vid. 28. leden 2013]. ISSN 1751-6161. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2011.02.006

COWIN, Stephen C. *Bone mechanics handbook*. 2nd edition. Boca Raton; London; New York; Washington, D.C. : CRC Press, 2001. [800]. ISBN 0-8493-9117-2.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Petr Vosynek

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2014/2015.

V Brně, dne 24.10.2014

L.S.

prof. Ing. Jindřich Petruška, CSc.
Ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalárska práca sa zaoberá analýzou mechanických veličín vzoriek kortikálnej kosti v stave simulujúcom úbytok kolagénnej zložky tkaniva. Skúmaná je citlivosť zvolených veličín na deproteinizáciu. Problém sa riešil experimentálne. Z prasacích stehenných kostí boli pripravené vzorky, ktoré boli podrobené meraniam vo fyziologickom a následne v deproteinizovanom stave. Na základe vykonaných analýz bola zistená najväčšia zmena u modulu pružnosti kosti a pomerného útlmu.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

kortikálna kosť, deproteinizácia, experimentálne modelovanie, modul pružnosti, pomerný útlm, vlastná frekvencia, hustota

ABSTRACT

The Bachelor thesis deals with the analysis of mechanical properties of cortical bone in a state simulating the decrease of collagenous tissue component. Sensitivity of the selected properties on deproteinization is examined. The problem was solved experimentally. Samples of porcine femur were prepared and then subjected to measurements in physiological and subsequently in deproteinized state. On the basis of performed analyses, the most significant change was found to be in the elastic modulus and damping ratio.

KEYWORDS

cortical bone, deproteinization, experimental modeling, elastic modulus, damping ratio, natural frequency, density

BIBLIOGRAFICKÁ CITÁCIA

WEISS, A. *Analýza odezvodých veličin vzorků kostní tkáně v různém stavu demineralizace nebo deproteinizace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 39 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Vosynek.

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným dielom, spracoval som ju samostatne pod vedením Ing. Petra Vosynka a s použitím literatúry uvedenej v zozname.

V Brně dňa 29. mája 2015

.....

Andrej Weiss

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som chcel poďakovať svojmu vedúcemu Ing. Petrovi Vosynkovi za odbornú pomoc a priateľský prístup počas riešenia bakalárskej práce.

Zároveň chcem vysloviť poďakovanie Ing. Tomášovi Návratovi, Ph.D. a Ing. Lubomírovi Houfkovi, Ph.D. za možnosť využiť zariadenia v laboratóriách ÚMTMB. V neposlednom rade chcem poďakovať pánovi Stanislavovi Slámovi za pomoc pri výrobe prípravkov potrebných na vykonanie práce.

OBSAH

Úvod	11
Formulácia problému a cieľu práce	11
1 Základná stavba a štruktúra kostí	12
1.1 Funkcia kostí	12
1.2 Celá kosť	12
1.3 Typy kostí	13
1.4 Komponenty kostného tkaniva	13
1.4.1 Mínérálna časť	14
1.4.2 Organická časť	14
2 Rast a obnova kostí	15
2.1 Obnova	15
2.2 Rast	15
2.3 Osteoporóza	15
3 Mechanické vlastnosti kostí	16
3.1 Faktory ovplyvňujúce mechanické vlastnosti	16
3.1.1 Vek	16
3.1.2 Pohlavie	16
3.1.3 Hydratácia	16
3.1.4 Teplota	17
3.1.5 Rýchlosť zaťažovania	17
3.1.6 Spôsob uskladnenia	17
4 Analyzované veličiny	18
4.1 Rozmery	18
4.2 Hustota	18
4.3 Modul pružnosti	18
4.4 Tvrdosť	21
4.5 Vlastná frekvencia a pomerný útlm	21
4.6 Viskoelastické vlastnosti	22
5 Príprava a testovanie vzoriek	23
5.1 Príprava	23
5.2 Meranie veličín	26
5.2.1 Hmotnosť a rozmery	26
5.2.2 Modul pružnosti	26
5.2.3 Vlastná frekvencia a pomerný útlm	27
5.2.4 Tvrdosť	29

5.2.5	Viskoelasticita.....	29
5.2.6	Deproteinizácia	32
6	Vyhodnotenie meraní.....	33
6.1	Štatistické spracovanie	33
6.2	Analýza a prezentácia výsledkov	33
Záver	38

ÚVOD

Kosti sú mimoriadne dôležitou časťou tel živých organizmov. Plnia niekoľko nezastupiteľných funkcií a ich vitálny stav je preto pre kvalitný život jedinca rozhodujúci. Bez nich by telu chýbala akákoľvek pevná opora a znemožnený by bol pohyb, či adekvátne ochrana pred nárazmi. Na kosti sú počas ich funkcie kladené vysoké nároky, musia vykazovať vysokú pevnosť, zároveň si však zachovať čo najnižšiu hmotnosť. Z pozorovania kostí je zrejmé, že sa jedná o živé, neustále obnovované tkanivo, štruktúrované tak, aby optimálne vykonávalo svoju funkciu. Schopnosť obnovy kostí je pre telo nesmierne cenná, pretože mu umožňuje prispôbiť sa dlhodobému pôsobeniu vonkajších vplyvov. Zabezpečená je kostnými bunkami, ktoré odbúravajú staré kostné tkanivo a súčasne vytvárajú nové. Pokiaľ dôjde k narušeniu rovnováhy tohto procesu, kosť stráca svoje optimálne vlastnosti, ubúda na jej kvantite, ale aj kvalite a narastá riziko vzniku závažných zlomenín. V súčasnosti sa jedná o podstatný spoločenský, ale aj ekonomický problém, ktorého pochopenie môže pomôcť pri jeho liečbe, alebo prevencii zlomenín.

FORMULÁCIA PROBLÉMU A CIEĽU PRÁCE

Experimentálne stanovenie mechanických vlastností vzoriek kostného tkaniva, vo fyziologickom a deproteinizovanom stave a analýza výsledkov z hľadiska citlivosti meraných veličín na deproteinizáciu (úbytok kolagénnej zložky).

1 ZÁKLADNÁ STAVBA A ŠTRUKTÚRA KOSTÍ

1.1 FUNKCIA KOSTÍ

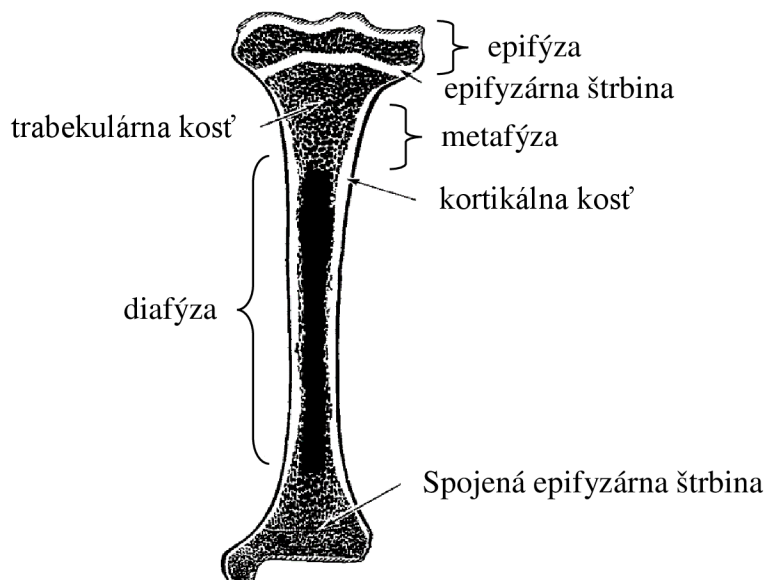
Kostra ľudského tela je u priemerného dospelého človeka zložená z 206 kostí. Jej usporiadanie poskytuje telu oporu a zároveň mu umožňuje pohyb. Kostí plnia mnoho funkcií. Ochránajú vitálne orgány pred nárazmi, udržiavajú všetky ostatné časti tela, dodávajú mu tuhosť a vytvárajú pevné ramená, takže umožňujú prenos sily zo svalov [1]. Pre svoj vysoký obsah vápniku má kosť dôležitú úlohu pri jeho homeostáze a zároveň je jeho zásobárňou [2]. Rovnako vytvára úložisko kostnej drene.

1.2 CELÁ KOSŤ

Kosť môžeme považovať za orgán, skladajúci sa z kostného tkaniva, ciev, nervových vlákien, kostnej drene a tuku, kde vzájomný pomer jednotlivých častí je odlišný v závislosti od typu a veku kosti.

Rozlišujeme niekoľko tvarov kostí. Dlhé (stehenná kosť, ramenná kosť, rebrá) najčastejšie sú to kosti končatín a majú dlhý rúrovitý tvar, krátke (stavce, hrudná kosť) obvykle nepravidelného tvaru, alebo ploché (kosti lebky, lopatka, bedrová kosť) v tvare dvojvrstvových plátov [3]. V tejto práci sú na prípravu vzoriek kostného tkaniva použité prasacie stehenné kosti (femury).

Dlhá kosť sa typicky člení na viacero úsekov. Diafýza je stredová valcová časť a na jej koncoch sa nachádzajú epifýzy širšieho zaobleného tvaru. Metafýzy, prepájajúce epifýzy s diafýzami majú kónický tvar. Na povrchu epifýz sa nachádza kĺbová chrupavka, dlhodobo prenášajúca ekvivalentné zaťaženie ako kosť. Z tohto dôvodu sú konce kosti širšie než jej zvyšok [4].



Obrázok 1 Schematický diagram pištály; upravené z [4]

1.3 TYPY KOSTÍ

Existujú dva typy kostí detí i dospelých, kortikálna a trabekulárna kosť. Líšia sa najmä výskytom (ich rozloženie je premenlivé a závisí na konkrétnej kosti) a mechanickými vlastnosťami [2].

Kortikálna, alebo aj kompaktná kosť vytvára vonkajší obal všetkých kostí tela, nezávisle od ich makroskopickej štruktúry. V najväčšej miere sa nachádza v diafýzach dlhých kostí, epifýzy sú pokryté tenkou vrstvou kortikálnej kosti. Je charakteristická nízkym pomerom povrchu k objemu a nízkou poréznosťou (typicky menej ako 10 %) [4].

