Eksperimentalno određivanje utjecaja krioprezervacije na mehanička svojstva svinjskih aorti

Pamuković, Frane

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:235:848957

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

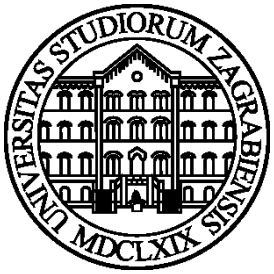
Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE

Frane Pamuković

EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE UTJECAJA KRIOPREZERVACIJE NA MEHANIČKA SVOJSTVA SVINJSKIH AORTI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET STROJARSTVA I BRODOGRADNJE

Frane Pamuković

EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE UTJECAJA KRIOPREZERVACIJE NA MEHANIČKA SVOJSTVA SVINJSKIH AORTI

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof. dr. sc. Janoš Kodvanj
dr. sc. Mirna Golemović, dipl. ing.

Zagreb, 2018.

UNIVERSITY OF ZAGREB

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING AND NAVAL ARCHITECTURE

Frane Pamuković

EXPERIMENTAL ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION ON THE MECHANICAL PROPERTIES OF PORCINE AORTA

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Prof. dr. sc. Janoš Kodvanj

dr. sc. Mirna Golemović, dipl. ing.

Zagreb, 2018.

Zahvala

Istraživanje opisano u ovoj disertaciji ne bi bilo moguće bez mojih mentora – prof. dr. sc. Janoša Kodvanja i dr. sc. Mirne Golemović. Već od početka ovog istraživanja, poslije nekoliko neformalnih sastanaka, bilo je jasno da će njihova potpora, savjeti i uloženi trud biti neprocjenjivi. Upravo iz tog razloga uspjeli smo svladati mnogobrojne izazove koji su nas čekali tijekom eksperimentalnih ispitivanja i na tomu sam im neizmjerno zahvalan.

Zahvale idu i zaposlenicima PIK Vrbovec mesne industrije Andriji Vrdoljaku, dipl. ing. te Dušku Ardaliću, dr. vet. med. čijom je zaslugom osiguran dovoljan broj kvalitetnih uzoraka bez kojih ovo ispitivanje ne bi bilo moguće.

Ne male zasluge ima i laborant Gordan Plačko koji je svojim specifičnim znanjima i vještinama pomogao u rješavanju nekih složenijih problema pri izradi eksperimentalnog postava.

Velika hvala i mojim kolegama u Laboratoriju za eksperimentalnu mehaniku – dr. sc. Martinu Surjaku i doc. dr. sc. Zvonimiru Tomičeviću koji su uvijek bili spremni pomoći, a svojom su osobnošću stvarali ugodnu radnu atmosferu u kojoj je bilo zadovoljstvo provoditi ovo istraživanje. Zahvalu dugujem i članovima komisije – prof. dr. sc. Tanji Jurčević Lulić i prof. dr. sc. Zdenku Tonkoviću te prof. dr. sc. Mladenu Petruniću iz Zavoda za vaskularnu kirurgiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb koji su svojim komentarima i sugestijama podignuli kvalitetu ovoga rada.

Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su ovo *putovanje* učinili gotovo bezbrižnim.

SADRŽAJ:

Sažetak i

Summary ii

Popis slika iii

Popis tablica ix

Popis oznaka xi

1. Uvod 1

1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja 2

1.2. Materijali, metodologija i plan istraživanja 5

1.3. Ciljevi, hipoteze i znanstveni doprinos rada 7

1.4. Struktura rada 8

2. Aorta 10

2.1. Građa tkiva aorte 11

2.2. Anatomska i fiziološka sličnost ljudske i svinjske aorte 15

2.3. Upotreba svinjskih modela u pretkliničkim ispitivanjima 19

2.3.1. Ispitivanje utjecaja mehaničkih svojstava na uspješnost kardiovaskularnog presatka 22

2.3.2. Ispitivanje utjecaja dugotrajne pohrane na mehanička svojstva aorte 25

3. Mehaničko ponašanje tkiva aorte 29

3.1. Kinematika kontinuuma 35

3.2. Tenzori naprezanja 40

3.3. Energija deformiranja 42

4. Materijalni modeli 43

4.1. Neo-Hooke 47

4.2. Mooney-Rivlin 48

4.3. Yeoh 49

4.4. Ogden 50

4.5. Druckerov kriterij stabilnosti ... 51
5. Metodologija ... 53
5.1. Korelacija digitalne slike ... 53
5.1.1. Kalibracija mjernog sustava ... 57
5.1.2. Mjerenje pomaka i deformacija ... 59
5.2. Krioprezervacija ... 63
5.2.1. Postupak krioprezervacije aorte ... 66
5.3. Statistička obrada rezultata ... 67
6. Eksperimentalno ispitivanje ... 69
6.1. Priprema ispitnih uzoraka ... 69
6.2. Mjerni uređaji i oprema ... 73
6.3. Jednoosni statički vlačni test ... 77
7. Rezultati ... 79
7.1. Rezultati eksperimentalnog ispitivanja ... 83
7.1.1. Uzdužni uzorci ... 83
- Jedan mjesec pohrane ... 83
- Četiri mjeseca pohrane ... 92
- Devet mjeseci pohrane ... 100
- Rasprava ... 107
7.1.2. Poprečni uzorci ... 111
- Jedan mjesec pohrane ... 111
- Četiri mjeseca pohrane ... 118
- Devet mjeseci pohrane ... 125
- Rasprava ... 132
7.2. Identifikacija parametara materijalnih modela ... 135
7.2.1. Uzdužni uzorci ... 135
7.2.2. Poprečni uzorci ... 141
- Rasprava ... 146
8. Zaključak ... 149
- Znanstveni doprinos ... 152
- Buduća istraživanja ... 153
LITERATURA ... 154

Sažetak

Mehanička svojstva krvnih žila smatraju se jednim od glavnih čimbenika dugotrajne uspješnosti kardiovaskularnih presadaka. Kako bi se omogućilo da u danom trenutku kirurzi imaju na raspolaganju presadak koji će dimenzijama i mehaničkim svojstvima što više odgovarati primatelju, potrebno je osigurati zalihu tkivnih presadaka različitih dimenzija i mehaničkih svojstava, no moraju biti odgovarajuće pohranjeni kako bi se do upotrebe očuvala njihova biomehanička svojstva. Dugotrajna pohrana krvnih žila postiže se postupkom krioprezervacije, odnosno zamrzavanjem tkiva na iznimno niske temperature (od -80 °C do -196 °C).

Tijekom ispitivanja utjecaja krioprezervacije na mehanička svojstva tkiva aorte, jednu skupinu uzoraka činit će svježi uzorci ispitani unutar šest sati od eksplantacije, a u drugim trima skupinama bit će uzorci uzeti od pripadajućih aorti pohranjenih procesom krioprezervacije u plinovitoj fazi tekućeg dušika na -155 °C u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC-a Zagreb, te odmrznuti nakon jednog, četiri i devet mjeseci.

Kako bi se odredila njihova mehanička svojstva, uzorci svinjskih aorti podvrgnut će se statičkom vlačnom testu u Laboratoriju za eksperimentalnu mehaniku, gdje će se metodom korelacije digitalne slike (engl. Digital image correlation) mjeriti cijelo polje pomaka. Ta optička metoda omogućuje beskontaktno mjerenje cijelog polja pomaka na površini uzorka, što će omogućiti bolji uvid u nelinearna mehanička svojstva aorte. Rezultati eksperimentalnih ispitivanja iskoristit će se za određivanje mehaničkih svojstava poput modula elastičnosti i vlačne čvrstoće, a upotrebom numeričkih metoda odredit će se hiperelastično mehaničko ponašanje aorte primjenom određenih konstitutivnih modela. Usporedbom rezultata svježih i odmrznutih uzoraka tkiva aorte odredit će se utjecaj krioprezervacije na mehanička njezina svojstva u zadanim vremenskim intervalima.

Ključne riječi: biomehanika, krioprezervacija, korelacija digitalne slike, aorta

Summary

The mechanical properties of blood vessels are recognized as one of the main factors of long-term success of cardiovascular grafts. In order to allow surgeons to have a graft that will meet the recipient's dimensions and mechanical properties at the given time, it is necessary to provide a set of tissue samples of different dimensions and mechanical properties, stored appropriately to preserve their biomechanical properties for later use. Long-term storage of blood vessels is achieved by cryopreservation, a process of freezing tissue at extremely low temperatures (-80 ° C to -196 ° C).

Fresh specimens will be tested within six hours of explantation, while the other sample taken from corresponding aorta will be cryopreserved and stored in the gaseous phase of liquid nitrogen at -155 ° C at the Clinical Institute for Transfusion Medicine and Transplant Biology, KBC Zagreb. Stored sample groups will be thawed and tested after one, four, and nine months respectively.

To determine their mechanical properties, samples of porcine aorta will be subjected to a static tensile test in the Experimental Mechanics Laboratory, whereby the Digital Image Correlation method will measure the whole displacement field. This optical method allows for contactless measurement of the entire field of displacement on the surface of the sample, which will give a better insight into the non-linear mechanical properties of the aorta. The results of the experimental tests will be used to determine the mechanical properties such as the modulus of elasticity and tensile strength, and using numerical methods the hyperelastic mechanical properties of the aorta will be determined as given by certain constitutive models. The analysis of the results obtained with fresh and thawed aorta samples will determine the effect of the cryopreservation procedure on the mechanical properties of the aorta.

Keywords: biomechanics, cryopreservation, digital image correlation, aorta

Popis slika

Slika 1. Anatomski položaj aorte u ljudskom tijelu [51] 10
Slika 2. Slojevi aorte s odgovarajućim konstituentima [59] 12
Slika 3. Histološko bojanje tkiva svinjske (lijevo) i ljudske (desno) aorte [86] 16
Slika 4. Udio strukturnih elemenata u zavisnosti o položaju unutar svinjske aorte [87] 17
Slika 5. Udio strukturnih elemenata u zavisnosti o položaju unutar ljudske aorte [87] .. 18
Slika 6. Debljina medialnog sloja aorte u zavisnosti o promjeru svinjske aorte [88] 18
Slika 7. Udio određenih životinjskih modela u objavljenim biomedicinskim istraživanjima u Europskoj Uniji [99] 20
Slika 8. Odnos tlaka i promjera za anastomozu, PTFE presadak i nativnu arteriju [122] 23
Slika 9. Podatljivost arterija, vena i umjetnih presadaka u odnosu na tlak unutar žile [2] 24
Slika 10. Krutost arterija, vena i umjetnih presadaka u odnosu na tlak unutar žile [2] ... 25
Slika 11. Mehaničko ponašanje svježe i odmrznute aorte u poprečnom smjeru [130] 27
Slika 12. Mehaničko ponašanje svježe i odmrznute aorte u uzdužnom smjeru [130] 28
Slika 13. Razlika mehaničkih svojstava uzdužnog i poprečnog smjera aorte [141] 30
Slika 14. Predkondicioniranje uzorka aorte 31
Slika 15. Utjecaj zaostalih naprezanja na slojeve aorte u uzdužnom i poprečnom smjeru [142] 32
Slika 16. Popuštanje tkiva aorte pri konstantnoj deformaciji 33
Slika 17. Puzanje tkiva aorte pri konstantnom opterećenju [145] 33
Slika 18. Tipični dijagram *deformacija-naprezanje* za meka tkiva [146] 34
Slika 19. Konfiguracija i pomak materijalnog tijela [147] 36
Slika 20. Polarno razlaganje tenzora gradijenta deformiranja [147] 38
Slika 21. Vektor naprezanja za referentnu i trenutnu konfiguraciju [147] 40
Slika 22. Neo-Hook i reducirani polinomski model (N = 2) pridruženi eksperimentalnim rezultatima 47
Slika 23. Mooney-Rivlin i polinomski model (N = 2) pridruženi eksperimentalnim rezultatima 49
Slika 24. Opisivanje eksperimentalnih rezultata Yeoh-ovim materijalnim modelom 50

Slika 25. Ogden (N = 1, 2, 3) materijalni modeli pridruženi eksperimentalnim rezultatima 51
Slika 26. Optički sustav Aramis za mjerenje pomaka DIC metodom (GOM GmbH, Njemačka) 54
Slika 27. Faseta veličine 15x15 s dva preklapajuća piksela [158] 55
Slika 28. Ovisnost mjerne nesigurnosti pomaka i deformacija o veličini fasete [159] 56
Slika 29. Kalibracija Aramis mjernog sustava [157] 57
Slika 30. Kalibracijski objekt [157] 58
Slika 31. Parametri Aramis mjernog sustava [158] 59
Slika 32. Epipolarna ravnina [160] 60
Slika 33. Faseta prije i nakon deformiranja [161] 61
Slika 34. Utjecaj brzine zamrzavanja na broj preživjelih stanica [162] 64
Slika 35. Uređaj za kontrolirano zamrzavanje Planer PLC, UK 65
Slika 36. Dio svinjske torakalne aorte iz kojeg je izdvojen ispitni uzorak 70
Slika 37. Izgled kalupa za izdvajanje uzorka iz ostatka tkiva aorte 71
Slika 38. Torakalni dio aorte nakon rezanja kalupom 71
Slika 39. Uzorak aorte izdvojen iz ostatka tkiva 72
Slika 40. Uzorak aorte s nanesenim rasterom za ispitivanje DIC metodom 73
Slika 41. Kidalica Beta 50-5 (Messphysik GmbH, Austrija) 74
Slika 42. Čeljusti kidalice sa sastavnim djelovima za ispitivanja inženjerskih materijala 75
Slika 43. Nove čeljusti s dinamičkim prihvatom uzorka pomoću opruge 76
Slika 44. Eksperimentalni postav za provedbu vlačnog ispitivanja 76
Slika 45. Uzorak aorte u čeljustima kidalice prilikom provedbe vlačnog testa 77
Slika 46. Uzorak u referentnoj (a) i deformiranoj konfiguraciji (b) 78
Slika 47. Dijagram *deformacija-naprezanje* s interpoliranim modulima elastičnosti 79
Slika 48. Polje deformacija svježeg poprečnog uzorka aorte dobiveno DIC metodom 81
Slika 49. Dijagram vrijednosti polja deformacija tijekom ispitivanja za poprečni svježi i uzorak odmrznut nakon mjesec dana pohrane 82
Slika 50. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih uzdužnih uzoraka aorte za pohranu u trajanju od mjesec dana 84
Slika 51. Dijagram *deformacija-naprezanje* uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon mjesec dana pohrane 85

Slika 52. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno) 87
Slika 53. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno) 87
Slika 54. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće uzdužnih svježih (lijevo) i uzoraka odmrznutih nakon mjesec dana pohrane (desno) 88
Slika 55. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon mjesec dana (b) 89
Slika 56. Porast polja deformacije prilikom eksperimentalnog ispitivanja 90
Slika 57. Slika uzorka prije samog pucanja (a) te uzorak nakon pucanja (b) 91
Slika 58. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane 92
Slika 59. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih uzdužnih uzoraka aorte za pohranu od četiri mjeseca 93
Slika 60. Dijagram *deformacija-naprezanje* uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon četiri mjeseca pohrane 94
Slika 61. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno) 96
Slika 62. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno) 97
Slika 63. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno) 97
Slika 64. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon četiri mjeseca (b) 98
Slika 65. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za uzdužne svježe i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane 99
Slika 66. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih uzdužnih uzoraka aorte za pohranu od devet mjeseci 100
Slika 67. Dijagram *deformacija-naprezanje* uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon devet mjeseci pohrane 102
Slika 68. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno) 103