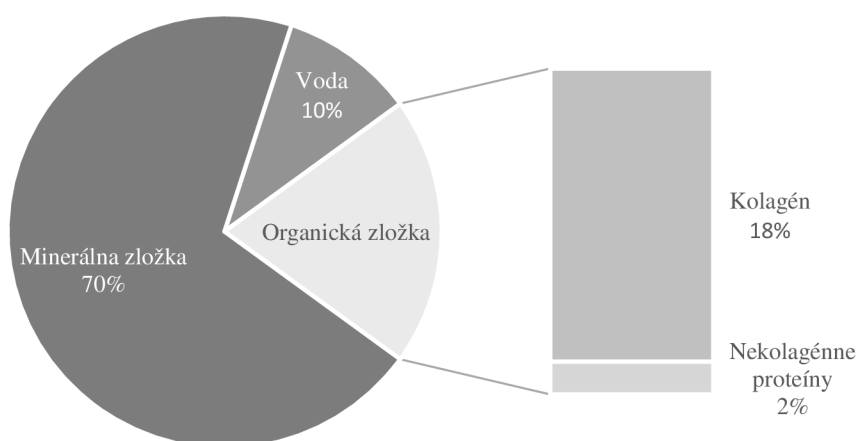
Mikroarchitektúra kortikálnej kosti je pomerne komplexná a zohráva dôležitú úlohu pri určovaní jej mechanických vlastností. Jej tkanivo je kladené vo vrstvách hrubých približne 5 μm . Vlákna kolagénu sú v každej vrstve uložené vo vzájomne kolmých polohách, avšak ich orientácia je v susedných vrstvách rozdielna [1].

Kortikálna kosť zastupuje približne 80 % hmotnosti všetkých kostí tela dospelého človeka. Je pevnejšia než trabekulárna kosť a priamo zodpovedá za biomechanickú, podpornú a tuhostnú funkciu kostry [4].

Zvyšných 20 % hmotnosti kostí tvorí trabekulárna alebo aj hubovitá, spongiformná kosť. Nachádza sa vo vnútri kortikálnej kosti, najčastejšie v koncových častiach dlhých kostí (epifýzy a metafýzy) a vo stavcoch. Od kortikálnej kosti sa líši najmä vyššou poréznosťou a vysokou metabolickou aktivitou. Trabekulárnu kosť tvoria kostné trámce alebo doštičky, ktoré majú vysoký pomer povrchu k objemu a majú mnoho buniek umiestnených na povrchu doštičiek [2].

1.4 KOMPONENTY KOSTNÉHO TKANIVA

Kostné tkanivo (matrix) môžeme popísať ako trojzložkovú štruktúru, skladajúcu sa z minerálnej časti, organickej časti a vody [2].



Graf 1 Pomer zložiek kostného tkaniva

1.4.1 MINERÁLNA ČASŤ

Najčastejšie sú kostné minerály z hydroxyapatitov, ktoré poskytujú kosti jej charakteristickú tuhosť a pevnosť [1]. Ich všeobecný vzorec je $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. V kosti je tiež prítomný aj sodík a malé množstvá horčíku a uhličitanu. Časťou kostného minerálu je aj amorfný kalciumfosfát [2]. S pomocou elektrónovej mikroskopie a röntgenovej difrakcie bolo zistené, že kostné minerály sú formované do kryštálov tvaru ihlíc, dosiek, alebo tyčí a nachádzajú sa vo vnútri a v priestoroch medzi vláknami kolagénu. Ihlice a dosky sa môžu vyskytovať v štruktúre zároveň. Prekvapivo stále neexistuje kompletná dohoda o ich tvare, rozmeroch, alebo o ich vzťahu s organickými zložkami [3].

1.4.2 ORGANICKÁ ČASŤ

Približne 90 % organickej zložky tvorí kolagén. Ďalších 10 % pozostáva z rôznych nekolagénnych proteínov [4]. Navyše [1] uvádza, že doposiaľ poznáme 15 rôznych typov kolagénu. Ich úlohou je udržiavanie integrity v mnohých orgánoch, poskytovanie pevnosti a tuhosti, ale aj ťažnosti, v závislosti na type tkaniva. V kostiach, ale aj šľachách, väzoch a koži sa vyskytuje najmä kolagén I. typu. Je štruktúrovaný komplexným trojrozmerným spôsobom, čo zabezpečuje jeho vysokú pevnosť v ťahu. Pevnosť kolagénu I. typu je v prepočte na jednotku váhy rovnaká ako pevnosť ocele [2].

2 RAST A OBNOVA KOSTÍ

Kostné bunky primárne zabezpečujúce tvorbu a resorpciu kostí sú osteoblasty a osteoklasty. Oba typy vznikajú v kostnej dreni. Osteoblasty sú bunky tvoriace kosť. Produkujú veľké kvantá kolagénu I. typu, ďalšie proteíny kostného tkaniva a alkalickú fosfázu. Osteoklasty sú mnohjadrové bunky erodujúce a resorbujúce skôr vytvorenú kosť. Osteocyty sú osteoblasty, ktoré ostali uložené v kostnom tkanive, tak ako boli sekretované. Líniové bunky sa nachádzajú na povrchu kostného tkaniva. Líniové bunky a uložené osteocyty sú prepojené malými kanálmi, čo im umožňuje medzi sebou komunikovať [2].

2.1 OBNOVA

Aj keď je kosť niekedy považovaná za neživú, v skutočnosti sa jedná o žijúce, dynamické tkanivo, ktoré je konštantne obnovované. Prebieha v nej neustály miestny proces remodelovania. Kosť je najskôr resorbovaná osteoklastom. V tom istom mieste potom osteoklasty vytvoria novú kosť. Je však možné, aby sa vytvorila aj na inom mieste. Týmto je zabezpečená remodelácia. Tento proces je sčasti regulovaný namáhaním kostí, ktoré sú tým pádom schopné reagovať na zaťažovanie na ne kladené. Ročne sú obnovené 4 % kortikálnej a 20 % trabekulárnej kosti [1].

2.2 RAST

Rast dlhých kostí začína modelovaním chrupavky, ktorá sa počas rastu premení na kosť procesom nazývaným osifikácia. Osifikácia začína na diafýze, ktorá je počas rastu oddelená od epifýz doštičkami - epifyzárnymi štrbinami. Kosť rastie do dĺžky tak, že sa na koncoch štrbín ukladá nové kostné tkanivo na koncové časti diafýz. Po ukončení rastu sa štrbiny uzatvárajú a epifýzy sú prepojené s diafýzou [2].

2.3 OSTEOPORÓZA

V kosti môže nastať stav keď resorpcia prevažuje nad jej tvorbou. Z kosti ubúda minerálna i organická zložka, tým pádom stráca na mase a pevnosti, čo má za následok vyššiu náchylnosť ku vzniku zlomenín. Príčin vzniku môže byť niekoľko, no najčastejšie je spôsobená vekom a u žien po menopauze aj deficitom estrogénu. Dospelé ženy majú menej kostnej hmoty, než dospelý muž a po menopauze ich strácajú rýchlejšie než muži rovnakého veku. Preto sú ženy náchylnejšie k vzniku závažnej osteoporózy. Občas dochádza aj k prípadom, kedy fraktúry krčku stehennej kosti vedú u starých ľudí k ich úmrtiu (12-20 % prípadov) [2].

3 MECHANICKÉ VLASTNOSTI KOSTÍ

Je zřejmé, že požiadavky kladené na vlastnosti kostí sú rôzne (vysoká pevnosť, tuhosť, nízka hmotnosť, vysoká únavová životnosť) a často vzájomne protichodné. Zlepšovanie niektorých vlastností môže mať teda za následok, zhoršovanie iných (napríklad znižovanie hmotnosti kostí na úkor zvýšenej pravdepodobnosti vzniku zlomenín). Práve preto sú kosti z mnohých hľadísk optimalizované na prijateľný výkon svojej funkcie v rámci bežných fyziologických podmienok.

Mechanické vlastnosti kortikálnej kosti sú do vysokej miery závislé na mierke skúmanej oblasti, smere a type zaťažovania. Pokiaľ sa pohybujeme v rámci niekoľkých mikrometrov, správa sa ako vlákňový kompozit. Vlákna kolagénu poskytujú kosti pevnosť v ťahu a potrebnú ťažnosť, zabraňujú tým náchylnosti k prílišnej krehkosti. Hydroxyapatity jej zase dodávajú potrebnú tuhosť. V mierke milimetrov sa kosť správa silne anizotropicky. V pozdĺžnom smere, zhodnom s osou kosti má lepšie mechanické vlastnosti (najmä pevnosť a tuhosť) ako v smere priečnom. Rovnako je materiál kosti pevnejší pri zaťažovaní na tlak ako na ťah. Tieto vlastnosti môžu byť výhodné najmä preto, že kosť je zaťažovaná najčastejšie práve v jej osi a na tlak [4].

3.1 FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE MECHANICKÉ VLASTNOSTI

Mechanické vlastnosti kostí sa menia v závislosti na ich anatomickej polohe, veku a všeobecnom zdravotnom stave donora, u cicavcov sa výrazne líšia pre rôzne živočíšne druhy. Rovnako aj príprava a následné uskladnenie vzoriek kostí môže ovplyvniť či sa ich pôvodné mechanické vlastnosti zachovajú, alebo pozmenia [4].

3.1.1 VEK

Vek ovplyvňuje vlastnosti kostí u ľudí i zvierat. Vo všeobecnosti s narastajúcim vekom stúpa aj obsah minerálov v kostnom tkanive, čo má za následok dosiahnutie jej najvyššej pevnosti a tuhosti v dospelosti (u človeka 35. rok života).

3.1.2 POHLAVIE

Pohlavie vo významnej miere nemá vplyv na vlastnosti kostí, ale rozdiely medzi mužskými a ženskými kosťami sú v ich celkovom množstve. Mužská kostra je spravidla väčšia a ťažšia než ženská, no nie na úkor vyššej hustoty kostí než u žien. [3]

3.1.3 HYDRATÁCIA

Voda tvorí približne 10 % hmotnosti kosti vo zvlhčenom stave [1]. Práve preto má jej obsah v kostnom tkanive významný vplyv na mechanické vlastnosti. U kostí ponechaných dlhšiu dobu na vzduchu dochádza k ich postupnému vysychaniu, ktoré zvyčajne spôsobuje zvýšenie modulu pružnosti a pevnosti a pokles húževnatosti. Preto, je dôležité udržiavať kosti pred mechanickými skúškami vo zvlhčenom stave. Občas môže však dôjsť ich vysušeniu a to napríklad nedopatrením, keď sú vzorky ponechané na vzduchu príliš dlho. Vtedy je potrebné kosti znova zvlhčiť [4]. Podľa [3] mechanické vlastnosti pri takomto postupe ostávajú nezmenené a [4] uvádza, že dosiahnutie pôvodnej hmotnosti vysušenej kosti trvá približne 3 hodiny.

3.1.4 TEPLOTA

Väčšina mechanických skúšok prebieha pri izbovej teplote (23 °C). Pre dosiahnutie čo najpresnejších výsledkov meraní je ale vhodnejšie testovať vzorky pri teplote 37 °C, ktorá viac približuje podmienky fyziologickým. Testovanie pri izbovej teplote má za následok zvýšenie modulu pružnosti vzoriek o 2 až 4 % v porovnaní s meraním pri teplote 37 °C [4].

3.1.5 RÝCHLOSŤ ZAŤAŽOVANIA

Kosti sa vo zvlhčenom stave správajú ako pružina v kombinácii s tlmičom. Táto vlastnosť im umožňuje odolávať mechanickým rázom [1]. Odozva „tlmiča“ kosti je závislá na rýchlosti, akou je kosť zaťažovaná. Rýchlosť zaťažovania má preto počas biomechanických skúšok vplyv na tuhosť a pevnosť kostí (narastajú so zvyšovaním rýchlosti zaťažovania). Optimálna rýchlosť zaťažovania simulujúca fyziologické podmienky je 0,01 až 0,08/s [4].

3.1.6 SPÔSOB USKLADNENIA

Zamrazovanie je bežná technika uskladňovania kostí. Vzhľadom na komplexnosť niektorých druhov mechanických skúšok, musia byť vzorky niekedy zmrazené a znovu rozmrazené aj niekoľkokrát. Podľa [3] ani po niekoľkonásobnom zmrazovaní a rozmrazovaní vzoriek, nedochádza k významnému ovplyvneniu ich vlastností. Najčastejšie sa kosti uchovávajú pri teplote -20 °C, no pre dlhodobé uskladnenie je odporúčaná teplota -80 °C až -70 °C, alebo aj nižšie teploty, z dôvodu zamedzenia vyparovania a zníženia enzymatických aktivít.

4 ANALYZOVANÉ VELIČINY

4.1 ROZMERY

Rozmery kostí, ako napríklad šírka, hrúbka, dĺžka, ale aj plocha a objem patria k základným parametrom, často potrebným pri ďalších mechanických testoch. Určenie hustoty, modulu pružnosti, alebo pevnosti vždy vyžaduje vopred známe rozmery testovaných vzoriek.

Metód určenia rozmerov kostí je viacero a spravidla je ich vykonanie nenáročné. K bežným metódam patrí použitie pravítka, mikrometra, posuvného meradla, alebo röntgenových snímok. Chyby merania je možné čiastočne znížiť použitím digitálnych zariadení [3].

4.2 HUSTOTA

Kortikálna kosť je kompaktný materiál zahrňujúci malý stupeň vnútornej porézności. Jej určenie spočíva v pomere skutočného objemu vzorky a zdanlivého objemu. Skutočný objem je možné určiť za pomoci Archimedovho zákona, ponorením vzoriek napríklad do vody. Zdanlivý objem sa najčastejšie určuje z ich rozmerov, ktoré zistíme posuvným meradlom, no za predpokladu pravidelného tvaru pripravených vzoriek a to napríklad valca, alebo hranolu. Vzhľadom na prítomnosť porézności v kostnom tkanive existuje niekoľko metód určenia hustoty vzoriek kostí.

Materiálová hustota kortikálnej kosti vyjadruje pomer hmotnosti vo zvlhčenom stave a skutočným objemom vzorky a nadobúda hodnotu 1,7 až 2,1 g·cm⁻³. Častejšie sa však uvažuje zdanlivá hustota, určená ako pomer hmotnosti vzorky vo zvlhčenom stave a jej objemom určeným externe (pomocou posuvného meradla).

$$\rho = \frac{m}{V} [kg \cdot m^{-3}] \quad (1)$$

Na rozdiel od materiálovej hustoty zdanlivá hustota zahŕňa aj určitý stupeň porézności. Priemerná hodnota zdanlivej hustoty u kortikálnej kosti je približne 1,9 g·cm⁻³, čo je takmer rovnaká hodnota ako hodnota materiálovej hustoty. Zdanlivá hustota navyše priamo ovplyvňuje aj iné mechanické vlastnosti kosti a to podľa [3] elasticitú tuhosť a pevnosť.

Merat' hustotu kostí je možné viacerými spôsobmi. Priame meranie hustoty spočíva v uplatnení Archimedovho zákona. Hustota je určená z hmotností suchých a ponorených kostí [4]. Alternatívnou metódou je výpočet hustoty vzoriek kostí pomocou ich rozmerov (za predpokladu ich jednoduchého a pravidelného geometrického tvaru) a hmotnosti. Hustota je následne určená podielom hmotnosti a objemu (vypočítaného z rozmerov vzorky) [3].

4.3 MODUL PRUŽNOSTI

Závislosť napätia σ [MPa] a pretvorenia ε [-] popisuje krivku, ktorej smernica v elastickej oblasti sa nazýva modul pružnosti. Jedná sa o štandardizovanú hodnotu tuhosti, ktorá vyjadruje pomer medzi napätím a pretvorením, alebo aj ktorýkoľvek podiel $\Delta\sigma$ a $\Delta\varepsilon$ [4]. Pomer napätia a pretvorenia nie je funkciou rozmerov a ani tvaru testovaného materiálu. Je skôr mierou schopnosti materiálu udržať svoj tvar pri zaťažovaní vonkajšími silami. Preto môžeme povedať, že modul pružnosti je materiálovou charakteristikou. Elasticita je vlastnosť na čase nezávislá

a úplne reverzibilná. Materiály vykazujúce lineárne elastické vlastnosti sa správajú podľa Hookovho zákona:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} [MPa] \quad (2)$$

Mechanické vlastnosti biologických tkanív, ako napríklad kostí, typicky nevykazujú lineárny priebeh v celej oblasti fyziologických podmienok, z dôvodu nelineárneho chovania ich fluidnej zložky. Kostí však preukazujú len mierny stupeň nelinearity, preto je ich možné považovať za lineárne elastický (Hookovský) materiál.

V porovnaní s inými biologickými materiálmi (chrupavka, koža), majú kosti relatívne vysoký modul pružnosti. Modul pružnosti kortikálnej kosti sa podľa [3] pohybuje v rozmedzí od 5 do 23 GPa. Navyše vykazuje anizotropické (tiež možno popisateľné ako ortotropické) chovanie. Jeho hodnoty sú premenné v rôznych anatomických smeroch, napríklad hodnoty v pozdĺžnom smere (17,4 GPa u ľudských kostí a 20,4 GPa u hovädzích kostí) sa môžu líšiť takmer dvojnásobne od hodnôt modulu pružnosti v priečnom smere (9,6 GPa u ľudských kostí a 11,7 GPa u hovädzích kostí) [3].

Tabuľka 1 Hodnoty modulu pružnosti stehenných kostí rôznych donorov, podľa [3]

	Rozmery vzoriek [mm]	E [GPa]
Ľudská	2 x 5 x 50	15,5
	3 x 3 x 30	9,82–15,7
	0,4 x 5 x 7	12,5 ±2,1
	2 x 3,4 x 40	9,1–14,4
Kravská	2 x 3,5 x 30	18,5 ±2,8
	2 x 4 x 35	19,4 ±0,7
	2 x 30,4	18,1 ±0,5
Kravská	2 x 2 x 40	17,1–19,9
	2 x 3,5 x 30	21,2 ±1,9
Husacia	0,75 x 0,75 x 25	16,9–20,7

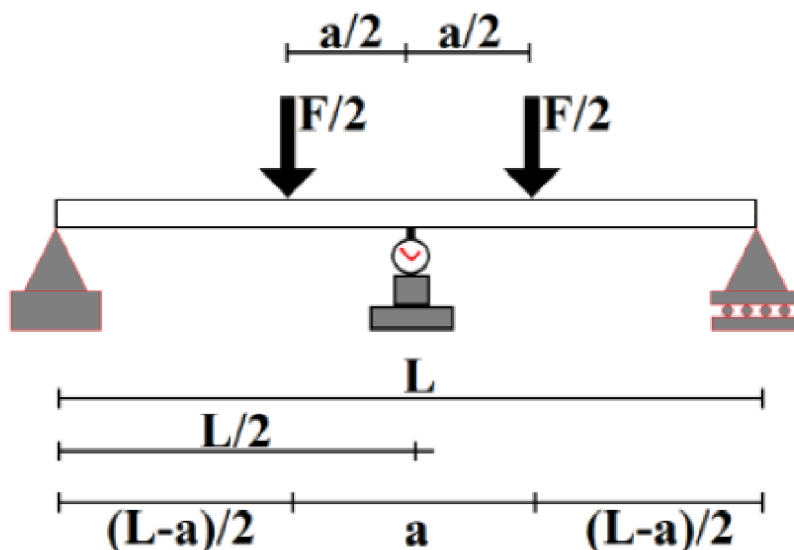
Modul pružnosti kortikálnej kosti je možné určiť ťahovými, tlakovými, alebo ohybovými skúškami. V tejto práci je s výhodami zisťovaný práve pomocou ohybu. Ohybové testy sú užitočné pri meraní mechanických vlastností dlhých kostí [4]. Ohyb spôsobuje ťahové napätie a predlžovanie na konvexnej strane vzorky a tlakové napätie spolu so skracovaním na strane konkávnej. Veľkosť napätia proporcionálne narastá so vzdialenosťou od neutrálnej osi [3]. Vzhľadom na nižšiu pevnosť kosti v ťahu než tlaku sa vzorky spravidla porušia pri ohybových skúškach najskôr na strane namáhanej na ťah.

Vzorky môžeme zaťažovať troj, alebo štvorbodovým ohybom, práve ktorý bol použitý v tejto práci. Štvorbodový ohyb nastáva keď dve silové dvojice (pár rovnobežných síl rovnakej veľkosti a opačného smeru) aplikované na štruktúru vytvára dva rovnaké ohybové momenty. Výhodou trojbodového ohybu je hlavne jednoduchosť, no v porovnaní so štvorbodovým

ohybom vytvára vyššie šmykové napätia v stredovej časti vzoriek. Pri štvorbodovom ohybe vzniká medzi hornými oporami len ohybové napätie, čo zabezpečuje nulové šmykové napätia. Navyše veľkosť ohybového momentu v oblasti medzi oboma silovými dvojicami je konštantná. Problematické však môže byť dosiahnutie zhodných síl u nepravidelne tvarovaných vzoriek v oboch bodoch zaťažovania, nutné pre korektnosť skúšky. Štvorbodový ohyb je preto často využívaný pri určovaní mechanických charakteristík vzoriek s konštantným prierezom [4].

PODMIENKY KOREKTNÉHO MERANIA

Pri skúške by mali byť všetky body kontaktu hladké a zaoblené, pre prevenciu vzniku koncentrácie napätia. Záťaž sa spravidla aplikuje v jednom zaťažovacom cykle. Rýchlosť zaťažovania by mala čo najviac odpovedať fyziologickým podmienkam (0,01 až 0,08/s). Dôležitá je aj dostatočná vzdialenosť spodných podpôr. Pokiaľ je táto vzdialenosť príliš malá vzniknutý posuv je tvorený prevažne šmykovým napätím a nie ohybovým [3].