Slika 69. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno) 104
Slika 70. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno) 104
Slika 71. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon devet mjeseci (b) 105
Slika 72. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane 106
Slika 73. Vrijednosti modula elastičnosti E_1 za uzdužni smjer aorte za sve skupine uzoraka 107
Slika 74. Vrijednosti modula elastičnosti E_2 za uzdužni smjer aorte za sve skupine uzoraka 108
Slika 75. Vrijednosti vlačne čvrstoće R_m za uzdužni smjer aorte za sve skupine uzoraka 109
Slika 76. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od mjesec dana 111
Slika 77. Dijagram *deformacija-naprezanje* poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon mjesec dana pohrane 113
Slika 78. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno) 114
Slika 79. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno) 115
Slika 80. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno) 115
Slika 81. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon mjesec dana (b) 116
Slika 82. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i uzorke odmrznute nakon mjesec dana 117
Slika 83. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od četiri mjeseca 118
Slika 84. Dijagram *deformacija-naprezanje* poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon četiri mjeseca pohrane 120

Slika 85. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno) 121
Slika 86. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno) 122
Slika 87. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno) 122
Slika 88. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon četiri mjeseca (b) 123
Slika 89. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane 124
Slika 90. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od devet mjeseci 125
Slika 91. Dijagram *deformacija-naprezanje* poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon devet mjeseci pohrane 127
Slika 92. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno) 128
Slika 93. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno) 129
Slika 94. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno) 129
Slika 95. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon devet mjeseci (b) 130
Slika 96. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i odmrznute uzorke 131
Slika 97. Vrijednosti modula elastičnosti E_1 u poprečnom smjeru aorte za sve skupine uzoraka 132
Slika 98. Vrijednosti modula elastičnosti E_2 za poprečni smjer aorte za sve skupine uzoraka 133
Slika 99. Vrijednosti vlačne čvrstoće R_m za poprečni smjer aorte za sve skupine uzoraka 134
Slika 100. Konstitutivni modeli za svježe uzdužne uzorke aorte 135
Slika 101. Konstitutivni modeli za uzdužne uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane 137

Slika 102. Konstitutivni modeli za uzdužne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane 138
Slika 103. Konstitutivni modeli za uzdužne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane 139
Slika 104. Konstitutivni modeli za svježe poprečne uzorke aorte 141
Slika 105. Konstitutivni modeli za poprečne uzorke odmrznute nakon mjesec dana 142
Slika 106. Konstitutivni modeli za poprečne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane 143
Slika 107. Konstitutivni modeli za poprečne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane 144

Popis tablica

Tablica 1. Raspon najznačajnijih hemodinamskih parametara kod ljudi i svinja [85]..... 16
Tablica 2. Hemodinamski parametri zdrave aorte te proksimalnog i distalnog presatka [125] 24
Tablica 3. Mehanička svojstva u aksijalnom smjeru svježe i aorti odmrznutih nakon 1, 2 i 4 mjeseca [49] 26
Tablica 4. Dimenzije ispitnih uzoraka 72
Tablica 5. Rezultati ispitivanja svježih uzdužnih uzoraka za pohranu na mjesec dana.... 84
Tablica 6. Rezultati ispitivanja uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon mjesec dana pohrane 86
Tablica 7. Rezultati ispitivanja svježih uzdužnih uzoraka za pohranu od četiri mjeseca 93
Tablica 8. Rezultati ispitivanja uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon četiri mjeseca pohrane 95
Tablica 9. Rezultati ispitivanja svježih uzdužnih uzoraka za pohranu od devet mjeseci 101
Tablica 10. Rezultati ispitivanja uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon devet mjeseci pohrane 102
Tablica 11. Rezultati ispitivanja svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od mjesec dana 112
Tablica 12. Rezultati ispitivanja poprečnih uzoraka odmrznutih nakon mjesec dana pohrane 113
Tablica 13. Rezultati ispitivanja svježih-poprečnih uzoraka aorte za pohranu od četiri mjeseca 119
Tablica 14. Rezultati ispitivanja poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon četiri mjeseca 120
Tablica 15. Rezultati ispitivanja svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od devet mjeseci 126
Tablica 16. Rezultati ispitivanja poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon devet mjeseci 127
Tablica 17. Koeficijenti materijalnih modela za uzdužne svježe uzorke aorte 136

Tablica 18. Koeficijenti materijalnih modela za uzdužne uzorke odmrznute nakon mjesec dana 137
Tablica 19. Koeficijenti materijalnih modela za uzdužne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca 138
Tablica 20. Koeficijenti materijalnih modela za uzdužne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci 139
Tablica 21. Koeficijenti materijalnih modela za poprečne svježe uzorke aorte 141
Tablica 22. Koeficijenti materijalnih modela za poprečne uzorke odmrznute nakon mjesec dana 143
Tablica 23. Koeficijenti materijalnih modela za poprečne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca 144
Tablica 24. Koeficijenti materijalnih modela za poprečne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci 145

Popis oznaka

$\mathbf{F}$	tenzor gradijenta deformiranja
$\mathbf{R}$	tenzor zakreta
$\mathbf{U}$	desni (materijalni) tenzor izduženja
$\mathbf{v}$	lijevi (prostorni) tenzor izduženja
$\mathbf{C}$	desni Cauchy-Greenov tenzor deformiranosti
$\mathbf{E}$	Green-Lagrangeov tenzor deformacije
$\boldsymbol{\lambda}_i$	glavna istezanja - svojstvene vrijednosti tenzora $\mathbf{C}$
$\mathbf{t}$	Cauchyjev vektor naprezanja
$\boldsymbol{\sigma}$	Cauchyjev tenzor naprezanja
$\mathbf{T}$	prvi Piola-Kirchhoffov vektor naprezanja
$\mathbf{P}$	prvi Piola-Kirchhoffov tenzor naprezanja
$\mathbf{S}$	drugi Piola-Kirchhoffov tenzor naprezanja
$\boldsymbol{\tau}$	Kirchhoffov tenzor naprezanja
J	Jacobijeva determinanta
W	energija deformiranja
ψ	Helmholtzova slobodna energija
w	snaga naprezanja
x, y	koordinate točke u referentnoj (početnoj) konfiguraciji
x', y'	koordinate točke u deformiranoj (trenutnoj) konfiguraciji
C	korelacijski koeficijent
E_{ing}	inženjerska deformacija
L_o	početna duljina uzorka
l	trenutna duljina uzorka

d_0	početna širina uzorka
d	trenutna širina uzorka
A_o	početna površina poprečnog presjeka
A	trenutna površina poprečnog presjeka
F	trenutna sila narinuta na uzorak
R^2	koeficijent determinacije
E_1	modul elastičnosti tkiva aorte pri malim deformacijama
E_2	modul elastičnosti tkiva aorte pri velikim deformacijama
R_m	vlačna čvrstoća tkiva aorte

1. Uvod

Mehanička svojstva krvne žile u funkciji kardiovaskularnog presatka prepoznata su kao jedan od glavnih čimbenika koji utječu na ishod transplantacije [1] [2] [3] . Povećana krutost velikih aorti povezuje se, među ostalim, i s aterosklerozom [4] [5], hipertenzijom [6] [7] i dijabetesom [8] [9] te predstavlja iznimno važan faktor prilikom kardiovaskularnih događaja poput srčanog udara [10] [11] [12]. Idealni vaskularni presadak trebao bi, tokom što dužeg vremenskog perioda, imati veliku protočnost ali i nisku stopu dezintegracije. Idealna situacija bi bila ona u kojoj bi kirurg u trenutku potrebe za kirurškom intervencijom koja uključuje ugradnju presatka na raspolaganju imao mogućnost izbora između više presadaka različitih dimenzija i svojstava [13]. U namjeri postizanja što boljeg ishoda kirurške ugradnje vaskularnih presadaka i dugotrajnog oporavka bolesnika neophodno je prikupiti saznanja o mehaničkom ponašanju aorte koja su danas u znanstvenoj literaturi još uvijek dosta oskudna.

Kako bi se osigurala dostupnost raznovrsnih vaskularnih presadaka nužno je buduće presatke dugotrajno pohraniti. U ovom radu dio uzoraka svinjskih aorti bit će pohranjen postupkom krioprezervacije u Kardiovaskularnoj banci u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu. Krioprezervacija je postupak zamrzavanja tkiva ili stanica na vrlo niske temperature uz dodatak krioprotektivnih agensa koji prilikom postupnog snižavanja temperature sprječavaju nastajanje kristalića leda i tako čuvaju tkivo od oštećenja o čemu će više biti rečeno u poglavlju 5.2.

Mehaničko ponašanje krvnih žila pri velikim deformacijama, eksperimentalno ispitivano jednoosnim i dvoosnim statičkim vlačnim testovima, dokazano je nelinearno te anizotropno [14] [15] [16]. Veoma je malo eksperimentalnih podataka o mehaničkom ponašanju ljudskih aorti [14] [17]. Zbog slabije dostupnosti, ali i zakonskih ograničenja, češće se u biomehaničkim ispitivanjima koriste svinjske aorte zbog svoje anatomske sličnosti s ljudskim aortama te sličnih hemodinamskih svojstava, među ostalim, krvnog tlaka, broja otkucaja te minutnog volumena (eng. *cardiac output*) [18] [19] [20] detaljniji opis ovih sličnosti dan je u poglavlju 2.2. Anatomska i fiziološka sličnost ljudske i svinjske aorte.

Cilj ovog rada je eksperimentalnim ispitivanjima odrediti utjecaj dugotrajne pohrane svinjske aorte u krioprezerviranom stanju na njena mehanička svojstva. U tu svrhu jednoosni statički vlačni test provest će se sa svježim uzorcima kao i s onima koji su odmrznuti nakon jednog, četiri i devet mjeseci pohrane u tekućem dušiku. Optičkom metodom korelacije digitalne slike (DIC) mjerit će se cijelo polje pomaka na površini uzorka aorte kako bi se kvalitetnije opisao odnos naprezanja i deformacija u tkivu aorte te stekao bolji uvid u njena nelinearna mehanička svojstva. Rezultati ispitivanja; modul elastičnosti i vlačna čvrstoća za uzdužni i poprečni smjer svježe i odmrznute aorte dat će uvid u utjecaj dugotrajne pohrane tkiva aorte na njena mehanička svojstva. Eksperimentalni rezultati poslužit će i za validaciju konstitutivnih modela koji opisuju nelinearni mehanički odziv aorte.

1.1. Pregled dosadašnjih istraživanja

Pregled dosadašnjih istraživanja podijeljen je u dva dijela. U prvom dijelu dane su trenutne spoznaje o mehaničkim svojstvima aorte dobivene eksperimentalnim ispitivanjima dok će se drugi dio osvrnuti na dosadašnja saznanja o utjecaju krioprezervacije na spomenuta mehanička svojstva.

Iako je ponašanje bioloških tkiva podvrgnutih velikim deformacijama još sredinom 19. stoljeća prepoznato kao nelinearno i pseudoelastično [17], teorijsku pozadinu mehaničkoga ponašanja mekih bioloških tkiva, kakva je i aorta, postavio je početkom 1980-ih godina "otac moderne biomehanike" Yuan-Cheng Fung [21] [22] [23]. Upravo tih godina počinje se značajno razvijati područje biomehanike čiji napredak ne jenjava ni danas zahvaljujući novim tehnologijama koje omogućavaju sve bolji uvid u mehaničko ponašanje bioloških tkiva. Fung je promatrao termodinamičku pozadinu elastičnih deformacija te identificirao dva uzroka elastičnosti nekog materijala - jedan je povezan s promjenom unutarnje energije tijekom procesa deformiranja, a drugi s promjenom entropije. Ove osnovne pretpostavke temeljene na mehanici kontinuuma testirao je jednoosnim vlačnim testovima na mekim tkivima što je dovelo do razvoja kvazi-linearne viskoelastičnosti [22] [24], modela koji se uz konstantna unapređenja koristi i danas u razvoju fenomenoloških konstitutivnih relacija (modela). Bitno je naglasiti da

fenomenološki konstitutivni modeli ne opisuju sam materijal niti pokušavaju povezati mehanički odziv sa svojstvima promatranog tkiva već samo njegovo ponašanje pod određenim opterećenjem [24] što je bitno drugačije od potpunog opisa ponašanja materijala pod općenitim stanjem naprezanja. Sva dosadašnja ispitivanja prepoznala su nelinearna anizotropna viskoelastična svojstva aorti [14] [15] [21] [22] [23] kao njena stvarna *in-vivo* svojstva.

Mehanička svojstva kakva su do sada istraživana proizlaze gotovo isključivo iz svojstava vlakana elastina i kolagena dok utjecaj glatkih mišića još nije do kraja određen [24] [25]. Većina konstitutivnih modela temelji se na fenomenološkom pristupu koji opisuje aortu kao makroskopski sustav. Nadalje, mnogi od ovih modela razvijeni su tako da prikažu ponašanje aorte u fiziološkom rasponu naprezanja te su u tom smislu uspješni u predviđanju mehaničkog odziva aorte što je dokazano mnogim eksperimentalnim rezultatima koji su uspjeli opisati ponašanje aorte u skladu s određenim konstitutivnim modelima, iako odabir najboljeg modela u literaturi još uvijek nije usuglašen [26] [27] [28] [29] [30].

Mehanički odziv aorte dobiven jednoosnim i dvoosnim statičkim vlačnim testovima, a prikazan odnosom naprezanje-deformacija, izrazito je nelinearan te za njegov opis više nije prikladan Hookeov zakon [31]. Kako bi se smanjila kompleksnost matematičkih izraza u konstitutivnim jednadžbama, tijekom posljednjih 30-ak godina razvijeni su fenomenološki konstitutivni modeli temeljeni na eksperimentalnim ispitivanjima mehaničkoga ponašanja uzoraka gume [32] [33]. Temelji ove pretpostavke mogu se naći kod Funga [22] koji je u svom radu predložio eksponencijalnu funkciju energije deformiranja validirajući je rezultatima jednoosnog statičkog vlačnog testa na uzorcima gume kao hiperelastičnog materijala. Kako se volumen tkiva arterije, pa tako i aorte, ne mijenja unutar njihovog fiziološkog raspona deformacija [34] može ih se smatrati nestlačivima te se na taj način mehanička svojstva trodimenzionalnog tijela mogu odrediti iz dvodimenzionalnih testova [35]. Iako uz ograničenja, jednoosni vlačni testovi na uzorcima krvnih žila pružaju osnovni uvid u mehaničko ponašanje materijala te dobro opisuju uzdužno istezanje krvnih žila promatranih kao tankostjene (ili debelostjene) kružne cijevi [14] [15] [36] [37]. Jednoosni i dvoosni statički vlačni testovi i dalje se koriste za opisivanje anizotropnih svojstava aorte dok metodološki aspekti još uvijek nisu usuglašeni niti standardizirani [15] [38] [39] [40].