Obrázok 2 Schéma štvorbodového ohybu; upravené z [5].

Napätie a pretvorenie je možné vypočítať z hodnôt sily a posuvu určených skúškou. Pre štvorbodový ohyb sú to vzťahy odvodené z [5]:

$$\sigma = F \cdot \left(\frac{3 \cdot (L - a)}{2 \cdot b \cdot h^2} \right) \quad (3)$$

$$\varepsilon = \delta \cdot \frac{6 \cdot h \cdot (L - a)}{a \cdot (3 \cdot L^2 - 4 \cdot a^2)} \quad (4)$$

kde F [N] je zaťažujúca sila, L [m] vzdialenosť dolných podpôr, a [m] vzdialenosť horných podpôr, b [m] šírka vzorky, h [m] výška vzorky, δ [m] deformácia.

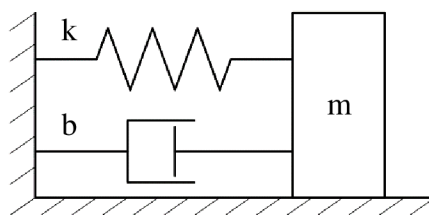
4.4 TVRDOSŤ

Tvrdosť pevných látok je definovaná ako odpor, ktorý kladie materiál proti vnikaniu cudzieho telesa.

Podstata metód merania tvrdosti sa zakladá na vtláčovaní malého telieska (indentora) do povrchu skúšaného materiálu určitou silou za definovaných podmienok. Skúšky tvrdosti sa podľa charakteru zaťažujúcej sily delia na statické (Brinell, Rockwell, Vickers, Knoop) a dynamické. Pri dynamických (odrazových) skúškach je zaznamenaná rýchlosť tesne pred a po odraze telieska spusteného na povrch materiálu, táto tvrdosť sa preto viaže na elasticitu materiálu. Pomer rýchlostí pred a po odrazení indikuje tvrdosť materiálu, ktorú je možné prepočítať za pomoci rôznych tabuliek na hodnoty iných stupníc [3].

4.5 VLASTNÁ FREKVENCIA A POMERNÝ ÚTLM

Väčšina mechanických sústav vykonáva kmitavé pohyby, ktoré je možné popísať pohybovou rovnicou. Určenie vlastnej frekvencie a pomerného útlmu vychádza z rovnice voľného kmitania hmotného bodu s viskóznym tlmením a jedným stupňom voľnosti [6]. Tento druh kmitania modelujeme pomocou hydraulického tlmiča, paralelne prepojeného k pružine.



Obrázok 3 Systém s jedným stupňom voľnosti

Podľa [7] má pohybová rovnica mechanického modelu tvar:

$$m \cdot \ddot{q} + b \cdot \dot{q} + k \cdot q = 0 \quad (5)$$

kde m [kg] vyjadruje hmotnosť, b [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-1}$] viskózne tlmenie, k [$\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$] tuhosť, \ddot{q} [$\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$] zrýchlenie, \dot{q} [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] rýchlosť, q [m] polohu. Následne je možné definovať veličiny nazývané uhlová frekvencia:

$$\Omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}} [\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (6)$$

a pomerný útlm:

$$b_p = \frac{b}{2\sqrt{k \cdot m}} [-] \quad (7)$$

Vzťah medzi uhlovou frekvenciou a vlastnou frekvenciou je nasledujúci [7]:

$$f_0 = \frac{\Omega_0}{2\pi} [Hz] \quad (8)$$

Pomerný útlm je možné určiť z grafu časovej, alebo frekvenčnej odozvovej funkcie. Graf frekvenčnej funkcie je najskôr potrebné zobrazit' v logaritmických súradniciach. Ďalej sa určia body s polovičným výkonom (half-power points). Sú to body, kde amplitúda poklesne o 3dB [8]. Pokiaľ frekvencie týchto bodov označíme ako f_1 a f_2 , pomerný útlm získame ako:

$$b_p = \frac{f_2 - f_1}{2f} \quad (9)$$

4.6 VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI

Jedná sa o tuhostné a tlmiace účinky materiálu. Ich experimentálne určenie spočíva v pomalom zaťažovaní vzoriek na trhacom stroji, v niekoľkých zaťažovacích cykloch. Z podielu Laplaceových obrazov zaťaženia a odozvy je možné priradiť materiálu matematický model popisujúci jeho chovanie a určiť príslušné konštanty charakterizujúce jeho viskoelastické vlastnosti [3].

5 PRÍPRAVA A TESTOVANIE VZORIEK

5.1 PRÍPRAVA

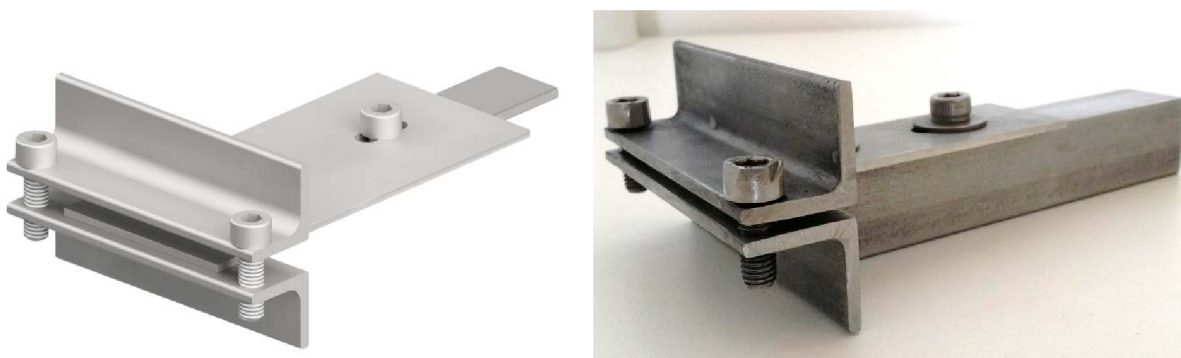
Pre mechanické testy sa kosti často upravujú na vzorky s konštantným prierezom po celej dĺžke a to kruhového, alebo obdĺžnikového tvaru [3]. V tejto práci bolo z prasacích stehenných kostí pripravených 17 vzoriek s obdĺžnikovým prierezom. Zakúpenie a spracovanie všetkých kostí prebehlo v jeden deň. Kvalita prípravy vzoriek ovplyvňuje všetky ďalšie merania na nich realizovaných. Práve preto bol tento proces s pomedzi ostatných časovo najnáročnejší. Vo výsledku mali približne rovnaké rozmery, ktoré boli volené tak aby bolo možné pripraviť z každej celej kosti práve jednu vzorku. Dôraz bol kladený na dodržanie čo najvyššej rovnobežnosti protiahlých stien a dostatočnej hladkosti ich povrchu. Rezanie sa vykonalo na presnej píle pre experimentálne účely *MIKRON 110*. Použitý bol diamantový kotúč, ktorý mal z pomedzi ostatných dostupných najvyššiu tuhosť, takže umožňoval odstrániť aj tenké rezy materiálu, bez toho aby zo svojej dráhy počas pílenia vybočil. Vzorky boli počas celého procesu pílenia zvlhčované vodou zo vstavaného chladenia píly, čo zabraňovalo ich vysušeniu a zároveň prípadnému „spáleniu“ povrchu kosti, ktoré vznikalo bez použitia chladenia. Keďže povrch vzoriek bol upravený kotúčom píly, nebolo potrebné pred prípravou z kostí odstraňovať všetky mäkké tkanivá.

Samotné pílenie bolo zahájené oddelením diafýz od epifýzy, zväčša však problematicky z dôvodu veľkých rozmerov epifýz a nedostatočného priestoru v konštrukcii píly. Dochádzalo preto k zamedzeniu pohybu kotúča. Problém sa riešil narezaním časti kosti a jej následným pootočením okolo pozdĺžnej osi v zveráku píly, často na niekoľkokrát a s vyššou časovou náročnosťou. Vhodnejší spôsob odstránenia epifýz by bol napríklad za použitia ručnej píly. Dĺžka diafýz po odstránení ich koncových častí činila z dôvodu maximálneho možného rozvretia zveráku píly (67 mm) 65 mm. Po odstránení epifýz došlo k zviditeľneniu prierezu diafýz. Pred ďalším pílením vzoriek bolo zvolené vždy rovnaké odberné miesto, a to miesto čo najmenej po dĺžke zakrivené a zároveň s čo najväčším odhadovaným prierezom.



Obrázok 4 Naznačené miesto odberu vzorky

Ďalej bol do kosti vytvorený dvomi zárezmi vrub, čo odhalilo skutočnú hrúbku a tvar kortikálnej časti a jej prípadné nedostatky ako napríklad dutiny. Zároveň vytvoril prvú (bočnú) plochu finálnej vzorky. Keďže hrúbka kortikálnej kosti diafýz bola pomerne nízka (približne 5 mm v najhrubšom mieste) a postupom k okraju kosti sa rýchlo znižovala a výskyt trabekulárnej kosti narastal, bola zvolená hrúbka vzoriek 2 mm. Ďalej sa postupovalo určením polohy dvoch rovnobežných rezov, ktoré vytvorili ďalšie dve plochy vzoriek. Ich vzájomná vzdialenosť (2 mm) bola dosiahnutá priložením merky pri posuve zveráku. Rovnobežnosť oboch plôch bola zabezpečená nepremiestnením diafýzy vo zveráku, medzi oboma rezmi, ale len jeho posuvom. Následne sa pokračovalo umiestnením vzoriek do pomocného zveráku, ktorý bol navrhnutý a skonštruovaný tak, aby umožňoval ich pevnejšie a presnejšie uchytenie pri pílení. Zároveň umožňoval fixné nastavenie dorazu a tým pádom aj konštantnú šírku všetkých vzoriek. Pomocný zverák sa uchyťoval do zveráku píly. Ako materiál sa zvolili L profily z nerezovej ocele, ktorá spĺňa požiadavky na prevádzku vo vlhkom prostredí píly. Vzorky boli vložené medzi jeho čeľusti a upevnené vo svojej polohe pomocou dvoch skrutiek. Rez bol vedený rovnobežne s dorazom zveráku. Týmto krokom bol vytvorený konečný prierez vzoriek.