U novije vrijeme jednoosni i dvoosni vlačni testovi uparuju se sa sustavima za beskontaktno mjerenje cijelog polja pomaka testiranih uzoraka, temeljeni na korelaciji digitalne slike (DIC). Ovom metodom moguće je pratiti pomake velikog broja točaka na površini uzorka čime se postiže dublji uvid u ponašanje materijala te se omogućava precizniji izračun polja deformacija [41] [42] [43]. DIC metoda temelji se na setu digitalnih fotografija uzorka tijekom procesa deformiranja od nedeformiranog (referentnog) do deformiranog stanja. Procesom kalibracije povezuju se dimenzije mjerenih uzoraka u milimetrima s brojem piksela potrebnih da prikažu taj uzorak na digitalnoj slici, čime se postiže prostorna korelacija (eng. *spatial correlation*). Slike su podijeljene u manje dijelove tzv. fasete koje DIC algoritam prati između referentnog i deformiranog stanja [42] [43] što rezultira cijelim poljem pomaka na površini mjerenog uzorka. Detaljniji opis DIC metode dan je u poglavlju Korelacija digitalne slike

Teorijska pozadina pohranjivanja bioloških tkiva u krioprezerviranom stanju opisana je još 1950-ih godina [44] kada je ustanovljeno kako je osmotsko naprezanje, nastalo uslijed velikog gradijenta otopljenih tvari unutar i izvan eritrocita, glavni krivac za raspad crvenih krvnih stanica pri pohrani na niskim temperaturama. Krajem istog desetljeća počinje se s krioprezervacijom ljudskih stanica[45], a daljnji napredak razvoja kriobiologije doveo je i do prvih primjena postupka krioprezervacije sa svrhom dugotrajne pohrane kardiovaskularnih tkiva krajem '80-tih godina. Do danas su postupci krioprezervacije validirani i implementirani u raznim bankama tkiva i stanica diljem svijeta. Metodologija i proces krioprezervacije danas su u velikoj mjeri standardizirani (više u poglavlju 5.2) i kardiovaskularne banke prolaze sustav evaluacije kako bi se osigurala kvaliteta i standard pohrane tkiva. Banka kardiovaskularnog tkiva pri Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb, jedna je od takvih banaka. Stoga, metoda krioprezervacije kao takva nije predmet istraživanja već će se razmatrati samo njen utjecaj na mehanička svojstva pohranjenog tkiva.

Većina dosadašnjih biomehaničkih istraživanja usredotočilo se na utjecaj kratkotrajnog zamrzavanja, najdulje do tri tjedna [46] [47] [48], dok su u samo jednom radu prikazani rezultati mehaničkih ispitivanja na aortama krioprezerviranim na dulji period (od 2 do 4 mjeseca) [49]. Utjecaj dugotrajne pohrane aorti u kriogenoj fazi na njena mehanička svojstva nije dovoljno istražen. Do sada su u tim ispitivanjima korištena

pojednostavljenja poput linearne elastičnosti i homogenosti tkiva aorte [38] [39] što je otežalo određivanje promjene mehaničkih svojstava uslijed krioprezervacije [46] [49], čijem će razumijevanju ovo istraživanje pridonijeti.

1.2. Materijali, metodologija i plan istraživanja

Svinjske aorte donirat će PIK Vrbovec – Mesna industrija d.d. od svinja iz istog tova, starih 6 mjeseci, te će se svježi uzorci ispitati unutar šest sati od eksplantacije dok će se ostali uzorci unutar šest sati od eksplantacije pohraniti postupkom krioprezervacije u Banci kardiovaskularnog tkiva u KBC-u Zagreb. Uzorci će se uzimati u uzdužnom i poprečnom smjeru žile. Dimenzije uzorka, oblika klasične epruvete za vlačna ispitivanja, bit će 50x5 mm za uzorke u uzdužnom smjeru aorte te 20x4 mm za uzorke u poprečnom smjeru aorte, a standardizirat će se izradom noža-kalupa za izdvajanje uzorka iz ostatka tkiva čime će se dobiti na jednoličnosti geometrije svih testiranih uzoraka. Iz jedne aorte izdvojit će se po dva uzorka pri čemu će se jedan uzorak ispitati unutar šest sati od eksplantacije, a drugi nakon odmrzavanja iz kriogene faze nakon pohrane u trajanju od jednog, četiri te devet mjeseci, zavisno o skupini uzoraka.

Tako pripremljeni uzorci ispitat će se jednoosnim statičkim vlačnim testom na kidalici (eng. *universal testing machine*) Messphysik Beta 50-5 (Messphysik Materials Testing GmbH, Austrija) u Laboratoriju za eksperimentalnu mehaniku na Fakultetu strojarstva i brodogradnje, Sveučilišta u Zagrebu. Prihvat uzorka u čeljustima uređaja prilagodit će se njegovim viskoelastičnim svojstvima na način da će se napraviti prihvat s progresivnim opterećenjem koji će osigurati dostatnu silu tijekom testa, kako ne bi došlo do izvlačenja uzorka iz prihvata prilikom izvođenja testa. Svježi uzorci, kao i odmrznuti, tijekom testa će biti ovlaživani fiziološkom otopinom. Prije ispitivanja provest će se predkondicioniranje, koje se sastoji od nekoliko ciklusa opterećenja-rasterećenja uzorka, kako bi se postigla inicijalna orijentacija vlakana u smjeru opterećenja te uklonila posljedica zaostalih naprezanja. Nakon predkondicioniranja uzorci će se opteretiti brzinom od 10 mm/min do pucanja, pri čemu se sila i pomak mjere kontinuirano.

Tijekom eksperimenta uzorak će se snimati mjernim sustavom Aramis (GOM GmbH, Njemačka) temeljenim na metodi korelacije digitalne slike (DIC), koji omogućava

dobivanje cijelog polja pomaka na površini uzorka. Ovo će omogućiti bolji uvid u nelinearna svojstva tkiva aorti. Metoda korelacije digitalne slike sastoji se od niza slika uzorka tijekom procesa deformiranja od neopterećenog (referentnog) do deformiranog stanja. Sustav se sastoji od dvije CCD kamere u stereoparu što omogućava 3D rekonstrukciju geometrije. CCD kamere (eng. *charge coupled device*) omogućavaju digitalni zapis slike kao matrice vrijednosti gradijenta sive skale. Uzorci se stoga prije testiranja pripremaju tako da im se na površini napravi stohastički raster tako da se prvo nanese bijela boja i na nju stohastički raspodijeljene crne točkice. Slike se zatim dijele na manje dijelove tzv. fasete, najčešće 15x15 piksela, te im DIC algoritam dodjeljuje prosječnu vrijednost sive skale u toj faseti, ovaj podatak se zatim prati u naknadnim slikama što daje pomake svih faseta odnosno velikog broja točaka na površini uzorka. Fasete se preklapaju u određenoj mjeri što omogućava zadovoljavanje uvjeta kontinuiranosti pomaka.

U programskom paketu Abaqus 6.14-5 (Dassault Systemes, USA) eksperimentalni rezultati poslužit će za validaciju fenomenoloških konstitutivnih modela temeljenih na energiji deformiranja (eng. *strain energy density function*). Na ovaj način odabrat će se model koji najbolje opisuje nelinearna svojstva aorte kao hiperelastičnog materijala.

Dio uzoraka aorti bit će zamrznut prema validiranom protokolu Banke kardiovaskularnog tkiva. Svaki uzorak aorte bit će uronjen u krioprotektivnu otopinu sastavljenu od 10% dimetilsulfoksida (DMSO) u TCM199 mediju pohranjen u zavarenuvrećicu za zamrzavanje tkiva. Vrećica s tkivom se zatim stavlja u vanjsku aluminijsku vrećicu koja se potom zavari. Tkivo upakirnano na opisan način se dalje inkubira na 4 °C tijekom 30 minuta kako bi se omogućilo prodiranje DMSO-a u tkivo. Proces zamrzavanja vršit će se u uređaju za kontrolirano zamrzavanje KRYO560-16 (Planer PLC, UK). Brzina hlađenja je -1 °C/min dok se ne dostigne -40 °C, a nakon toga -5 °C/min do -100 °C. Nakon dostizanja -100 °C tkivo se prebacuje u spremnik za pohranu u plinovitoj fazi tekućeg dušika na temperaturi -155 °C. Nakon jednog, četiri, odnosno devet mjeseci, uzorci će biti odmrznuti postupkom koji uključuje nekoliko koraka grijanja u vodenim kupeljima (37 – 40 °C) te ispiranje tkiva od krioprotektivne otopine. Odmrznuti uzorci se zatim pohranjuju u ohlađenu fiziološku otopinu i ispituju unutar tri sata u Laboratoriju za eksperimentalnu mehaniku.

Kako bi se utvrdila statistička signifikantnost rezultata, odnosno utjecaj krioprezervacije na mehanička svojstva aorti, provest će se statistički testovi (t-test te analiza varijance – ANOVA) kao i analiza reziduala eksperimentalnih rezultata. Statistička obrada kao i analiza reziduala eksperimentalnih rezultata obavit će se u programskom paketu Matlab R2013b (Mathworks, USA). Valja još jednom naglasiti kako konstitutivni modeli koji će se koristiti, ali i općenito, ne opisuju svojstva samog materijala već samo njegovo ponašanje pod određenim uvjetima opterećenja. U tom smislu, u ovom istraživanju ispitivat će se mehanički odziv aorte u uzdužnom i poprečnom smjeru.

1.3. Ciljevi, hipoteze i znanstveni doprinos rada

Cilj istraživanja:

- odrediti utjecaj dugotrajne pohrane tkiva aorte u plinovitoj fazi tekućeg dušika na njena mehanička svojstva,
- temeljem eksperimentalnih rezultata odrediti konstitutivni model koji najbolje opisuje mehaničko ponašanje tkiva aorte,
- DIC metodom utvrditi nelinearni mehanički odziv tkiva aorte.

Hipoteze istraživanja:

- korištenjem DIC mjerne metode može se dobiti uvid u nelinearno mehaničko ponašanje uzoraka aorte mjerenjem cijelog polja pomaka,
- dugotrajna pohrana uzoraka u kriogenoj fazi utječe na mehanička svojstva svinjskih aorti.

Znanstveni doprinos:

I Određivanje utjecaja krioprezervacije na mehanička svojstva svinjske aorte

II Upotrebom DIC metode dobit će se bolji uvid u nelinearno ponašanje tkiva aorte

1.4. Struktura rada

U prvom od osam poglavlja ovog rada opisana je motivacija za istraživanje kao i pregled dosadašnjih istraživanja mehaničkih svojstava zamrznutih aorti. U ovom poglavlju naznačen je manjak istraživanja te nedostaci identificirani u ovim istraživanjima, prije svega praćenje pomaka samo jedne točke uzorka za razliku od praćenja punog polja pomaka na površini uzorka provedenog u ovom istraživanju upotrebom metodom korelacije digitalne slike (DIC). Također ovdje su ukratko opisani i materijali i metode korišteni u ovom istraživanju, a koji su detaljnije opisani u poglavljima 5 i 6. U ovom poglavlju dani su još i ciljevi, hipoteze te znanstveni doprinos provedenog istraživanja.

Drugo poglavlje bavi se samom aortom te počinje opisom njene funkcije i anatomske pozicije u ljudskom tijelu, a opširnije je opisana građa tkiva aorte. Kako su ispitni uzorci uzeti iz svinja, u nastavku drugog poglavlja dan je pregled anatomskih i fizioloških sličnosti između ljudskih i svinjskih aorti zbog kojih su svinje životinje od izbora pri ovakvim ispitivanjima. Poglavlje završava pregledom dosadašnjih istraživanja u kojima su proučavana mehanička svojstva i utjecaj dugotrajne pohrane na svinjske aorte.

U trećem poglavlju dana je teoretska pozadina mehanike kontinuuma kojom se opisuje gibanje, a posljedično i deformacija tkiva aorte. Također, opisani su i tenzori naprezanja kojim se opisuje opterećenje uzorka tijekom testa te energija deformiranja potrebna za razvoj materijalnih modela.

Na početku četvrtog poglavlja opisana je veza između energije deformiranja te naprezanja i deformacije tijekom eksperimentalnog ispitivanja. Nakon toga opisani su općeniti materijalni modeli kojima se opisuje mehanički odziv tkiva aorte, a koji se nalaze u FEM programskom paketu Abaqus te su korišteni u ovom istraživanju. Navedeni modeli su: neo-Hook, Mooney-Rivlin, Yeoh i Ogden.

Peto poglavlje sadrži metodologiju korištenu u ovom istraživanju. Ovdje je prvo opisana metoda korelacije digitalne slike (DIC) kojom se dobiva puno polje pomaka na površini uzorka prilikom ispitivanja. Upotreba ove metode pridonosi uvidu u nelinearnost mehaničkog ponašanja tkiva aorte. Nakon DIC metode opisan je postupak krioprezervacije. Krioprezervacijom se dugotrajno pohranjuju biološka tkiva za buduću upotrebu te su opisanim postupkom pohranjene i aorte u ovom istraživanju. Na kraju

petog poglavlja opisane su statističke metode kojima se određuje statistička signifikantnost dobivenih rezultata.

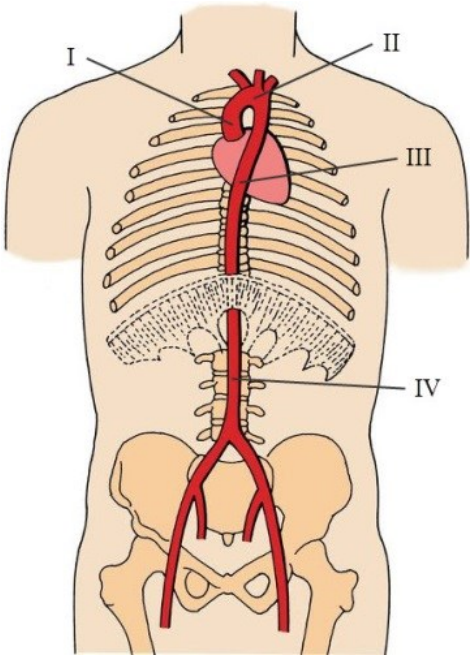
Eksperimentalno ispitivanje opisano je u šestom poglavlju. Tu je detaljno opisana priprema ispitnih uzoraka, korišteni mjerni uređaji, njihove karakteristike te oprema za ispitivanje. Na kraju poglavlja opisan je jednoosni statički vlačni test kojim smo ispitivali mehanička svojstva aorti.

U sedmom poglavlju dani su rezultati eksperimentalnih ispitivanja. Rezultati su dani za dvije skupine uzoraka aorte; u uzdužnom i poprečnom smjeru. Prvo su dani rezultati dobiveni s kidalice te upotrebom optičkog mjernog sustava Aramis, a zatim je dana i numerička obrada eksperimentalnih rezultata kojom su identificirani parametri materijalnih modela.

Osmo poglavlje donosi zaključke i znanstveni doprinos provedenog ispitivanja. Tu su još opisana određena otvorena pitanja kao i buduće perspektive ovog istraživanja.

2. Aorta

Aorta je najveća arterija u tijelu koja iz srca odvodi kisikom bogatu krv i dostavlja je cijelom tijelu. Mreža arterija dio je krvožilnog sustava kojim se ostatak tijela opskrbljuje krvlju, a posljedično i kisikom, hormonima i hranjivim tvarima. Izlazeći iz lijeve klijetke, aorta je usmjerena prema gore (Slika 1.) te pri visini otprilike trećeg prsnog kralješka (T3) zavija prema straga i dolje, spuštajući se tako iza lijevog glavnog bronha, prati zakrivljenost kralježnice sve do četvrtog slabinskog kralješka (L4) gdje završava račvajući se u dvije zajedničke ilijačne arterije [50] koje zatim odvode krv u donje udove.



Slika 1. Anatomski položaj aorte u ljudskom tijelu [51]

Anatomski, aorta se može podijeliti na četiri dijela (Slika 1.):

I uzlazna aorta (aorta ascendens),
II luk aorte (acus aortae),
III prsna ili torakalna aorta (aorta thoracica) i
IV trbušna ili abdominalna aorta (aorta abdominalis).

Torakalna (III) i abdominalna aorta (IV) zajednički se nazivaju silaznim dijelom aorte (aorta descendens), a razdvaja ih dijafragma (lat. diaphragma), tanka mišićno-vezivna ploča koje se nalazi na dnu prsnog koša.

Aorta je izrazito elastična krvna žila te se svrstava u elastične arterije. Elastične su arterije najveće arterije u tijelu pri čemu je promjer aorte oko 3 cm na izlazu iz srca te se postupno smanjuje idući prema abdominalnom kraju gdje je promjer u prosjeku nešto manji od 2 cm (17,5 mm) [52]. Elastičnost aorte proizlazi iz povišenog udjela elastina u sastavu medijalnog sloja njenog tkiva o čemu će biti više rečeno u poglavljima 2.1. te 3.

Elastičnost aorte od iznimne je važnosti budući da u arteriju ulazi krv pod visokim tlakom iz lijeve klijetke srca [53]. Podatljivost (eng. compliance) je mjera kojom se iskazuje sposobnost krvne žile, pa tako i aorte, da poveća ili smanji svoj volumen, te se tako prilagodi promjenama tlaka unutar žile [54]. Izrazita podatljivost aorte, poglavito na njenom uzlaznom dijelu, odgovorna je za apsorbiranje kinetičke energije nastale prilikom izbacivanja krvi iz srca u periodu sistole kada služi i kao spremnik krvi čime stvara Windkesselov efekt kojim se prigušuje pulsiranje krvi u žilama u periodu dijastole kada srce prestane izbacivati krv u aortu [55] [56]. Detaljan opis mehaničkih svojstava aorte dan je u poglavlju 3.

2.1. Građa tkiva aorte

U ovom poglavlju opisani su sastavni dijelovi tkiva aorte iz kojih proizlaze mehanička svojstva proučavana u eksperimentima provedenim u ovom istraživanju. Ovdje je naglasak na tkivu ljudske aorte iz dvojakog razloga; prvi je zbog dostupnosti literature o ljudskim aortama, a drugi proizlazi iz sličnosti između ljudske i svinjske aorte. Ova sličnost očituje se u anatomskim, histološkim i fiziološkim svojstvima koja će biti podrobnije opisana u poglavlju 2.2. Anatomska i fiziološka sličnost ljudske i svinjske aorte.

Tkivo aorte se može zamisliti kao kompozit sačinjen od tri koncentrična sloja (Slika 2.):

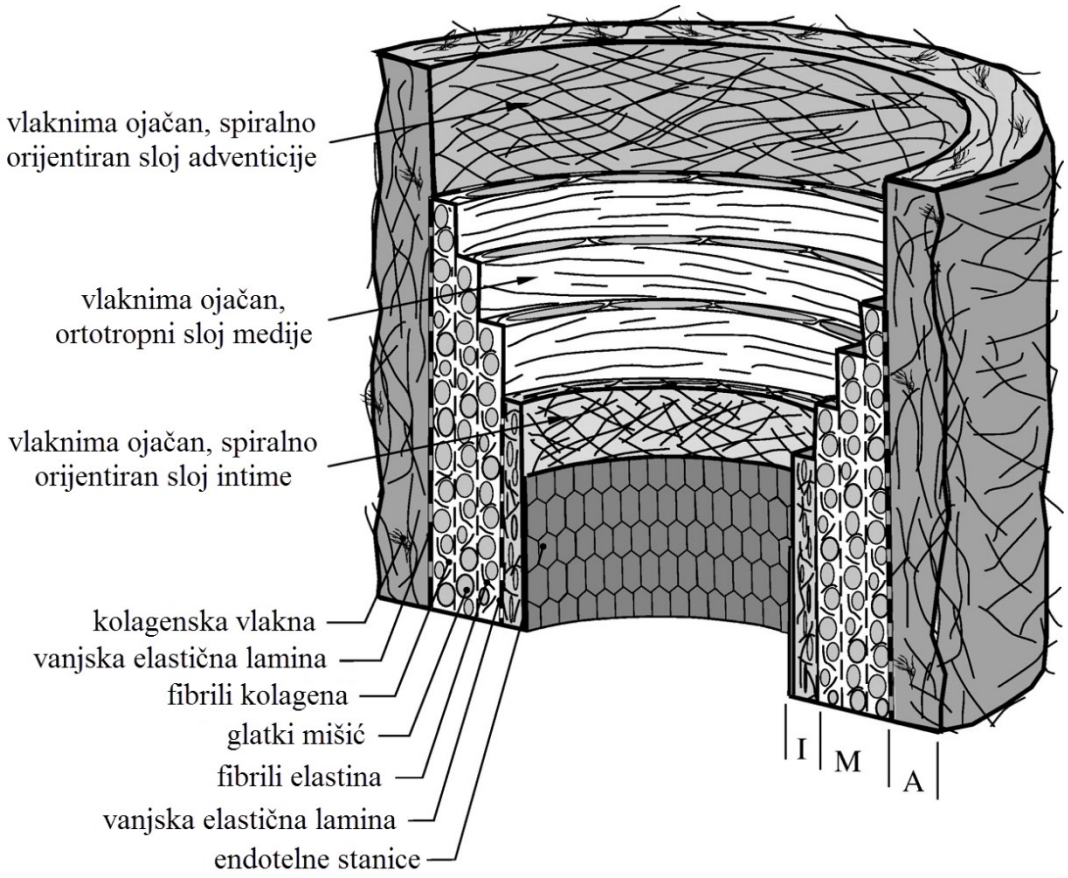
A vanjskog sloja - adventicije (tunice adventitiae),

M srednjeg sloja - medije (tunica mediae) te

I unutarnjeg sloja - intime (tunice intimae).

Sva tri sloja čine strukturni elementi poput vlakana elastina, kolagena te glatkog mišića (eng. smooth muscle cell) [57]. Iz perspektive mehanike aksiomatski je zaključiti da

upravo iz zastupljenosti i orijentacije ovih elemenata unutar tkiva aorte proizlaze njena mehanička svojstva [17] [18] [58].



Slika 2. Slojevi aorte s odgovarajućim konstituentima [59]

Intima, unutarnji sloj aorte sastoji se od sloja endotelnih stanica odvojenih tankim slojem (~ 80 nm) bazalne membrane (eng. basal lamina), te subendotelnog sloja u kojem su sitno raspršeni i osno raspoređeni glatki mišići (eng. smooth muscle cells) i nakupine vlakana kolagena [17]. Endotelne stanice su obično ravne i izdužene u smjeru protoka krvi prosječne debljine od 0,2 do 0,5 μm, širine 10 do 15 μm te duljine 25 do 50 μm; osim u blizinama račvanja žila gdje je strujanje krvi složeno i endotelne stanice su često poligonalnog oblika. Bazalna membrana primarno služi kao mreža na kojoj rastu endotelne stanice, a služi u određenoj mjeri i kao strukturna potpora stijenci aorte. Sačinjena je većinom od kolagena tipa IV raspoređenog u mrežastu strukturu. U zdravih pojedinaca, mlađe dobi, intima veoma malo doprinosi mehaničkom odzivu aorte. Međutim, starenjem se povećava debljina i krutost intimae kao posljedica ateroskleroze te raste i utjecaj ovog sloja na mehanički odziv tkiva aorte [60] [61] [62].

Unutarnja elastična lamina (eng. internal elastic lamina) odvaja intimu od medie, iako se često smatra dijelom potonje [17]. U osnovi je šupljikava „ploča“ elastina koja omogućava prijenos vode, nutrijenata i elektrolita kroz zid aorte kao i međustaničnu komunikaciju.

Medija je srednji sloj tkiva aorte sačinjen od složene mreže glatkih mišića, elastina i kolagena (primarno tipova I, III i IV) ugrađenih u izvanstanični matriks (eng. extracellular matrix). Od intime i adventicije dijeli je unutarnja odnosno vanjska elastična lamina.

Šupljikava elastična opna dijeli unutarnji dio mediae na više koncentričnih slojeva sastavljenih od vlakana elastina i kolagena. Broj elastičnih opni, a samim time i broj koncentričnih slojeva intime opada idući prema distalnom kraju aorte [17]. Glatki mišići su vretenastog oblika, tipično dugački oko 100 μm i 5 μm u promjeru dok su nešto deblji bliže jezgri te su obično raspoređeni tako da se deblji središnji dijelovi postave uz tanje krajeve drugih, susjednih mišića. Najčešće su orijentirani spiralno, a ponegdje su gotovo cirkularno položeni [63]. Ovakva orijentacija omogućava glatkom mišiću da svojom kontrakcijom regulira promjer aorte i prilagodi ga tlaku unutar njenog lumena. Dokazano je kako debljina ovih slojeva nije ovisna o poziciji unutar elastičnih arterija, međutim njihov se broj povećava s porastom promjera arterije dok se smanjenjem promjera smanjuje i broj slojeva unutar intime. Na primjer, aorta u miševa promjera 1,2 mm sadrži 5 ovakvih slojeva, dok svinjsku aortu promjera 23 mm čine 72 sloja [64].

Adventicija je vanjski sloj koji čini otprilike 10% volumena aorte. Većinom je tvori gusta mreža vlakana kolagena tipa I pomiješanih s elastinom te fibroblasti i fibrociti (stanice zadužene za proizvodnju elastina i kolagena) okruženi vezivnim tkivom. Vlakna kolagena u vanjskom sloju aorte osno su raspoređena, a smatra se da je adventicija zadužena za ograničavanje akutnih proširenja tj. distenzija (eng. distension) [17]. Ovome ponajviše doprinose spiralno raspoređeni fibrili (biopolimeri duguljastog oblika promjera 10 do 100 nm) kolagena koji služe kao dodatna strukturna potpora tkivu aorte pri povišenom tlaku kada se ispruže i postanu svojevrsni „zaštitni prsluk“ aorte koji je štiti od pretjeranog istezanja koje bi moglo dovesti do pucanja tkiva [65].

Vanjski dio stijenke aorte sadrži mrežu arteriola, kapilara i venula tzv. vasa vasorum, koja joj donosi kisik i hranjive tvari.

Kolagen je proteinska makromolekula duljine oko 280 nm koja igra značajnu ulogu u fiziologiji kralježnjaka. Duguljasti oblik duguje trima polipeptidnim lancima desnokretno zavijenima u trostruku spiralu. Iako postoji čak 12 vrsta kolagena većinom ih tvore tri aminokiseline: glicin (33%) koji mu daje stabilnost, prolin (15%) i hidroksiprolin (15%). Molekule kolagena povezane su kovalentnom vezom te tako tvore kolagenske niti. Promjer niti kolagena mijenja se prema funkciji i opterećenju kojem su izloženi iako još uvijek nije poznat njihov utjecaj na čvrstoću tkiva aorte [66]. Kolagen se u krvnim žilama nalazi kao koncentrično orijentirana vlakna. Najučestaliji oblik je kolagen tipa I koji se nalazi u gotovo svim tkivima te čini sastavni dio krvnih žila.

Međumolekulske veze unutar kolagena daju tkivu njegovu čvrstoću koja se mijenja pod raznim utjecajima, najčešće starenjem ili uslijed patogenih promjena. Funkcija i mehanički integritet tkiva i organa održava se napetošću vlakana kolagena [22]. Ova vlakna se skupljaju zagrijavanjem uslijed pucanja kristalne strukture – npr. pri temperaturi od 65°C kolagen se skupi na trećinu početne duljine. Kolagenska vlakna se smatraju najzaslužnijima za viskoelastični mehanički odziv tkiva aorte prilikom njenog opterećenja [67] kao i za anizotropnost mehaničkih svojstava tkiva [68].

Elastin je protein koji se u mekim tkivima nalazi u obliku tankih niti, a njihov omjer naspram kolagenskih vlakna smanjuje se idući od srca [17]. Duge i elastične, niti elastina čine trodimenzionalnu mrežu nalik gumi koja se da izdužiti do otprilike 2,5 puta svoje početne duljine prije pucanja. Za razliku od kolagenskih vlakana, građa elastinske mreže nema izražen hijerarhijski oblik, a iako, kao i kolagen, sadrži 33% glicina, sadržaj prolina i hidroksiprolina znatno je niži kod elastina [7]. Elastin se može podvrgnuti visokim naprezanjima prije pucanja, gotovo je potpuno linearno elastičan te iskazuje znatno manje viskoelastične efekte (npr. puzanje) od kolagenskih vlakana [69].

Eksperimentalna ispitivanja pokazala su da se torakalna i abdominalna aorta razlikuju u mehaničkom odzivu [70], pri čemu aorta postaje kruća idući od srca (distalno) [71] [72]. Kako bi se jednoznačno odredio utjecaj krioprezervacije na mehanička svojstva tkiva aorte, u ovom istraživanju ispitivano je tkivo torakalne aorte čija su mehanička svojstva detaljnije opisana u poglavlju 3. Mehaničko ponašanje tkiva aorte.

2.2. Anatomska i fiziološka sličnost ljudske i svinjske aorte

Oblikom i građom svinjske aorte su najsličnije ljudskima [73] [74], a zbog mnogih anatomskih i fizioloških sličnosti [19] [74] [75] [76] ne čudi ogromna primjena svinjskog tkiva u kliničkim istraživanjima. Neka od najučestalijih istraživanja opisana su u poglavlju 2.3. Upotreba svinjskih modela u pretkliničkim ispitivanjima dok će ovdje biti dan pregled sličnosti ljudskog i svinjskog kardiovaskularnog sustava koje su učinile svinjske modele tako prihvaćenima u kliničkim istraživanjima.

Budući da aorta prima krv direktno iz srca, bitne su anatomske karakteristike srca kao i hemodinamski parametri krvi koja iz njega istječe. Anatomski, najveća razlika svinjskog srca u odnosu na ljudsko je postojanje lijeve neparne vene (lat. vena azygos) koja odvodi krv iz međurebrenih arterija (lat. arteriae intercostales) u koronarni sinus (lat. sinus coronarius) tako da je krv na ulazu u svinjsko srce pomiješana sistemska i miokardijalna [73] [77]. Omjer težine srca naspram tjelesne težine je identičan (5 g/kg) kod ljudi kao i kod svinja težine 20 – 30 kg uobičajeno korištenih u sličnim istraživanjima [20] [78]. Provedbeno srčano mišičje sastoji se od stanica srčane muskulature koje imaju sposobnost stvaranja impulsa kojim se uzrokuje kontrakcija stanica srčanog mišića, a posljedično i cijele srčane komore [50]. Karakteristike ovih impulsa mjerenih intrakardijalnim elektrogramom preklapaju se kod ljudi i svinja što je omogućilo upotrebu svinjskih modela prilikom kliničkih ispitivanja srčanog ritma i pacemakera [79] [80]. Također, priljev krvi u provedbeno srčano mišičje dominantno je iz desne koronarne arterije kod ljudi kao i kod svinja [73] [81]. Anatomske razlike srca i pripadajućih žila najčešće su rezultat dvonožnog odnosno četveronožnog stava [78].

Osim anatomske, značajne su i hemodinamske sličnosti svinjskog i ljudskog krvotoka koje su bitan faktor prilikom istraživanja kardiovaskularnog sustava, naročito pri ispitivanju srčanog zastoja i kardiopulmonalne reanimacije (eng. cardiopulmonary resuscitation - CPR) [82] [83].