Obrázok 5 Zľava doprava: návrh pomocného zveráku; realizácia pomocného zveráku

Pílenie sa ukončilo upravením vzoriek na konečnú dĺžku (z pôvodných 65 mm) a to tak, že sa odstránila vždy časť obsahujúca trabekulárnu kosť, alebo vadu. Uchytenie bolo umožnené pôvodným zverákom píly. Výsledkom boli vzorky o priemerných rozmeroch 2,3 x 4,4 x 48,6 mm s pomerne rovnobežnými stranami, bez vád a výskytu trabekulárnej kosti. Mierne odchýlky od rozmerov sú najčastejšie spôsobené tendenciou kotúča vychýliť sa a to aj napriek tomu, že bol zvolený najtuhší kotúč k dispozícii. Problematické bolo aj určovanie vzdialenosti dvoch spomínaných rovnobežných rezov pomocou merky. Rovnako sú odchýlky spôsobené uchytením kosti v pomocnom zveráku. Aj napriek uchyteniu o väčšie plochy sa vzorka občas pôsobením radiálnej sily kotúča mierne vychýlila zo svojej polohy. Silnejšie pritiaženie jeho skrutiek by však mohlo spôsobiť poškodenie vzoriek.

Vzhľadom na urýchlenie procesu prípravy boli všetky úkony vykonané po jednom na každej vzorke osobitne. To znamená že prvý krok bol najskôr vykonaný postupne od prvej, až po poslednú kosť, následne sa vykonala na všetkých kostiach druhý krok a tak ďalej. Tento postup umožňoval prípravu bez veľkých zmien v nastavení zverákov, ktoré bolo napríklad pre pomocný zverák pre všetky vzorky rovnaké. Medzi jednotlivými krokmi boli vzorky vždy umiestnené do mikroténového vrečka s vlastným číselným označením a zvlhčené vodou, aby bolo zabránené ich vysychaniu na vzduchu. Po príprave boli ihneď zamrazené vo vode na teplotu -20 °C.



Obrázok 6 Vytvorenie 1. zárezu



Obrázok 7 Zviditeľnenie hrúbky kortikálnej kosti



Obrázok 8 Prvý z dvojice rovnobežných rezov



Obrázok 9 Druhý z dvojice rovnobežných rezov



Obrázok 10 Kost' v pomocnom zveráku



Obrázok 11 Úprava vzorky na konečnú dĺžku

5.2 MERANIE VELIČÍN

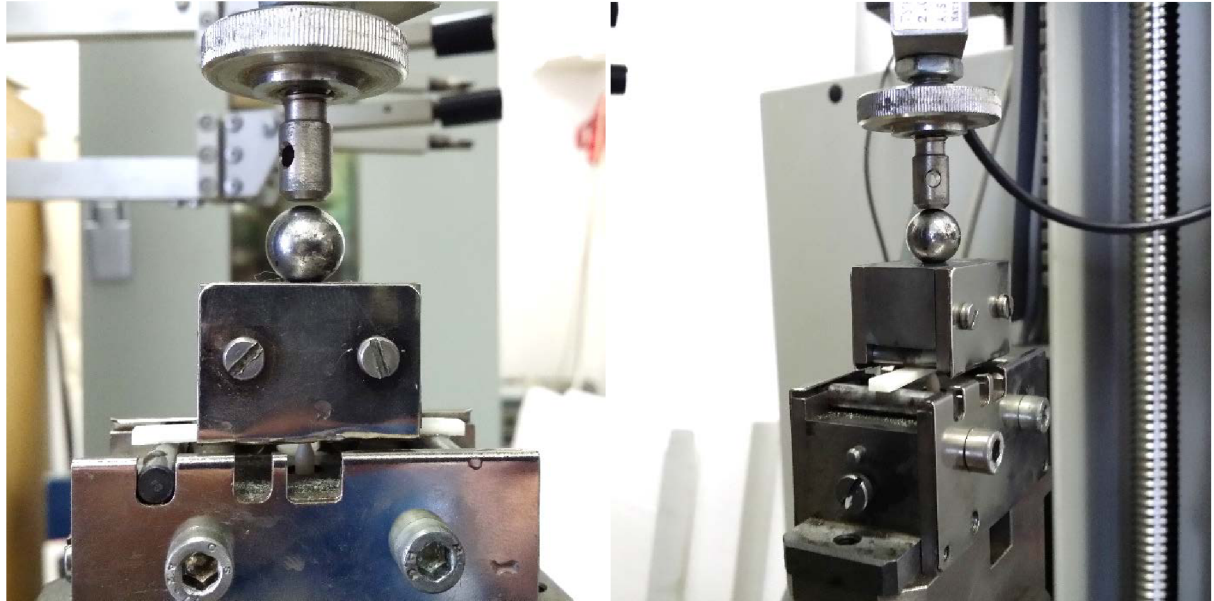
Pred zahájením všetkých testovaní bol vypracovaný plán merania, zahrňujúci všetky potrebné nástroje, pomôcky, tabuľky pre jednoduchý zápis meraní alebo aj predbežné hodnoty meraných veličín dohľadane v literatúre. Príprava takéhoto plánu výrazne uľahčovala výkon samotného merania, zabezpečovala jeho hladký chod a umožňovala rýchlu kontrolu korektnosti meraní. Samotné merania prebiehali počas troch dní. Kosti vo fyziologickom stave boli testované v jeden deň, ďalší bol pridelený deproteinizácii a meraniu veličín v deproteinizovanom stave, nakoniec boli analyzované viskoelastické vlastnosti. Pre merania vo fyziologickom a deproteinizovanom stave bolo použitých 16 vzoriek, jedna vzorka bola vyčlenená na meranie viskoelastické vlastností. Vykonaniu merania v daný deň vždy predchádzalo rozmrazenie všetkých vzoriek na izbovú teplotu vložením do nádoby s teplou vodou. Medzi jednotlivými meraniami boli vzorky uložené v mikroténových vreckách, s vodou aby sa predišlo vysúšaniu, alebo nechcenému zameneniu vzoriek. Pred meraním danej veličiny sa vzorka vybrala z vrecúška a dôkladne osušila papierovým obrúskom.

5.2.1 HMOTNOSŤ A ROZMERY

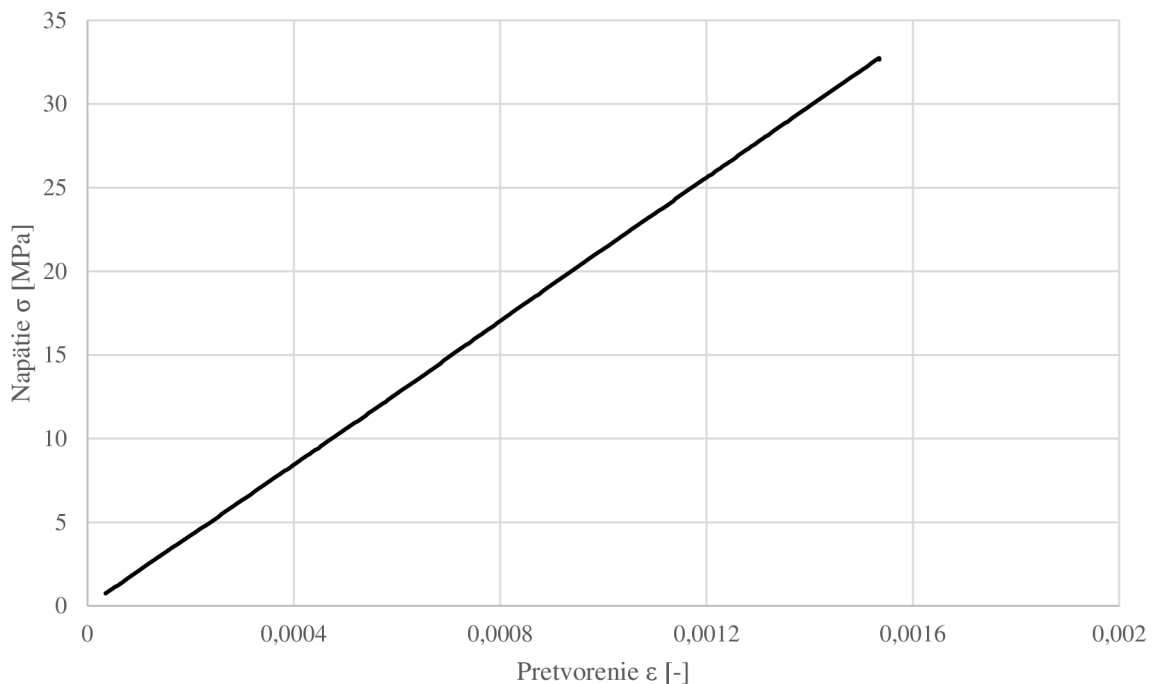
Určovanie hmotnosti a rozmerov vzoriek prebiehalo na jednom stanovisku. Najskôr boli kosti vážene „na vzduchu“ pomocou presnej váhy *Denver Instrument S-603*. Meranie rozmerov sa vykonalo posuvným meradlom *Mitutoyo CD-15CP*. Hrúbka a šírka sa merala vždy na troch miestach a to na oboch okrajoch a v strednej časti vzorky. Z týchto hodnôt sa následne určil aritmetický priemer, ktorý bol v ďalších výpočtoch považovaný za skutočný rozmer vzorky.

5.2.2 MODUL PRUŽNOSTI

Modul pružnosti bol určený za pomoci štvorbodového ohybu, vykonanom na univerzálnom stroji *ZWICK* v jednom zaťažovacom cykle. Vzorky boli ukladané na dve valcové podpory, o vzájomnej vzdialenosti 40 mm, vzdialenosť horných podpôr bola 20 mm. Použitá bola silomerná hlava s maximálnym zaťažením 100 N. Pri nedeštruktívnych testoch je niekedy potrebné určiť maximálne zaťaženie, alebo deformáciu, ktoré ešte nespôsobia plastické deformácie. Toto zaťaženie bolo určené niekoľkými pokusmi a to postupným zvyšovaním zaťažujúcej sily. Samotné meranie prebiehalo nasledovne. Vzorky boli najskôr predzaťažené v smere ich hrúbky silou 0,5 N rýchlosťou 2 mm.min⁻¹, potom pokračovalo zaťažovanie rýchlosťou 0,5 mm.min⁻¹. Po dosiahnutí maximálnej prednastavenej sily 30 N bola skúška ukončená. Z nameraných veličín, sily a posuvu boli vypočítané hodnoty napätia a deformácie a graficky znázornené. U vzoriek sa neprejavovala nelineárna závislosť napätia na pretvorení, preto bol výsledný modul pružnosti určený, ako smernica vynesenej tangenty pomocou softwaru *MS Excel*.