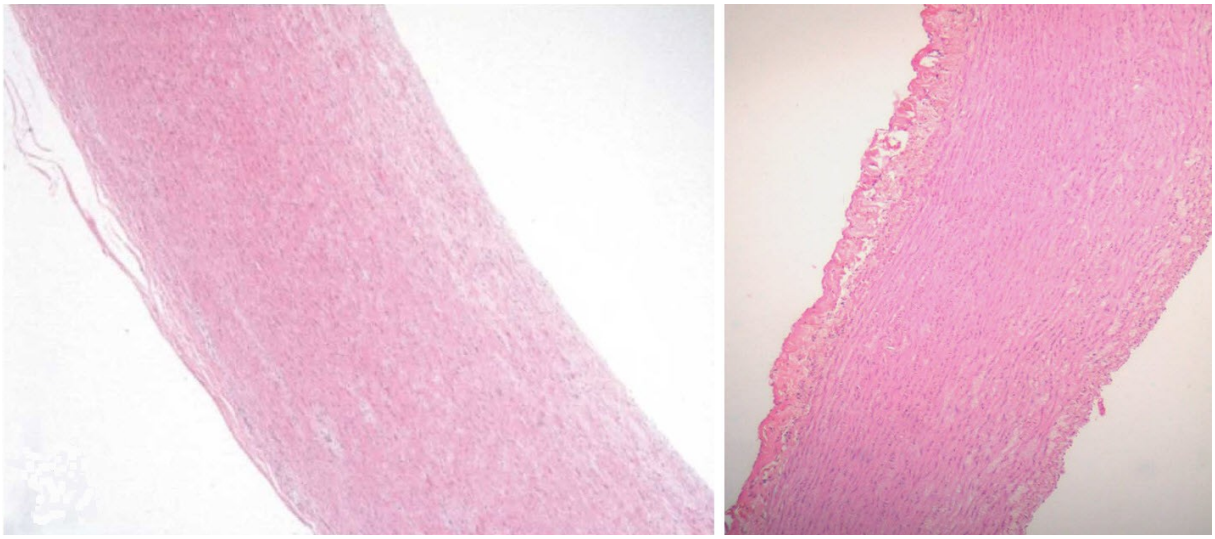
Značajnije razlike u hemodinamskim parametrima najčešće su posljedica razlike u vrsti, dobi, težini i ishrani jedinki zbog čega treba biti oprezan prilikom korištenja i interpretacije rezultata u kardiovaskularnim istraživanjima sa svinjskim modelima [78]. Najznačajniji hemodinamski parametri dani su usporedno za ljude i svinje u Tablica 1. U

literaturi je također zabilježena gotovo identična razina tlaka u arterijama, protoka krvi kroz srčani mišić te broja otkucaja u minuti kod obje vrste [84].

Tablica 1. Raspon najznačajnijih hemodinamskih parametara kod ljudi i svinja [85]

Parametar	Ljudi	Svinje
Srčani minutni volumen (l min^{-1} m^{-2})	2,5 – 3,5	2,0 – 2,5
Tlak u desnoj pretklijetci (mmHg)	0 – 8	1 – 9
Tlak u desnoj klijetci (mmHg)	15 – 30	24 – 30
Tlak u plućnoj arteriji (mmHg)	15 – 30	11 – 24
Tlak u lijevoj pretklijetci (mmHg)	100 – 140	116
Tlak u aorti (mmHg)	70 – 105	114 – 126

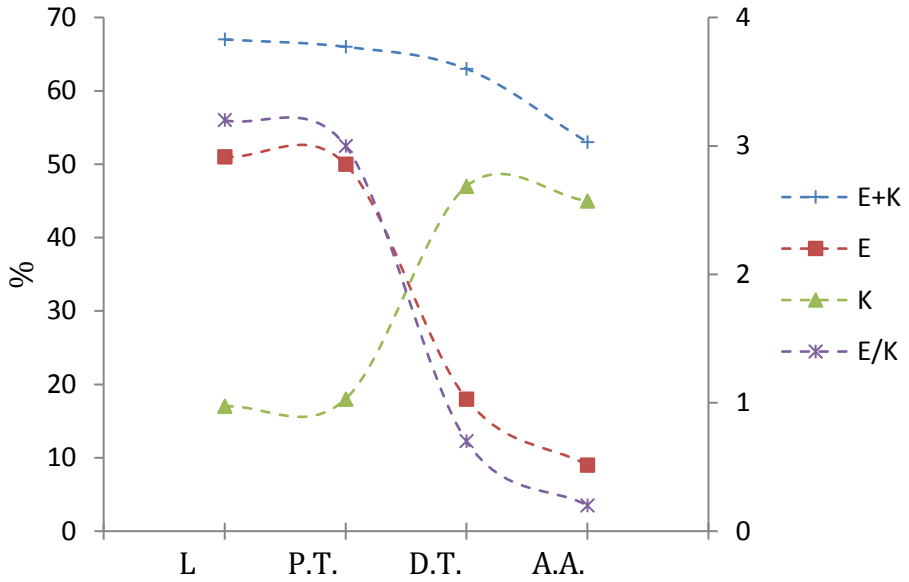
Kako je navedeno u prethodnom poglavlju sve arterije pa tako i aorte, bez obzira na vrstu ili položaj unutar organizma, sačinjavaju tri sloja; intima, medija i adventicija koje čine isti glavni sastavni elementi; endotelne stanice, elastin, kolagen, stanice glatkog mišića i mreža malih krvnih žila koje prehranjuju stanice koje grade aortu(lat. vasa vasorum) (Slika 3.) [17]. Histološki, tkivo svinjske aorte ima nešto naglašenije razvijenu mrežu malih žila (vasa vasorum) u odnosu na ostale životinjske modele [75].



Slika 3. Histološko bojanje tkiva svinjske (lijevo) i ljudske (desno) aorte [86]

Također, kod svinjske aorte (Slika 4.) nešto je veća promjena u zastupljenosti elastina i kolagena u ukupnoj masi tkiva kako se ide prema distalnom kraju aorte pri čemu

zastupljenost kolagena raste, dok udio elastina opada idući prema abdominalnom kraju. Usprkos ovoj promjeni ukupan broj vlakana elastina i kolagena održava se na razinama sličnima kao kod ljudi (Slika 5.) [87]. Slika 4. i Slika 5. na desnoj ordinati (vertikalnoj osi) pokazuju iznos omjera elastina naspram kolagenu (E/K) koji se značajnije mijenja kod svinjske aorte, od 3,2 na luku aorte (L) do 0,2 na kraju abdominalne aorte (A.A.), dok je kod ljudske aorte ta promjena nešto blaža (Slika 5.) te pada s 1,63 na luku aorte na 0,77 na kraju abdominalne aorte.



Slika 4. Udio strukturnih elemenata u zavisnosti o položaju unutar svinjske aorte [87]

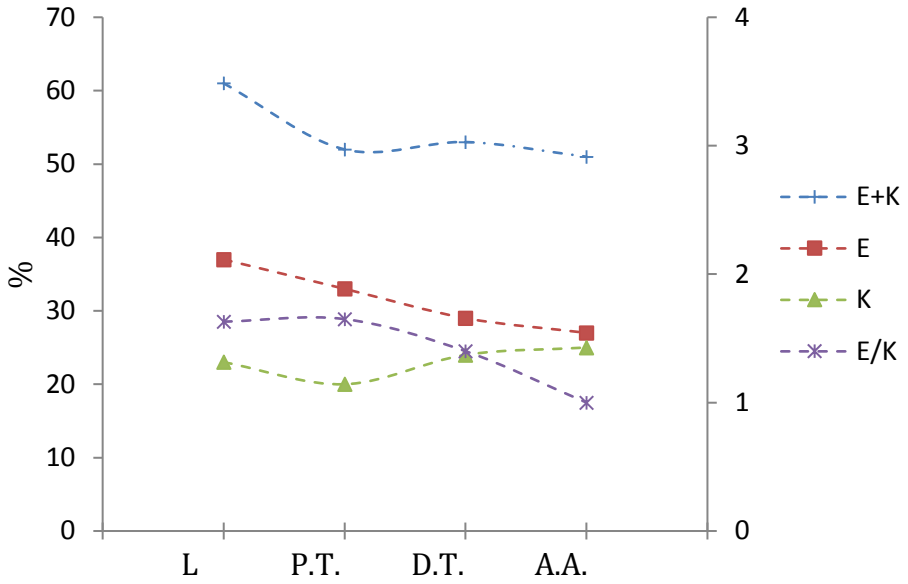
Lijeva ordinata prikazuje udio pojedinog elementa tj. elastina (E), kolagena (K) te zbroja ovih vlakana (E+K) kao postotak ukupnog udjela svih konstituenata.

Gledajući segment po segment, najsličniji sastav tkiva ljudska i svinjska aorta imaju između proksimalnog (P.T.) i distalnog torakalnog (D.T.) dijela gdje je udio elastina između 20% i 40% kod svinja te 30-35% kod ljudi. Udio kolagena ovdje se kreće između 15% i 45% kod svinja, a kod ljudi od 20-25%. Omjer E/K kod svinjskih torakalnih segmenata kreće se od 3 do 0,8 dok je kod ljudi između 1,5 i 1,0. Udio elastina izrazito je veći kod svinjske aorte, poglavito u luku aorte i na njenom torakalnom dijelu.

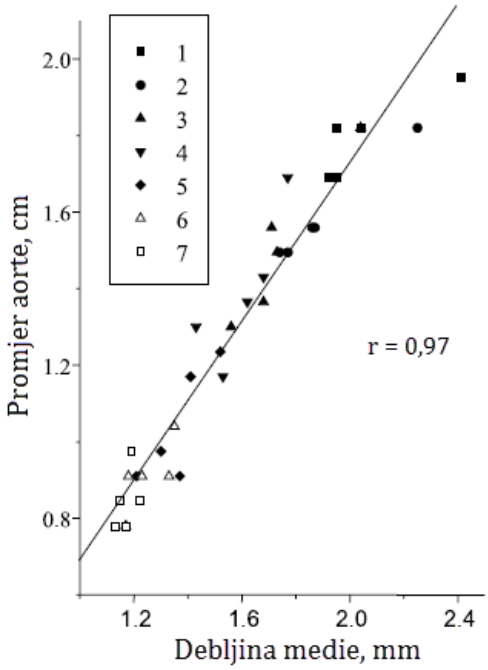
Vidljivo je stoga da se nešto više rasipaju vrijednosti udjela elastina i kolagena kao i njihov omjer kod svinjske aorte naspram ljudskoj, a valja imati na umu da ove promjene zavise o brojnim faktorima poput vrste, dobi i ishrane [76] [88] [89].

Kao i kod ljudi, količina elastina i kolagena (Slika 4. i Slika 5.) te debljina slojeva svinjske aorte, poglavito medijalnog (Slika 6.), opada idući od srca prema završetku abdominalne

aorte uz iznimku kolagena kod svinjske aorte kojem raste udio idući prema abdominalnoj aorti. U istom smjeru opada i promjer aorte [88].



Slika 5. Udio strukturnih elemenata u zavisnosti o položaju unutar ljudske aorte [87]



Slika 6. Debljina medialnog sloja aorte u zavisnosti o promjeru svinjske aorte [88]

Dokazano je kako debljina pojedinog sloja unutar same medije ostaje konstantna cijelom dužinom torakalne aorte, no idući prema kraju abdominalne aorte broj slojeva medije

opada te se povećava njihova debljina [88]. Također, količina hidroksiprolina, aminokiseline čija je količina u jakoj vezi s količinom kolagena, raste s godinama kod ljudi i svinja, a njen udio je gotovo identičan kod zdrave torakalne aorte ljudi (1,14 $\pm$ 0,16) i svinja (1,31 $\pm$ 0,06) [87] [90] .

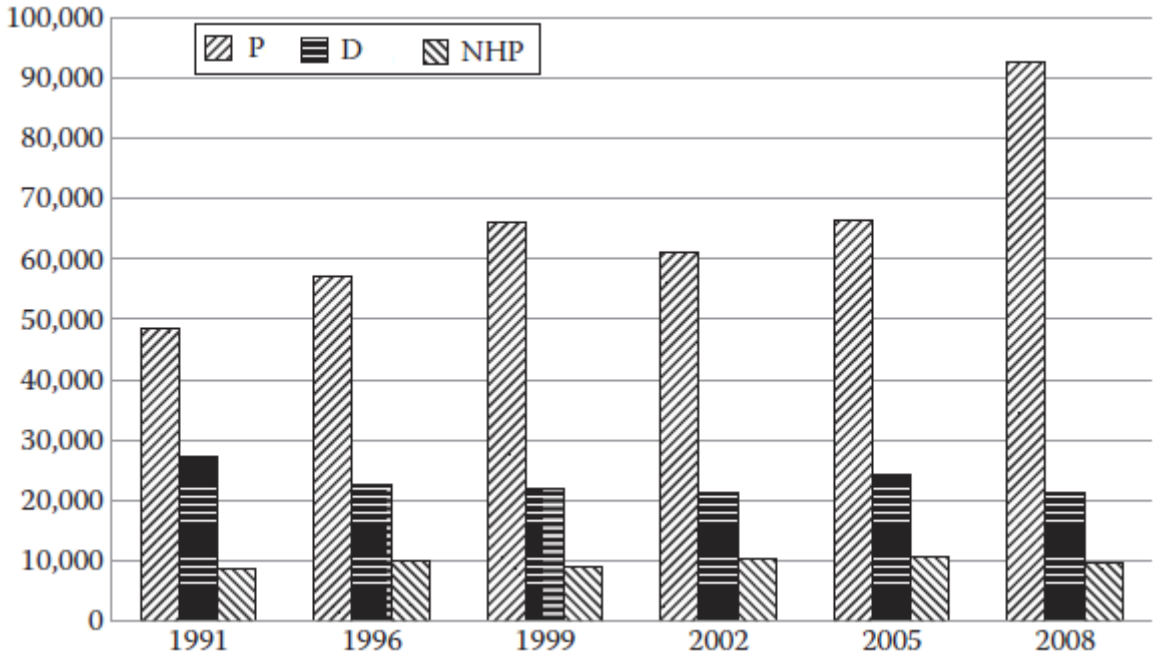
2.3. Upotreba svinjskih modela u pretkliničkim ispitivanjima

Bolesti aorte jedan su od značajnih uzroka smrti u modernom svijetu od kojih su najučestalije: aneurizma (lokalno proširenje lumena aorte najčešće kao posljedica oslabljenog tkiva), disekcija (prodor krvi kroz razdor intime, njeno odvajanje od medije te stvaranje lažnog lumena), ateroskleroza (kalcificiranje unutarnjeg lumena žile te posljedično njegovo smanjenje) te povećanje krutosti žile (kao posljedica starenja i/ili ateroskleroze) [90] [91] [92]. Navedene patološke promjene aorte povezane su s promjenama u strukturi tkiva aorte odnosno promjenom u udjelu i orijentaciji vlakana elastina i kolagena unutar tkiva što u konačnici utječe i na promjenu mehaničkih svojstava aorte [89].

Da bi se proširile spoznaje o patološkim promjenama aorte, važno je imati dovoljnu količinu eksperimentalnih podataka. Kako je teško prikupiti veliki broj ljudskih uzoraka, ponajviše iz etičkih razloga te manjka darivatelja, svinjski modeli čine dobru alternativu u pretkliničkim ispitivanjima [73] [19] [93]. Osim etičkih razloga, dostupnosti te ujednačenosti tova u smislu uvjeta uzgoja i ishrane, glavne prednosti svinje pred drugim životinjama u kardiovaskularnim kliničkim istraživanjima jesu sličnost u građi tkiva kao i fiziološki uvjeti koji vladaju unutar aorte. Navedene sličnosti detaljno su opisane u poglavlju 2.2. dok će ovdje biti dan kratki pregled dosadašnjih istraživanja u kojima je korištena svinjska aorta ili neka druga arterija. Sličnosti svinjskog tkiva s ljudskim zapažene su već u 19. stoljeću kada je 1838. prvi put svinjska rožnica ksenotransplantirana (grč. *xenos* – tuđi) na čovjeka, čak 65 godina prije prvog presađivanja s čovjeka na čovjeka [94].