Obrázok 12 Skúška štvorbodovým ohybom



Graf 2 Závislosť napätia na pretvorení vzorky č. 14

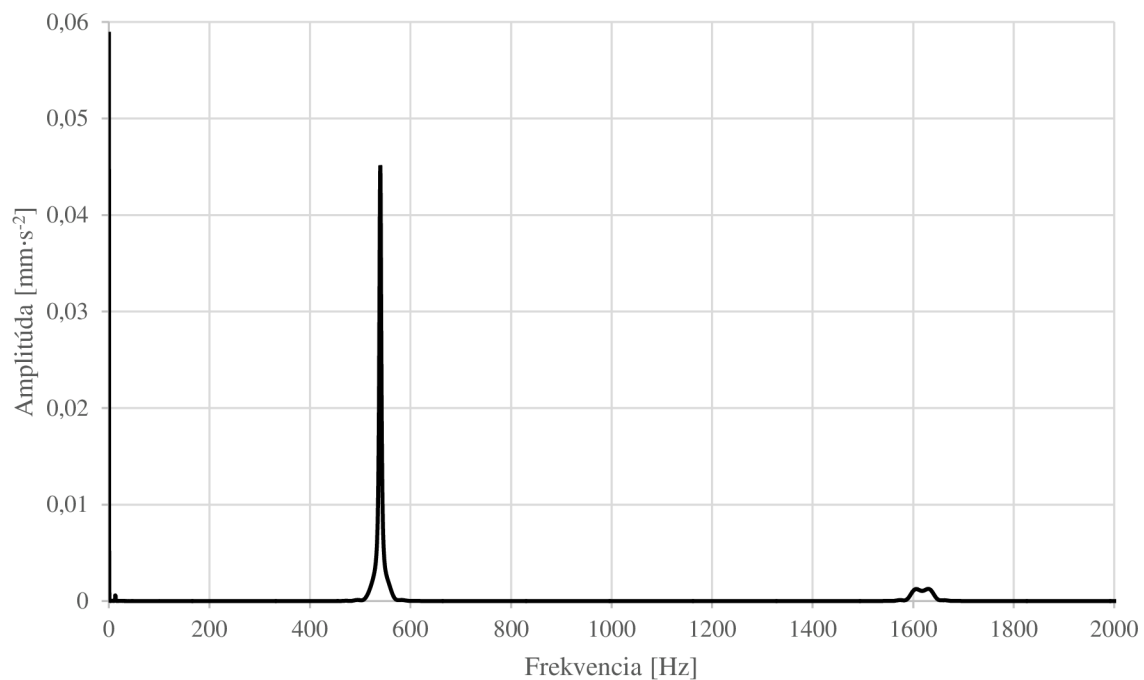
5.2.3 VLASTNÁ FREKVENCIA A POMERNÝ ÚTLM

Použité bolo bezkontaktné laserové meracie zariadenie *OMETRON*. Vzorky boli uchytené do klinovej skrutkovacej čeľusti, vždy do rovnakej hĺbky 4 mm. Následne bolo vybudené kmitanie silovým impulzom v smere hrúbky. Meranie na každom vzorku bolo vykonané päťkrát a výsledná hodnota je vypočítaná ako aritmetický priemer. Z nameraných dát bola vyexportovaná frekvenčná odozva, ktorá bola následne spracovaná v programe *Matlab*. Z dôvodu vysokého počtu nameraných dát bol použitý skript na import a následné spracovanie.

Hodnoty boli najskôr upravené na decibelové zobrazenie. Následne bola určená pozícia vlastnej frekvencie a to ako maximum frekvenčnej funkcie. Táto hodnota bola ponížená o 3 dB a zo vzniknutých bodov sa vypočítal pomerný útlm.



Obrázok 13 Meranie frekvenčných charakteristik



Graf 3 Amplitúdo-frekvenčná charakteristika vzorky č. 8

5.2.4 TVRDOSŤ

Tvrdość vzoriek bola nameraná prenosným tvrdomerom *TIME TH1100*, pracujúcim na princípe odrazu guľôčky. Vzorky boli položené na tuhú kovovú podložku. Meranie bolo vykonané vždy na koncovej časti vzorky, päťkrát po sebe. Prístroj bol nastavený na zobrazenie výsledkov v jednotkách tvrdosti HV. Namerané hodnoty však vykazovali pomerne vysoký rozptyl, pravdepodobne závislý od uhlu priloženia meradla k povrchu vzorky. Vhodnejší spôsob merania by bol použitím niektorej z indentačných metód.



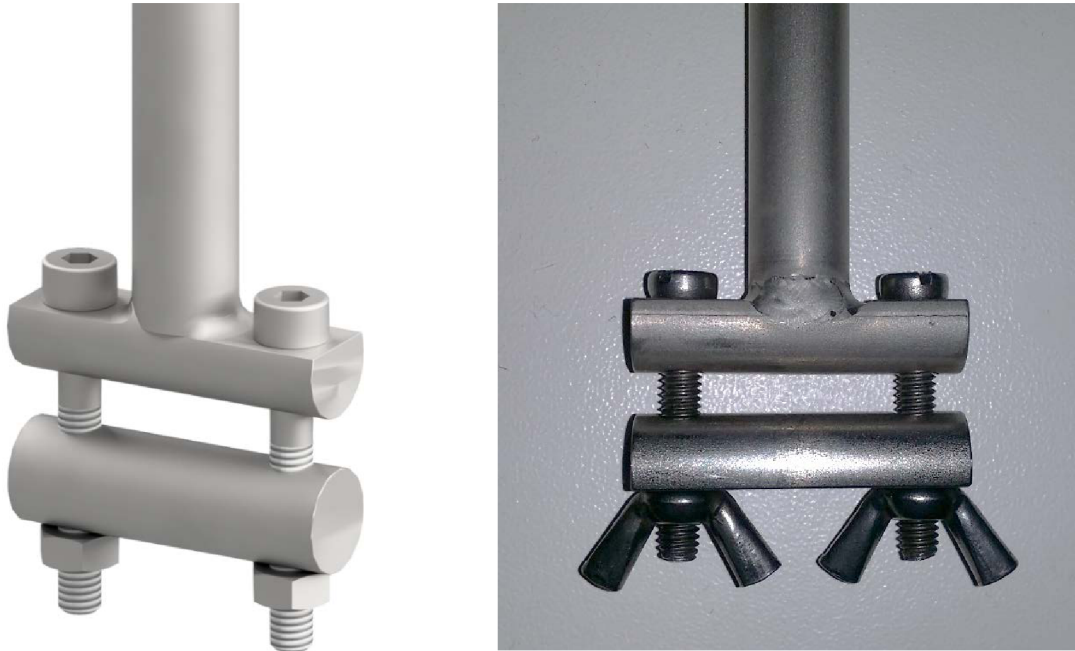
Obrázok 14 Meranie tvrdosti

5.2.5 VISKOELASTICITA

Stanovenie viskoelastických vlastností vzoriek, bolo do tejto práce zahrnuté nad rámec pôvodných cieľov. Zameranie bolo sústredené najmä na prípravu a vykonanie experimentu, matematický popis problému sa nerieši.

Experiment sa uskutočnil na univerzálnom stroji *ZWICK*. Mal simulovať zaťažovanie obojstranne votknutej vzorky, v strede jej dĺžky, v smere hrúbky. Vyčlenená bola jedna vzorka, ktorá nebola deproteinizovaná. Votknutie bolo realizované zaliatím koncov vzoriek do dvojzložkovej živice. Na začiatku boli pripravené papierové nádoby v tvare kvádra s odstránenou hornou stenou a malým otvorom v jednej z bočných stien, slúžiacim na vloženie vzorky. Vnútorne plochy nádobiek boli vystlané vrstvou hliníkovej fólie. Pripravené nádoby boli upevnené do klinovej čeľusti, tak aby medzi nimi zostalo miesto o niečo menšie ako bola dĺžka vzorky. Nádoby boli orientované veľkým otvorom nahor a malými otvormi k sebe. Ďalej nasledovalo pripevnenie špeciálne vyrobeného prípravku do stredu dĺžky vzorky. Ten mal

spostredkovať prenos sily z trhacieho stroja na vzorku. Prípravok bol navrhnutý tak, aby kontakt so vzorkou bol spostredkovaný valcovými plochami pre prevenciu vzniku koncentrácie napätia a aby bolo umožnené pevné upnutie vzorky do jeho konštrukcie. Celý prípravok bol vyrobený z ocelevej guľatiny a upínanie bolo riešené pomocou dvoch skrutiek a krídlových matic umožňujúcich jednoduché zatiahnutie skrutkového spoja.

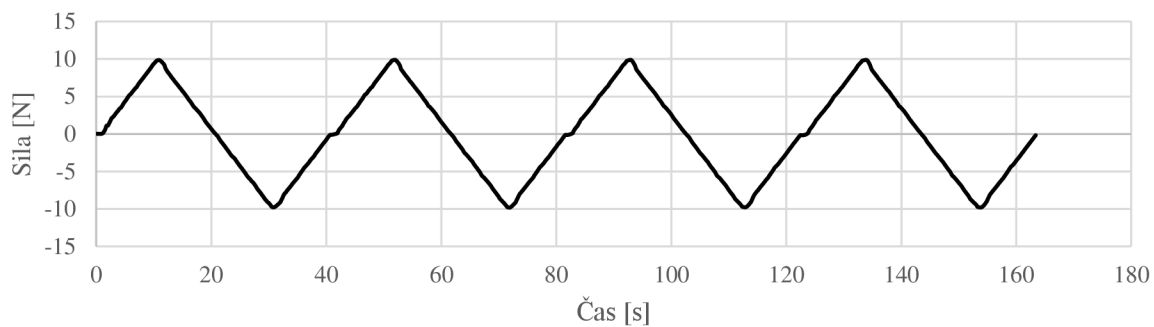


Obrázok 15 Zľava doprava: návrh prípravku; realizácia prípravku

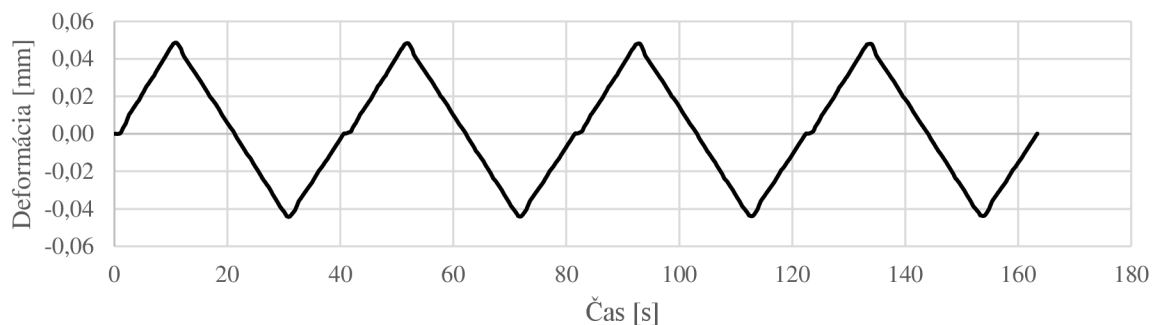
Do prípravku bola najskôr upevnená vzorka, ktorá bola vopred ponechaná vyschnúť niekoľko minút na vzduchu. Takto uchytená vzorka bola potom vložená do menších otvoroch v nádobkách. Ďalej bola koncová časť prípravku upevnená do hornej čeľusti trhacieho stroja. Vo výsledku bola vzdialenosť nádobiek 35,8 mm, pričom vzorka bola dlhá 48,9 mm. Následne bola pripravená živica *DURACRYL PLUS*, ktorou sa vyplnil priestor v nádobkách. Po jej vytvrdení sa kosť opäť zvlhčila a prebehlo samotné meranie. To bolo zložené zo štyroch zaťažovacích cyklov, dĺžky 40 s. Najskôr sa vykonalo zaťažovanie maximálnou silou 10 N, potom maximálnou deformáciou 0,05 mm.