Upotreba svinja u biomedicinskim istraživanjima ustaljena je praksa u svijetu, a s godinama se i dalje povećava njihov udio u pretkliničkim istraživanjima (Slika 7.) na uštrb drugih životinjskih modela [73] [73] [95] [96]. Na Slika 7. sa P su označena

istraživanja u kojima su korišteni svinjski modeli, D prikazuje istraživanja na psećim modelima, a NHP označava istraživanja na neljudskim primatima. Rješavanje određenih imunoloških reakcija, fizioloških nepodudarnosti i mikrobioloških rizika stoje kao jedine prepreke svinjskim tkivima u široj kliničkoj upotrebi [97] čime bi se omogućio ubrzani razvoj inovativnih dijagnostičkih i terapeutskih tehnologija [98]. Većina sorti svinja uzgaja se komercijalno u proizvodnji hrane gdje mogu dosegnuti težinu od preko 100 kg već nakon 4 mjeseca, pri čemu je zdravlje krda kao i ujednačenost jedinki od iznimne važnosti [76].



Slika 7. Udio određenih životinjskih modela u objavljenim biomedicinskim istraživanjima u Europskoj Uniji [99]

Najčešći su modeli inducirani tj. patogene promjene koje se proučavaju su umjetno inducirane odnosno nisu nastale spontano ili kao posljedica genetske predispozicije.

Kod aterosklerotičnih žila dolazi do zadebljanja unutarnjeg lumena koje nastaje kada se na oštećeni endotel počnu nakupljati razni degenerativni materijali najčešće u obliku masnog tkiva, kalcija i drugog tkiva koje se često zajednički naziva plak (eng. plaque) ili u širem smislu lezije (eng. lesion) kao naziv za bilo koju degenerativnu promjenu na tkivu (lat. *laesio* – ozljeda). Bolest je to koja stavlja značajan pritisak na zdravstveni sustav, ali i društvo općenito [100]. Samo u Sjedinjenim Američkim Državama 700000 ljudi godišnje doživi svoj prvi kardiovaskularni događaj (npr. infarkt) dok ih još 500000 prijavi ponovljeni slučaj što u konačnici predstavlja i ogromno breme za porezne

obveznike koji su u 2011. godini samo za kardiovaskularne bolesti izdvojili 431,8 milijardi USD [101]. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2011. godini hospitalizirane su 7822 osobe kojima je dijagnosticiran akutni infarkt miokarda ili ponovljeni infarkt miokarda pri čemu je u istoj godini preminulo 3722 ljudi s osnovnim uzrokom smrti infarktom miokarda ili ponovljenim slučajem. Taj broj penje se na 24481, ako se govori o broju smrtnih slučajeva uzrokovanih kardiovaskularnim bolestima općenito [102].

Veliki broj kardiovaskularnih istraživanja na svinjskim modelima proučavao je utjecaje ateroskleroze budući da su svinje sklone razvoju ove bolesti poput ljudi [19]. Najčešće su lezije u obliku plakova inducirane prehranom koja se tijekom 6 mjeseci sastojala od 2% do 4% kolesterola i 40% masti. Ovaj proces se ponekad ubrzava kirurškim oštećenjem endotela koji potiče rast plakova te pruža dodatnu prednost u smislu poticanja rasta plaka na lokaciji koja je od interesa prilikom istraživanja [73] [76]. U navedenim ispitivanjima pokazano je kako se mehanička svojstva ovih plakova značajno razlikuju od onih kod zdravog tkiva te utječu na mehaničko ponašanje cijele krvne žile potičući daljnje patološke promjene [10] [12] [92] [103] [104] [105].

Aneurizma abdominalne aorte (AAA) povećanje je promjera aorte (najčešće iznad 3 cm) nastalo uslijed oslabljenih mehaničkih svojstava zida aorte. Na slabljenje mehaničkih svojstava uglavnom utječe ateroskleroza. Godišnje se na svjetskoj razini dijagnosticira 500000 novih slučajeva AAA te je u zadnjih 30 godina utrostručen broj dijagnoza u Zapadnom svijetu [106]. Poznavanjem mehaničkih svojstava može se dati procjena rasta aneurizme što je od iznimne važnosti prilikom liječenja [107].

Svinjski modeli korišteni su prilikom istraživanja razvoja aneurizme nastale autoimunom reakcijom nakon ugrađivanja presatka [108]. Eksperimentalnim ispitivanjem na svinjskim aortama opisan je rast aneurizme temeljen na hemodinamskim sličnostima svinjske i ljudske aorte [109]. Također, svinjski modeli korišteni su i u ispitivanjima razvoja aneurizme kao posljedice koarktacije (eng. coarctation – suženje) [110], u ispitivanju mehanizma pucanja aneurizme [111] te pri istraživanju mehaničkih svojstava tkiva aneurizme [38]. Valja naglasiti kako su svinjski modeli AAA s dvostrukom trbušnom maramicom (lat. peritoneum) pokazali ponašanje najsličnije ljudskoj AAA promatrajući rast aneurizme i njenu sklonost pucanju [73]. Također, upotreba krioprezervirane aorte prilikom rekonstrukcije AAA može rezultirati

povoljnijim ishodom operacije nego kada se za rekonstrukciju koristi svježa žila [112] [113].

U posljednjih desetak godina svinjski modeli prevladavaju i u ispitivanjima infarkta miokarda (lat. infarctus myocardii) tj. srčanog udara – kardiovaskularnog događaja pri kojem dolazi do značajnog smanjenja ili čak prestanka dotoka krvi u srce [98] [114]. U 2015. godini je zabilježeno 15,9 milijuna slučajeva infarkta na svjetskoj razini što dovoljno govori o važnosti ispitivanja procesa i nastanka infarkta [115].

Korištenje svinjskih modela u pretkliničkim ispitivanjima može uvelike doprinijeti kliničkoj implementaciji novih saznanja i tehnologija u dijagnostici i liječenju [19].

2.3.1. Ispitivanje utjecaja mehaničkih svojstava na uspješnost kardiovaskularnog presatka

Budući da su u provedenom istraživanju ispitivana mehanička svojstva aorte te njihova promjena uslijed dugotrajne pohrane, u ovom poglavlju dan je pregled dosadašnjih spoznaja o utjecaju mehaničkih svojstava aorte na uspješnost kardiovaskularnog presatka pod čim se podrazumijeva dugotrajna protočnost krvne žile nakon transplantacije te niska stopa raspadanja odnosno dezintegracije presatka [3].

Aorta ne služi samo kao prijenosnik krvi već njena podatljivost omogućava energetski učinkovit prijenos krvi u ostatak tijela istodobno prigušujući pretjerano pulsiranje Windkesselovim efektom [116].

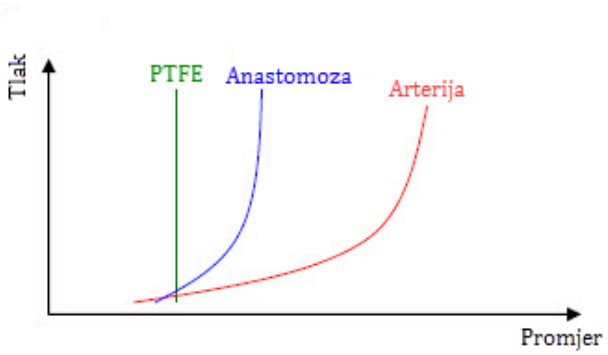
Proksimalni segment torakalne aorte koji je ispitivan u ovom istraživanju dio je aorte koji doprinosi ukupnoj podatljivosti aorte s gotovo polovinom udjela što je čini bitnim segmentom za zdravo funkcioniranje aorte ali i ostatka krvotoka [117].

Otpor (eng. impedance) nastao protokom krvi kroz lumen mijenja se kod aorte i to tako da se prilagođava otporima krvnih žila koje iz nje izlaze čime pospješuje strujanje u perifernom krvotoku [2] [116] [118].

Ispitivanja su pokazala kako umjetni presadci nisu zadovoljavajućih mehaničkih svojstava koja bi omogućila dugotrajnu uspješnost presatka [1]. Umjetni presadci dokazano povisuju naprezanja unutar arterija prilikom porasta tlaka te nepovoljno

utječu na brzinu protoka krvi. Brzina strujanja krvi zamjetno je veća kod umjetnih presadaka uslijed čega nastaju turbulencije u krvotoku koje mogu dovesti do patoloških promjena tkiva poput oštećenja funkcije endotela [119] [120] [121].

Umjetni presadci poput onih od politetrafluoretilena (PTFE) konstantnog su promjera te se ne mogu prilagoditi promjeni tlaka unutar žile (Slika 8.) tako da je na anastomoziranom mjestu (spoj presatka i nativne žile) kombinirana podatljivost presatka i nativne arterije uslijed čega može doći do hiperplazije intime [1].



Slika 8. Odnos tlaka i promjera za anastomozu, PTFE presadak i nativnu arteriju [122]

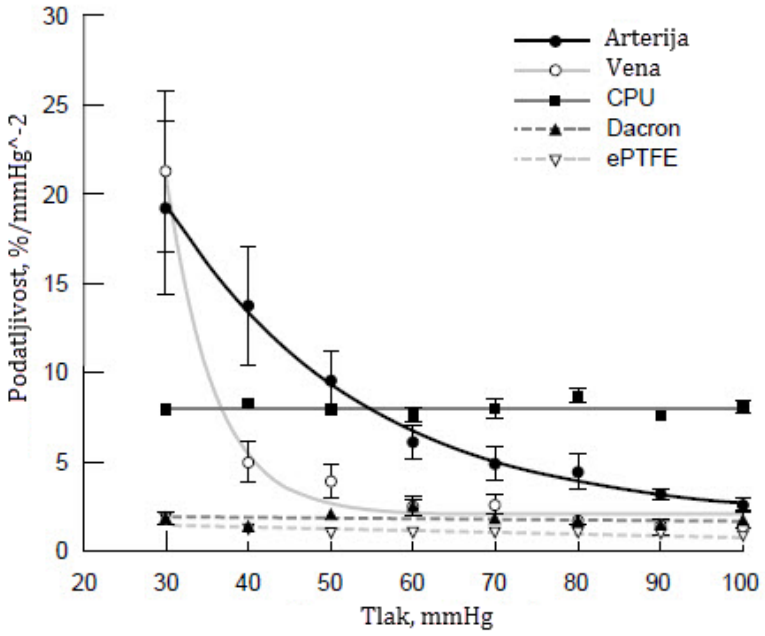
Smatra se da do razvoja hiperplazije dolazi upravo uslijed razlike u podatljivosti presatka i nativne žile u području oko anastomoze gdje su glatki mišići pod utjecajem nepravilnog cikličkog opterećenja pri čemu dolazi do lučenja mitogena, kemijskog spoja zaduženog za poticanje umnažanja stanica [2] [123] [124].

Hiperplaziju karakterizira povećanje količine tkiva na temelju povećanog razmnažanja stanica što može smanjiti lumen žile te mijenja mehanička svojstva ali i negativno utječe na hemodinamske parametre (Tablica 2.) poput krvnog tlaka i brzine strujanja [125]. Daljnjim povećanjem broja stanica dolazi do zadebljanja tkiva na mjestu pojave hiperplazije što u konačnici može drastično smanjiti protok i dovesti do potrebe za novom rekonstrukcijom žile.

Tablica 2. Hemodinamski parametri zdrave aorte te proksimalnog i distalnog presatka [125]

	Kontrolna skupina	Proksimalni presadak	Distalni presadak
P_{sist} [mmHg]	109,7	115,37 (+6%)	112,46 (+3%)
PP [mmHg]	28,75	34,76 (+21%)	31,78 (+10%)
PP^f[mmHg]	19,27	25,68 (+33%)	20,61 (+7%)
PP^b[mmHg]	10,70	11,95 (+12%)	12,16 (+14%)
I^*	0,55	0,46 (-16%)	0,60 (+9%)
Z_c[mmHg ml-1s-1]	0,0305	0,0483 (+58%)	0,0300 (– 1%)
C_{sist}[ml/mmHg]	1,58	1,25 (– 20%)	1,38 (– 13%)
PWV [m/s]	4,74	5,16 (+9%)	5,94 (+25%)

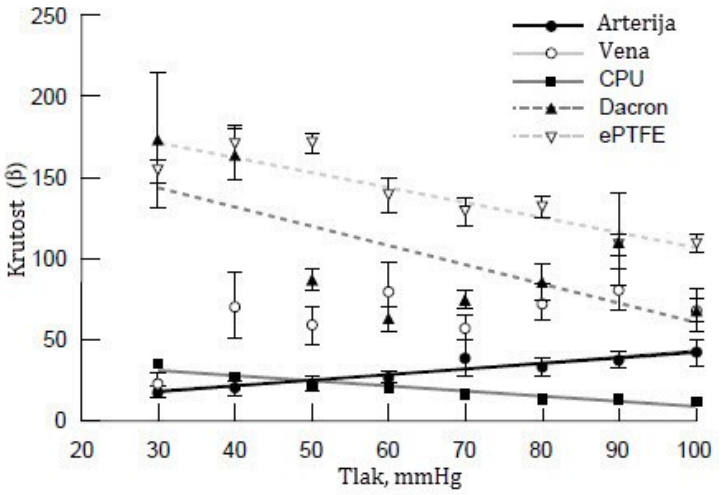
Rezultati za sistolički tlak (P_{sist}), razliku tlakova sistole i dijastole (PP), pritisak krvotoka od srca (P^f), pritisak krvotoka prema srcu (P^b), koeficijent refleksije (I^*), karakteristični otpor - impedanciju (Z_c), ukupnu podatljivost (C_{sist}) te brzinu pulsnog vala (PWV)



Slika 9. Podatljivost arterija, vena i umjetnih presadaka u odnosu na tlak unutar žile [2]

Istraživanja su pokazala kako se smanjenjem podatljivosti (Slika 9.) odnosno povećanjem krutosti (Slika 10.) arterije prilagođavaju povećanom tlaku unutar lumena dok to svojstvo ne posjeduju umjetni presadci poput onih od podatljivog poliuretana (CPU – eng. compliant polyurethane), ekspandiranog politetrafluorida (ePTFE) ili od

polietilentereftalata (poznatog i pod imenom Dacron ili PET) zbog čega dolazi do razlike svojstava na spoju presatka i nativne žile [2].



Slika 10. Krutost arterija, vena i umjetnih presadaka u odnosu na tlak unutar žile [2]

Umjetni presadci mogu dovesti i do raznih drugih komplikacija, tako su eksperimentalna ispitivanja te računalne simulacije na svinjskoj aorti pokazala kako umjetni presadci mogu povisiti prosječni tlak krvi prilikom sistole za čak 17% čime pomažu u stvaranju uvjeta za razvoj aneurizme te mogu dovesti i do pucanja tkiva presatka [108] [120]. Razlika mehaničkih svojstava presatka i nativnog tkiva u istraživanjima se pokazala kao značajan faktor prilikom ateroskleroze [126], dijabetesa [9], srčanog udara [12] i niza ostalih patoloških promjena [121] [127] [117].

2.3.2. Ispitivanje utjecaja dugotrajne pohrane na mehanička svojstva aorte

Kako bi se osigurala zaliha krvnih presadaka potrebno ih je pohraniti i to na način koji neće utjecati na mehanička svojstva koja su, kako je pokazano u prethodnom poglavlju, od iznimne važnosti za krajnji ishod transplantacije. U ovom poglavlju dan je pregled dosadašnjih spoznaja o utjecaju krioprezervacije na mehanička svojstva arterija s naglaskom na aortu.

Prilikom istraživanja utjecaja pohrane na mehanička svojstva aorti u znanstvenim radovima uočena je upotreba brojnih pojednostavljenja koja čine rezultate tih

istraživanja nepouzdanima u smislu njihove interpretacije. Tako su u velikoj većini istraživanja kao rezultati mehaničkih ispitivanja dani samo iznos vlačne čvrstoće i modula elastičnosti [48] [49] [128] [129] ili je čak dana samo maksimalna sila pri kojoj su uzorci tkiva aorte pukli [47]. Ovo znači da je mehaničko ponašanje aorte opisano samo s dva podatka (vlačna čvrstoća i modul elastičnosti), a kako je poznato da se aorta ponaša kao pseudoelastični materijal tj. mehanički odziv joj je nelinearan, očito je da samo ova dva podatka nisu dovoljna da bi se opisao cijeli raspon mehaničkog odziva aorte. Aorta tijekom procesa deformiranja prolazi kroz tri područja različitog mehaničkog ponašanja (više o mehaničkom ponašanju aorte u poglavlju 3.) te je u tu svrhu minimalno potrebno odrediti modul elastičnosti za svako od ovih područja [17]. Idealno bi bilo izraziti ponašanje aorte preko konstitutivnih modela koji mogu opisati nelinearni odziv aorte u cijelom rasponu deformacija te preko ponašanja tih modela odrediti utjecaj dugotrajne pohrane.

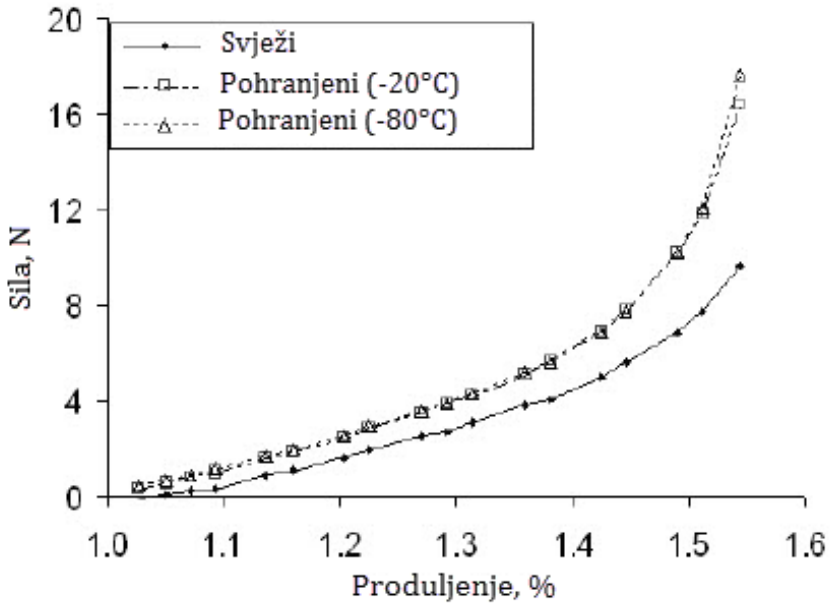
Dosadašnja istraživanja su pokazala kako pohrana aorti na niskim temperaturama mijenja njihova mehanička svojstva (Tablica 3.) pri čemu je zamijećen pad modula elastičnosti i vlačne čvrstoće u jednoosnim vlačnim testovima na uzorcima torakalne aorte [130].

Tablica 3. Mehanička svojstva u aksijalnom smjeru svježe i aorti odmrznutih nakon 1, 2 i 4 mjeseca [49]

Parametar		Svježa aorta	1 mjesec	2 mjeseca	4 mjeseca
Modul elastičnosti (MPa)	Srednja vrijednost	1,53	1,46	1,33	1,30
	SD	0,47	0,56	0,32	0,32
	Median	1,48	1,52	1,30	1,27
	Min	0,56	0,83	0,77	0,84
	Max	2,92	2,23	1,94	1,91
	P		0,497	0,489	0,487
Vlačna čvrstoća (MPa)	Srednja vrijednost	1,95	1,48	1,26	1,26
	SD	0,60	0,39	0,44	0,43
	Median	1,91	1,49	1,17	1,46
	Min	1,01	0,94	0,67	0,51
	Max	3,68	2,19	2,05	1,76
	P		0,477	0,472	0,474

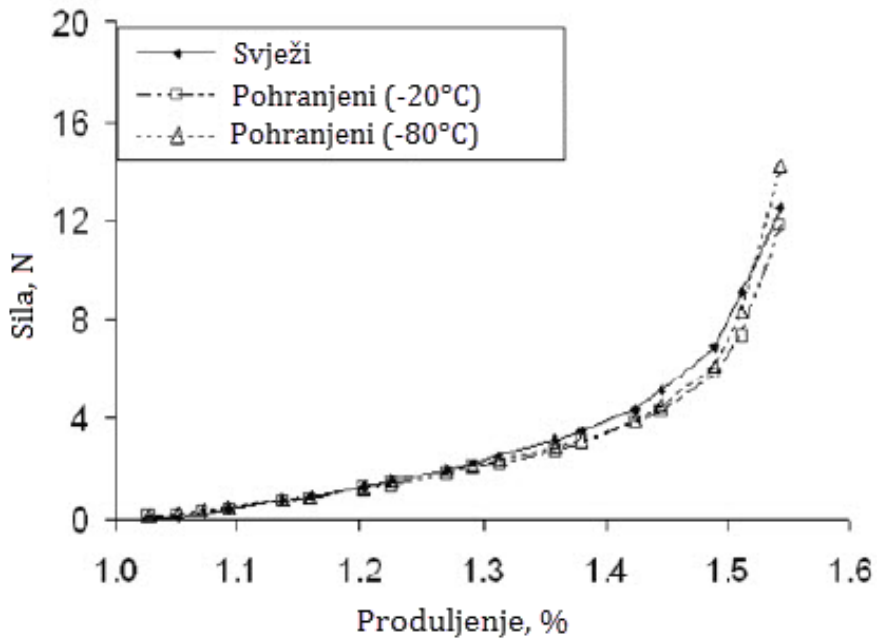
U gornjoj tablici prikazani modul elastičnosti je dan za zadnju, linearnu fazu opterećenja aorte u jednoosnom vlačnom testu što nikako ne može opisati mehaničko ponašanje u cijelom rasponu deformacija te upotreba samo ovog podatka daje nepotpun opis mehaničkog odziva aorte.

Najvažniji mehanizmi koji utječu na mehanička svojstava arterija prilikom zamrzavanja su gubitak živih stanica [47], oštećenje izvanstaničnog matriksa [130] ili kombinacija ova dva uzroka [131]. Tijekom procesa zamrzavanja dolazi do stvaranja kristala leda uslijed čega voda i otopljene tvari prolaze kroz staničnu membranu dehidrirajući tako stanicu. Ako je dehidracija značajna uslijed visoke razine elektrolita unutar stanice može doći do smrti same stanice [132] [133]. Dimetilsulfoksid (DMSO) krioprotektivna je tekućina koja ograničava masovni prijelaz vode i otopljenih tvari kroz staničnu membranu, sprječava stvaranje kristala leda te tako održava stanicu u pogodnom stanju za upotrebu nakon odmrzavanja [130] [134].



Slika 11. Mehaničko ponašanje svježe i odmrznute aorte u poprečnom smjeru [130]

U istraživanjima je također uočen porast krutosti kolagenskih vlakana na odmrznutim aortama naspram svježih uzoraka [135] [136] što je dovelo do povećane krutost u poprečnom (cirkularnom) smjeru odmrznute aorte (Slika 11.) u kojem su generalno usmjerena kolagenska vlakna [130]. Ovo navodi na potrebu ispitivanja svojstava aorte barem u dva poprečna smjera budući da se utjecaj zamrzavanja ne očituje jednako u rezultatima ispitivanja uzdužnih i poprečnih uzoraka tkiva aorte [130].



Slika 12. Mehaničko ponašanje svježe i odmrznute aorte u uzdužnom smjeru [130]

Iako je u većini radova uočena razlika u mehaničkim svojstvima aorte nakon odmrzavanja, zbog malog broja uzoraka, manjkave interpretacije ili rasipanja rezultata statistička značajnost ovih rezultata tek se treba utvrditi [49] [130] [137].

3. Mehaničko ponašanje tkiva aorte

Promjena mehaničkih svojstava aorte može biti uzrok niza patoloških promjena dok poznavanje ovih svojstava može značajno utjecati na dugotrajnu uspješnost transplantata što je detaljnije opisano u poglavljima 2.3.1. i 2.3.2. U ovom poglavlju dan je pregled dosadašnjih spoznaja o mehaničkom ponašanju aorte te teorijska pozadina potrebna za razumijevanje mehaničkog ponašanja odnosno materijalnih modela korištenih u ovom radu koji opisuju mehaničko ponašanje tkiva aorte.

Dosadašnja istraživanja pokazuju kako prilikom ispitivanja mehaničkog ponašanja aorte i mekih tkiva općenito, postoje određena svojstva koja čine biološka meka tkiva drugačijim od klasičnih, inženjerskih materijala [22] [24] [28], među kojima su najbitnija:

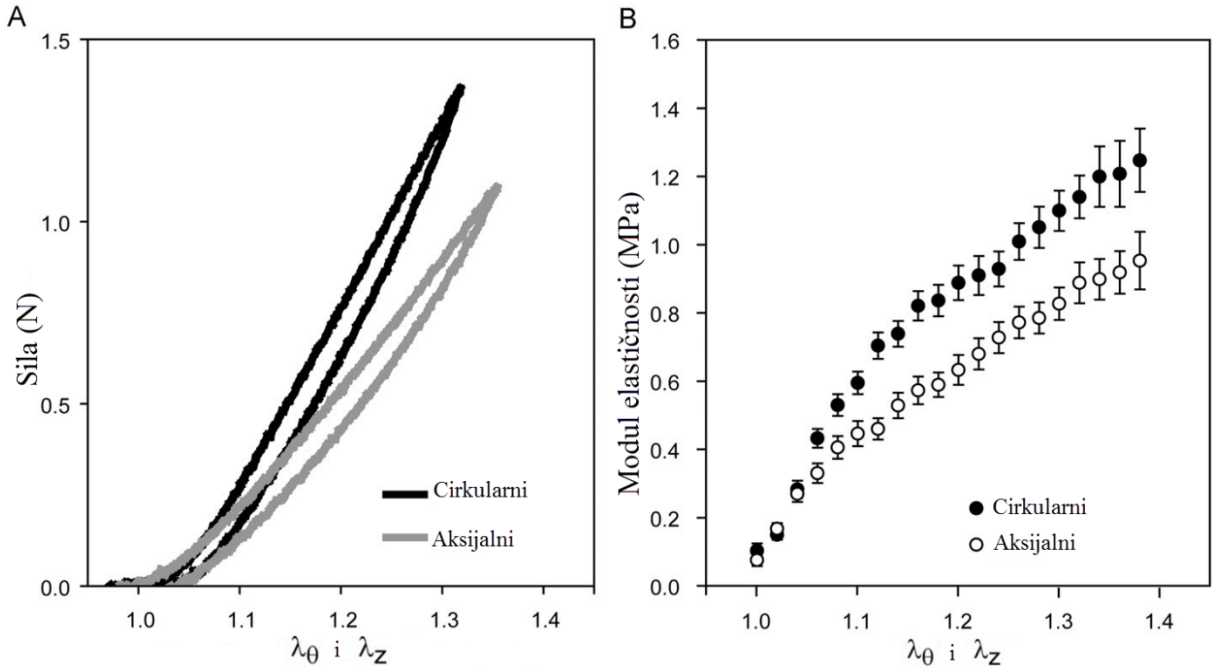
– anizotropnost,

– viskoelastičnost,

– nestlačivost tkiva i

– nelinearnost odnosa naprezanja i deformacije.

Anizotropnim materijalima svojstveno je da posjeduju različita svojstva u različitim smjerovima. Heterogena struktura tkiva aorte podrobnije opisana u drugom poglavlju za posljedicu ima heterogenu raspodjelu mehaničkih svojstava koja ovise o građi samog tkiva te o položaju i orijentaciji uzorka unutar aorte [138]. Ova anizotropnost jasno se očituje u rezultatima ispitivanja mehaničkog ponašanja aorte u dva poprečna smjera. Rezultati jednoosnih statičkih vlačnih testova (Slika 13.) pokazali su kako je mehanički odziv uzoraka aorte u uzdužnom smjeru znatno drugačiji od onog kod uzoraka uzetih u poprečnom smjeru aorte [139] [140] [141]. Slika 13. prikazuje rezultate jednoosnog statičkog vlačnog ispitivanja na uzdužnim i poprečnim uzorcima torakalne aorte gdje je ova razlika jasno vidljiva. Slika 13. A pokazuje odnos sile i pomaka u jednom ciklusu opterećenje-rasterećenje za uzdužne i poprečne uzorke, dok Slika 13. B pokazuje razliku modula elastičnosti uzdužnih i poprečnih uzoraka.



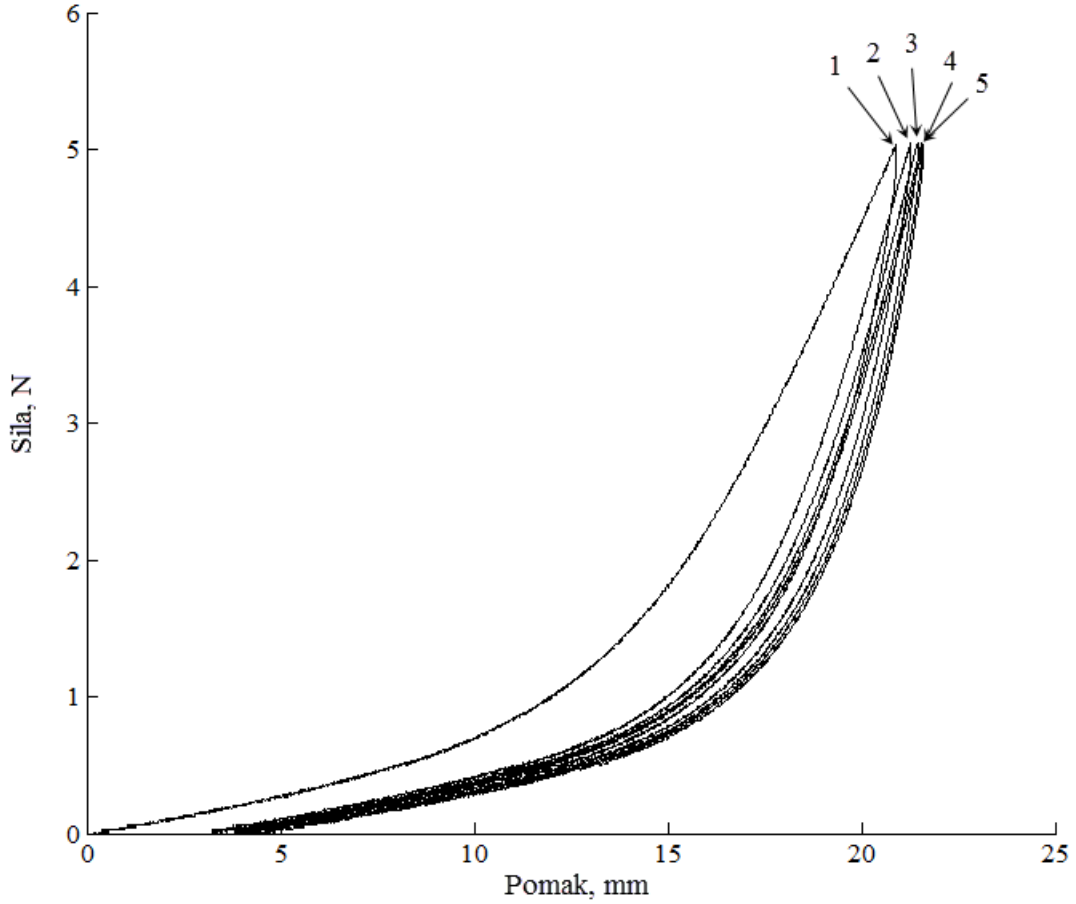
Slika 13. Razlika mehaničkih svojstava uzdužnog i poprečnog smjera aorte [141]

Istraživanja su pokazala kako se mehanička svojstva slojeva aorte također međusobno razlikuju [57] [59] [142].