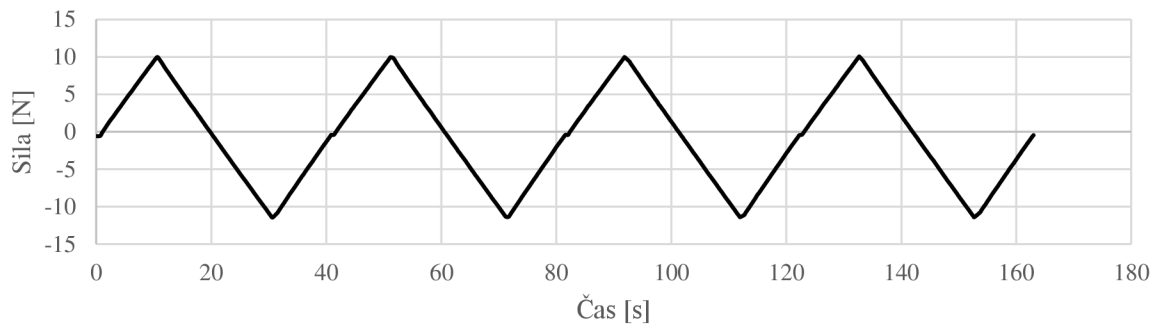
Obrázok 16 Realizácia obojstranného votknutia



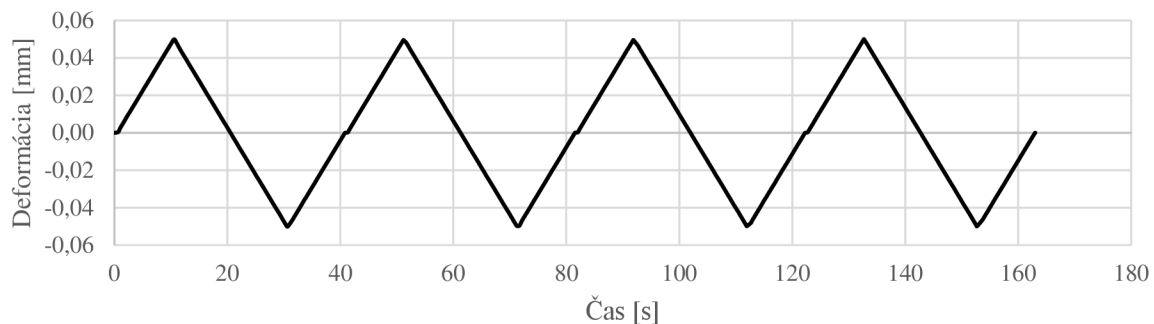
Graf 4 Priebek sily v čase, zaťažovanie maximálnou silou 10N



Graf 5 Priebek deformácie v čase, zaťažovanie maximálnou silou 10N



Graf 6 Priebek sily v čase, zaťažovanie maximálnou deformáciou 0,05 mm



Graf 7 Priebek deformácie v čase, zaťažovanie maximálnou deformáciou 0,05 mm

5.2.6 DEPROTEINIZÁCIA

Za účelom simulovania úbytku kolagénu boli vzorky deproteinizované v roztoku chlornanu draselného (NaClO). Pred samotnou deproteinizáciou bolo pripravených 400 ml roztoku zmiešaním 11% roztoku NaClO s vodou v pomere 1:1. Roztok bol rozdelený v rovnakom množstve do ôsmich nádob. Do nich bolo následne vložených 16 vzoriek, vždy po dva do jednej nádoby, tak aby sa zabránilo náhodnému zameneniu jednotlivých vzoriek. Po uplynutí 30 min boli vzorky otočené o 180° okolo pozdĺžnej osi, pre zabezpečenie rovnomerného účinku chlornanu. Celý proces deproteinizácie trval 60 min. Po ich uplynutí boli vzorky ihneď odstránené z roztoku a oplachované prúdom vody, po dobu niekoľkých sekúnd. Nakoniec boli umiestnené do mikroténových vreciek, napustených vodou. Počas deproteinizácie bol viditeľný mierny únik častíc z kostného tkaniva. Vo výsledku však vzorky vizuálne nezmenili tvar, rozmery a ani sfarbenie.



Obrázok 17 Vzorky pripravené na deproteinizáciu

6 VYHODNOTENIE MERANÍ

6.1 ŠTATISTICKÉ SPRACOVANIE

Výsledky meraní boli štatisticky spracované pomocou výpočtového programu *Minitab*. Po konzultácii s vedúcim práce boli zvolené nasledujúce štatistické metódy. Ako vstup analýzy boli uvažované namerané hodnoty pre každú vzorku. Analyzovaný bol rozdiel súborov dát. Najskôr bola testovaná normalita rozdelenia dát prostredníctvom „*Anderson-Darling*“ testu. Stanovené sú hypotézy testu, kde podľa H_0 dáta sledujú normálne rozdelenie a podľa H_1 nesledujú normálne rozdelenie. Platnosť hypotézy sa určuje pomocou p-hodnoty, ktorá je výstupom z testu normality dát a nadobúda hodnôt $<0,1>$. P-hodnota sa porovnáva s hladinou významnosti α , ktorá určuje hranicu, kedy nulovú hypotézu zamietame, alebo potvrdzujeme. V tejto práci je zvolená hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Pokiaľ je p-hodnota väčšia než definovaná α , hovoríme že testované hodnoty sledujú normálne rozdelenie, menšia p-hodnota hypotézu zamietá. Čím je p-hodnota väčšia, tým vyššia je pravdepodobnosť pravdivosti hypotézy. Následne boli veličiny rozdelené podľa kritéria splnenia, alebo nesplnenia normálneho rozdelenia.

Súbory dát boli ďalej porovnané pomocou párových testov. Pre dáta splňujúce normálne rozdelenie bol použitý parametrický test („*One-sample t-test*“), porovnávajúci priemerné hodnoty dát. Dáta nespĺňajúce normálne rozdelenie boli testované neparametrickým testom („*One-sample Wilcoxon test*“), porovnávajúcim mediány. Hypotézy boli formulované ako $H_0: \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 0$ a $H_1: \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \neq 0$. Výsledky testov (p-hodnoty) sú znovu porovnané s $\alpha = 0,05$. P-hodnoty väčšie než stanovená α zamietajú stanovenú hypotézu.

6.2 ANALÝZA A PREZENTÁCIA VÝSLEDKOV

Analýza výsledkov je zameraná na zmenu nameraných veličín po deproteinizácii vzoriek. Z pomedzi piatich nameraných veličín, vykazujú normálne rozdelenie hodnoty rozdielov hustoty, modulu pružnosti a tvrdosti, pre ktoré p-hodnota výrazne prekračuje zvolenú hladinu významnosti $\alpha = 0,05$. Nulovú hypotézu testu normality dát zamietame u nameraných dát rozdielov vlastnej frekvencie a pomerného útlmu.

Použité párové testy ukazujú, že štatisticky významné sú okrem hodnôt tvrdosti všetky namerané rozdiely, z čoho sa dá usúdiť, že rozdiel nie je spôsobený samotným rozptylom dát. P-hodnota vykonaných neparametrických testov rozdielov priemerov je pre obe veličiny rovná nule, pri parametrických testoch rozdielov mediánov je taktiež dostatočne menšia než stanovená hladina významnosti $\alpha = 0,05$, takže je stanovená hypotéza zamietnutá. Tabuľka 2 zhrňa výsledky analýzy. Stĺpec p (AD) znázorňuje výsledky „*Anderson-Darling*“ testu, stĺpec p (1T) výsledky „*One-sample t-testu*“, stĺpec p (1W) výsledky „*One-sample Wilcoxon*“ testu.

Tabuľka 2 P-hodnoty testu normality, One-sample t-testu a One-sample Wilcoxon testu

	p (AD)	p (1T)	p (1W)
$\Delta\rho$	0,528	0	
ΔE	0,321	0	
Δf	<0,005		0,007
Δb_p	0,021		0,011
Δ Tvrdošť HV	0,228	0,485	

Zmena veličín po deproteinizácii je vyčíslená v tabuľke 3. Namerané hodnoty sú zobrazené ako priemer všetkých hodnôt a sú doplnené o smerodajnú odchýlku. Zobrazený je aj rozdiel veličín a percentuálna zmena, kde kladná hodnota vyjadruje nárast veličiny a záporná jej pokles.

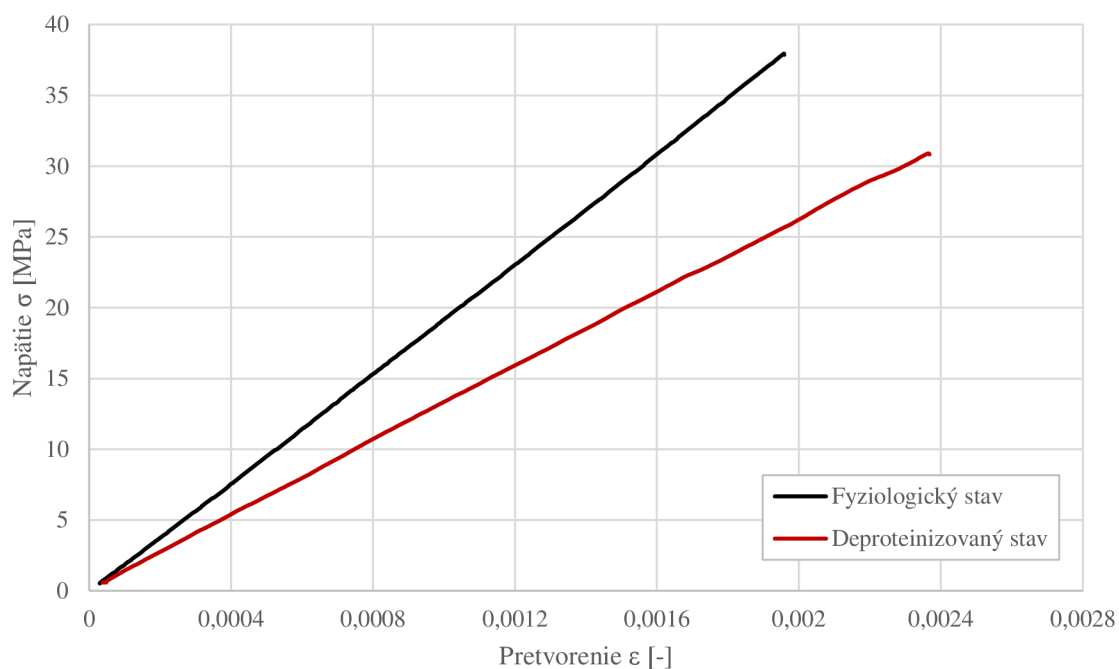
Tabuľka 3 Znáozornenie stredných hodnôt analyzovaných veličín

	Fyziologický stav		Deproteinizovaný stav		Δ [%]
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	
ρ [kg·m ⁻³]	1839	66	1793	65	-2,6
E [GPa]	22	3	15	5	-44,2
f [Hz]	532	79	553	81	3,8
b_p [-]	$2,98 \cdot 10^{-3}$	$0,49 \cdot 10^{-3}$	$2,98 \cdot 10^{-3}$	$2,67 \cdot 10^{-3}$	-11,8
Tvrdošť HV	334	57	342	29	2,3

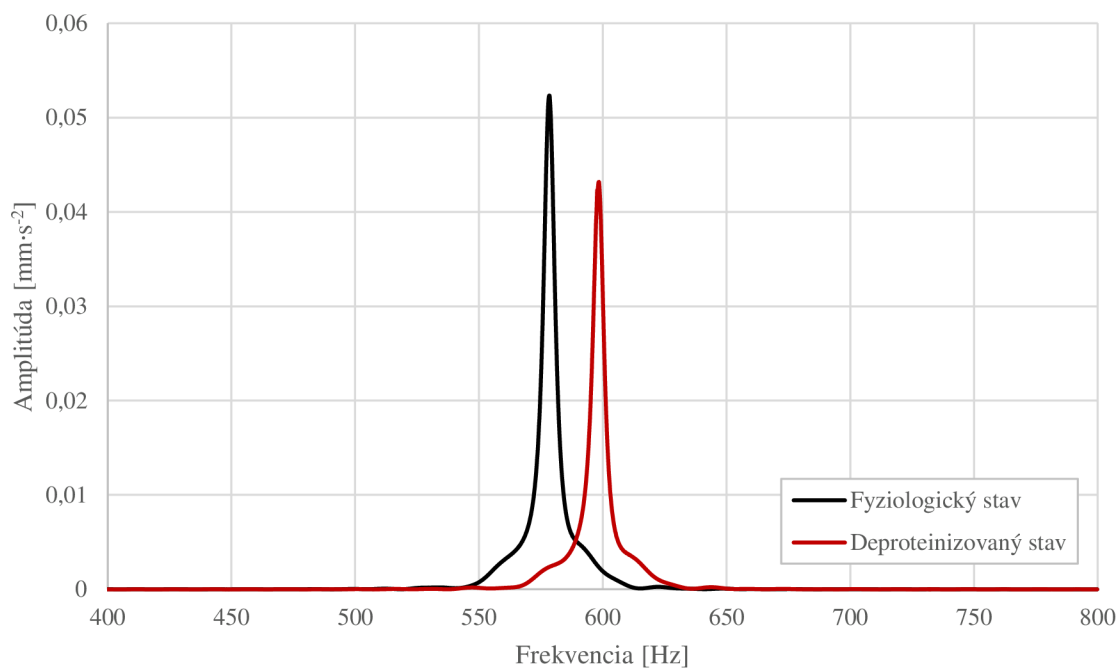
Z výsledkov je zrejmé, že najväčší rozdiel nastal v hodnotách modulu pružnosti, kde bol zaznamenaný pokles o 44 %. Významný 12% pokles nastal aj u pomerného útlmu. Zvyšné merania vykazujú už menšie zmeny. Zmena tvrdosti je vyčíslená, aj napriek tomu že nevykazuje štatistickú významnosť. Deproteinizácia kortikálnej kosti teda vyvolá štatisticky významný pokles modulu pružnosti, pomerného útlmu a hustoty a mierny nárast vlastnej frekvencie. Najvyššiu citlivosť na úbytok kolagénnej zložky vykazuje modul pružnosti.

Doplnkovo boli študované viskoelastické vlastnosti kortikálnej kosti. Cieľom bola príprava experimentu a následné meranie.

Graf 8 a graf 9 znázorňujú príklad výsledku z daných skúšok. V tabuľke 4 a tabuľke 5 sú uvedené výsledky meraní vo fyziologickom a deproteinizovanom stave u každej vzorky.



Graf 8 Vplyv deproteinizácie, závislosť napätia na pretvorení vzorky č. 3



Graf 9 Vplyv deproteinizácie, amplitúdo-frekvenčná charakteristika vzorky č. 16

Tabulka 4 Výsledky meraní pre fyziologický stav

Vzorka	ρ [kg.m ⁻³]	E [GPa]	f [Hz]	b_p [-]	Tvrdosť HV
1	1849	21	635	$2,60 \cdot 10^{-3}$	335
2	1896	24	480	$2,60 \cdot 10^{-3}$	282
3	1742	19	466	$2,90 \cdot 10^{-3}$	335
4	1891	23	570	$3,42 \cdot 10^{-3}$	307
5	1764	19	405	$2,78 \cdot 10^{-3}$	308
6	1789	19	501	$2,79 \cdot 10^{-3}$	361
7	1935	27	508	$2,85 \cdot 10^{-3}$	353
8	1793	18	540	$2,73 \cdot 10^{-3}$	335
9	1784	22	615	$3,17 \cdot 10^{-3}$	232
10	1825	21	413	$2,54 \cdot 10^{-3}$	431
11	1760	18	623	$3,21 \cdot 10^{-3}$	244
12	1937	26	522	$2,73 \cdot 10^{-3}$	341
13	1867	21	676	$4,54 \cdot 10^{-3}$	306
14	1780	21	513	$3,46 \cdot 10^{-3}$	369
15	1881	24	439	$2,62 \cdot 10^{-3}$	326
16	1832	19	577	$2,94 \cdot 10^{-3}$	458
17	1932	26	559	$2,82 \cdot 10^{-3}$	361

Tabulka 5 Výsledky meraní pre deproteinizovaný stav

Vzorka	ρ [kg.m-3]	E [GPa]	f [Hz]	b_p [-]	Tvrdoš HV
1	1806	21	646	$2,82 \cdot 10^{-3}$	335
2	1869	13	481	$2,76 \cdot 10^{-3}$	308
3	1689	13	533	$2,53 \cdot 10^{-3}$	348
4	1867	23	589	$2,59 \cdot 10^{-3}$	359
5	1717	8	409	$2,57 \cdot 10^{-3}$	315
6	1749	17	500	$2,60 \cdot 10^{-3}$	356
7	1894	17	515	$2,72 \cdot 10^{-3}$	307
8	1746	15	495	$2,73 \cdot 10^{-3}$	321
9	1755	13	633	$2,77 \cdot 10^{-3}$	346
10	1798	6	342	$27,39 \cdot 10^{-3}$	330
11	1759	19	635	$2,72 \cdot 10^{-3}$	352
12	1895	19	529	$2,46 \cdot 10^{-3}$	321
13	1837	37	687	$2,66 \cdot 10^{-3}$	361
14	1727	20	605	$2,64 \cdot 10^{-3}$	368
15	1805	10	444	$2,65 \cdot 10^{-3}$	328
16	1765	11	599	$2,80 \cdot 10^{-3}$	425

ZÁVER

Hlavným zameraním tejto práce bolo stanoviť mechanické vlastnosti kortikálnej kosti vo fyziologickom a deproteinizovanom stave, následné porovnanie výsledkov a stanovenie citlivosti na mieru úbytku kolagénnej zložky. Výsledky boli získané mechanickými skúškami na pripravených vzorkách kortikálnej kosti získaných z prasacích femurov. K vykonaniu niektorých meraní bola potrebná výroba špecializovaných prípravkov. Zo spracovaných výsledkov meraní je zrejmé že k štatisticky významnému ovplyvneniu analyzovaných dát nedošlo len u tvrdosti kosti, kde bol zaznamenaný nárast o 2 %. Modul pružnosti sa prejavil ako veličina najviac ovplyvnená deproteinizáciou, kde došlo k poklesu o 44 %. Výraznejší pokles zaznamenal aj pomerný útlm a to o 12 %. Hustota kosí klesla len mierne (3 %). Jediná veličina vykazujúca nárast je vlastná frekvencia, ktorá po deproteinizácii vzrastie o 4 %. Všetky ciele tejto práce boli splnené.

POUŽITÉ INFORMAČNÉ ZDROJE

- [1] ETHIER, C a Craig A SIMMONS. 2007. *Introductory biomechanics: from cells to organisms*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, xiii, 511 s. ISBN 978-0-521-84112-2.
- [2] GANONG, William F. c2005. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd. Praha: Galén, xx, 890 s. ISBN 80-726-2311-7.
- [3] AN, Yuehuei. 2000. *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. Boca Raton: CRC Press, 624 s. ISBN 08-493-0266-8.
- [4] *Bone Mechanics Handbook*. 2001. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1 sv. (různé stránkování),. ISBN 08-493-9117-2.
- [5] CHRISTOFORO, André Luis, Francisco Antonio Rocco LAHR, Elen Aparecida Martines MORALES, Túlio Hallak PANZERA a Paulo Henrique Ribeiro BORGES. 2012. Numerical Evaluation of Longitudinal Modulus of Elasticity of Eucalyptus grandis Timber Beams. *International Journal of Agriculture and Forestry*. Vol. 2, issue 4, s. 166-170.
- [6] VOSYNEK, P. Analýza odezvových veličin kostní tkáně při mechanickém zatěžování. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 98 s. Vedoucí dizertační práce Ing. Tomáš Návrát, Ph.D.
- [7] KRATOCHVÍL, Ctirad a Jaromír SLAVÍK. 2007. *Mechanika těles: dynamika*. Vyd. 4. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 227 s. ISBN 978-80-214-3446-2.
- [8] BILOŠOVÁ, Alena. 2012. *Aplikovaný mechanik jako součást týmu konstruktérů a vývojářů: studijní opora* [online]. Vyd. 1. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 1 DVD-ROM [cit. 2015-05-28]. ISBN 978-80-248-2758-2. Dostupné z: <http://projekty.fs.vsb.cz/147/ucebniopory/978-80-248-2758-2.pdf>