Valja još jednom naglasiti kako se anizotropnost očituje lokalno, dakle mehanička svojstva funkcija su položaja i orijentacije ispitivanog uzorka unutar tkiva aorte. U inženjerskoj praksi česta je upotreba globalne izotropnosti temeljene na mehaničkom odzivu čitavog uzorka. Na primjer, kod kompozitnih materijala može biti nekoliko slojeva materijala različitih mehaničkih svojstava (dakle lokalna anizotropnost), dok na globalnoj razini zajedno mogu dati ortotropni ili čak izotropni odziv materijala [17]. Unatoč heterogenoj strukturi glavne komponente poput elastina, kolagena i glatkog mišića imaju specifičnu, točno određenu orijentaciju; tako je elastin u medijalnom sloju raspodijeljen u tankim koncentričnim slojevima, kolagen tipa I u vanjskom sloju (adventicija) uzdužno je orijentiran dok je glatki mišić u medijalnom sloju cirkularno orijentiran [17] [22]. U eksperimentalnim istraživanjima tkiva aorte često se koristi izotropni opis tkiva u dva poprečna smjera kako bi se dobio osnovni uvid u mehaničko ponašanje tkiva ili utjecaj patoloških promjena na ta svojstva [17] [143] [144].

U životnom vijeku čovjeka aorta je pod konstantnim cikličkim opterećenjem pulsirajuće krvi unutar njenog lumena, a orijentacija njenih konstituenata upravo je takva da osigura što efikasnije funkcioniranje aorte. Prilikom *in-vitro* ispitivanja koriste se uzorci

tkiva izdvojeni od ostatka žile te se pri cikličkom opterećenju vlakna elastina i kolagena usmjeravaju u pravcu naprezanja dok se pri rasterećenju pojavljuje histereza (Slika 13. A) u dijagramu *deformacija-naprezanje*. Površina unutar histereze ukazuje na energiju disipiranu uslijed zaostalih naprezanja te reorijentacije vlakana elastina i kolagena. Zaostala naprezanja javljaju se kao posljedica izdvajanja uzorka iz ostatka tkiva. Meka tkiva, pa tako i aorta, moraju se prije provođenja mehaničkih ispitivanja predkondicionirati tako da se ponovi onoliko ciklusa opterećenje-rasterećenje, koliko je potrebno da iščezne efekt histereze odnosno da tkivo poprimi svoje *in-vivo* stanje [22]. Ovako predkondicionirani uzorci daju prirodnu konfiguraciju tkiva u njegovom ravnotežnom stanju (eng. steady state) odnosno ponovljivi izgled krivulje *deformacija-naprezanje* za isti način opterećenja [17].

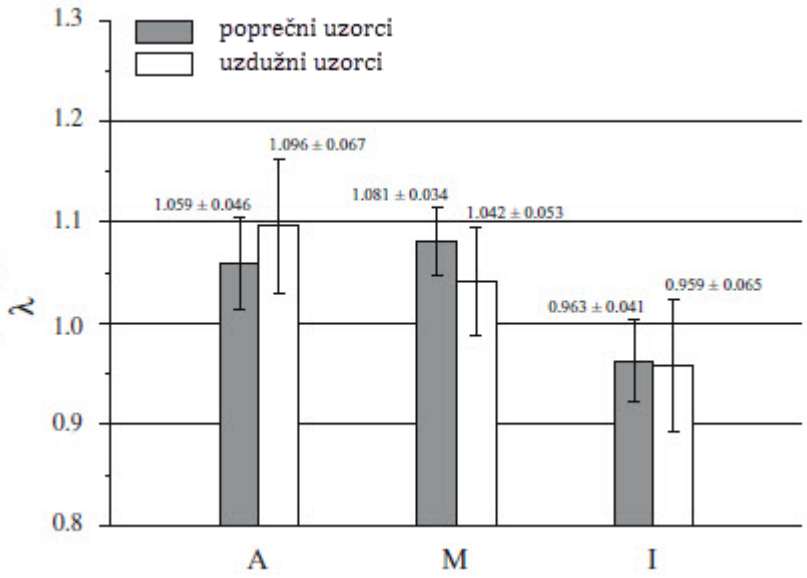


Slika 14. Predkondicioniranje uzorka aorte

Slika 14. prikazuje dijagram pomak-sila za predkondicioniranje aorte s pet ciklusa opterećenja pri čemu je vidljivo da već nakon tri ciklusa aorta postiže ponovljivi oblik

krivulje odnosno uklanja se efekt zaostalih naprezanja te tkivo dolazi u svoje ravnotežno stanje kakvo bi posjedovalo *in-vivo*.

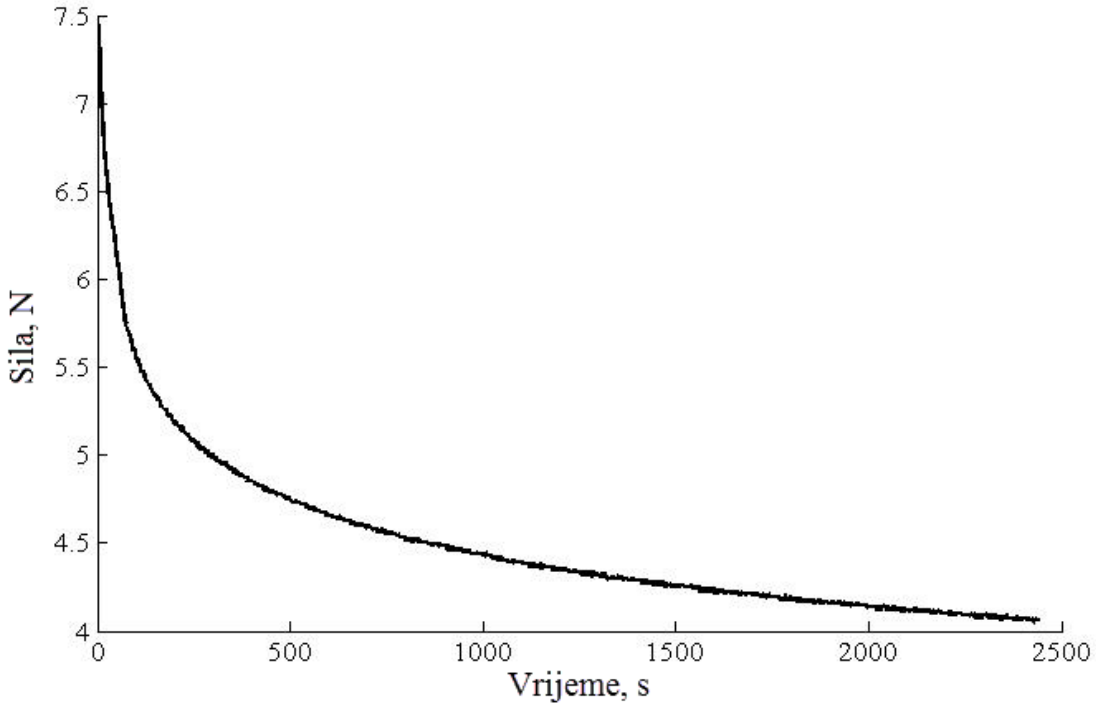
U istraživanjima zaostalih naprezanja u tkivu ljudske aorte uočeno je različito ponašanje uzdužnih i poprečnih uzoraka kao i samih slojeva aorte [142]. U ovom istraživanju zaostala naprezanja su definirana kao promjena geometrije uzoraka nakon što su izdvojeni iz okolnog tkiva. Ova promjena geometrije podrazumijeva promjenu duljine uzdužnih odnosno promjenu promjera poprečnih uzoraka nakon izdvajanja pri čemu istezanje iznosa 1 odgovara geometriji uzorka prije izdvajanja iz ostatka tkiva aorte (Slika 15.) [142].



Slika 15. Utjecaj zaostalih naprezanja na slojeve aorte u uzdužnom i poprečnom smjeru [142]

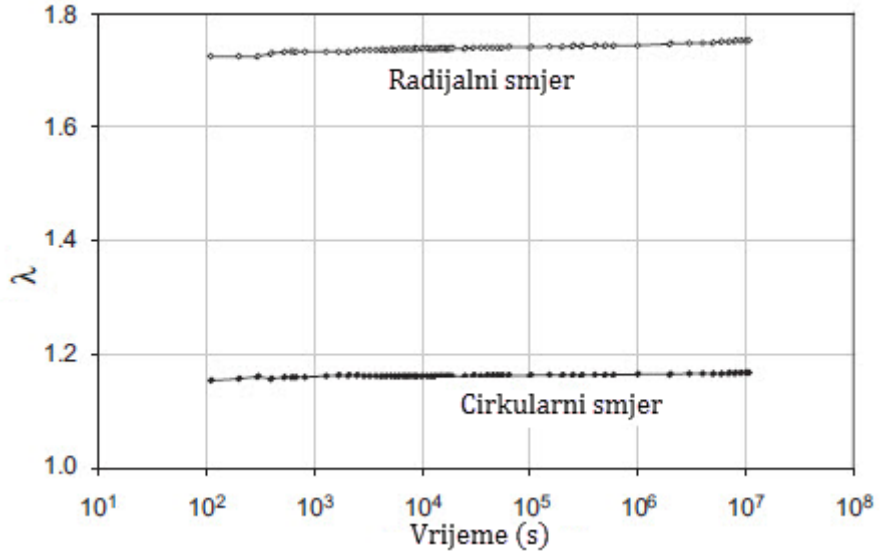
Rezultati ispitivanja (Slika 15.) pokazali su kako je u *in-vivo* stanju intima (I) pod tlačnim opterećenjem dok su adventicija (A) i medija (M) u zdravom tkivu aorte vlačno opterećene [142].

Uz elastične komponente poput elastina i kolagena tkivo aorte sastoji se velikim dijelom i od vode koja je viskozna tekućina [17] [24]. Iako relativno neosjetljivo na promjenu brzine deformiranja, mehaničko ponašanje tkiva aorte je viskoelastično što se može vidjeti ako se na tkivo aorte narine konstantna deformacija pri čemu dolazi do popuštanja (Slika 16.), karakterističnog za viskoelastične materijale [17] [24] [145].



Slika 16. Popuštanje tkiva aorte pri konstantnoj deformaciji

Ako se pak tkivo aorte drži pod konstantnim naprezanjem tada dolazi do puzanja (Slika 17.) koje je kod aorte gotovo zanemarivo [17] [24] [144] [145].



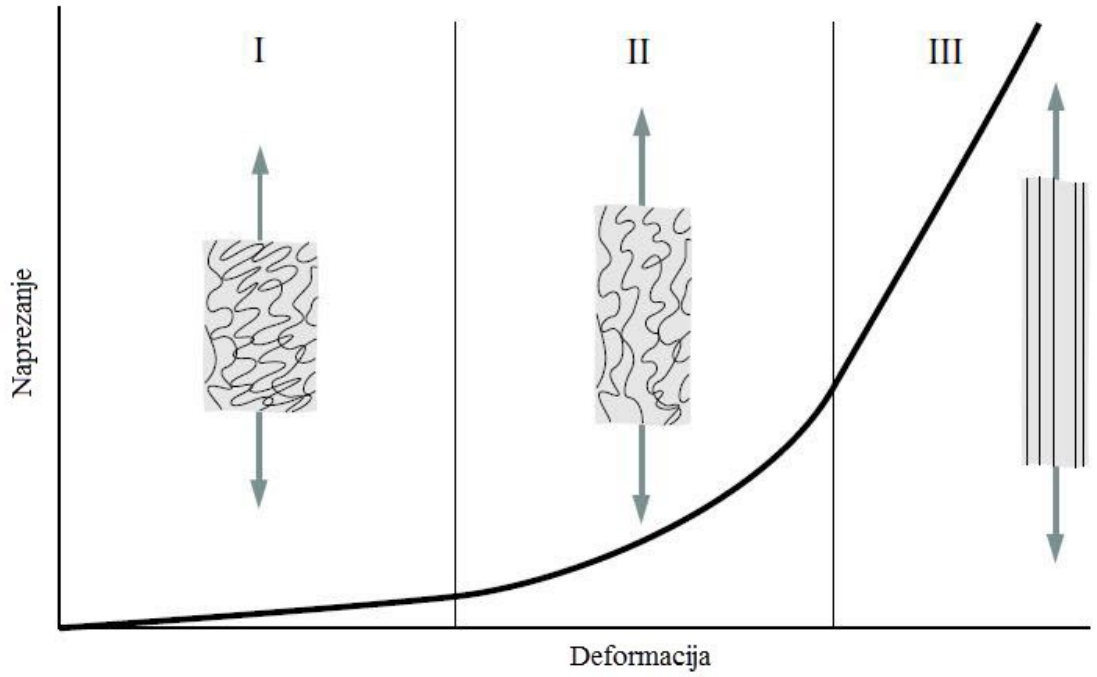
Slika 17. Puzanje tkiva aorte pri konstantnom opterećenju [145]

Sve arterije, pa tako i aortu, karakterizira udio vode u ukupnoj težini iznad 70% do 80%, a iako nije u potpunosti nestlačiva zbog gibanja vode unutar tkiva, istraživanja su

pokazala kako tkivo aorte iskazuje gotovo izohornu deformaciju kod velike većine promatranih opterećenja [17] [22] [24]. Ovo se temelji na činjenici da je volumni modul elastičnosti (mjera otpora prema tlačenju) kod aorte mnogo veći od smičnog modula elastičnosti (mjere otpora prema smicanju) [138].

Pretpostavka o nestlačivosti tkiva aorte veoma je važna prilikom formulacije konstitutivnih zakona budući da je u tom slučaju zbroj glavnih deformacija uvijek jednak nuli [138].

Mehaničko ponašanje materijala u užem smislu, odnos je između deformacije i naprezanja uslijed kojeg je nastala. Tipični inženjerski materijali poput legura čelika iskazuju male deformacije čak i pri velikim naprezanjima dok aorta doživljava velike deformacije već pri niskom naprezanju (Slika 18.) [138].



Slika 18. Tipični dijagram *deformacija-naprezanje* za meka tkiva [146]

Slika 18. prikazuje tri specifična područja dijagrama *deformacija-naprezanje* prilikom opterećivanja aorte. U prvom području (Slika 18.) mehaničko ponašanje tkiva aorte pod većinskim je utjecajem vlakana elastina koji se ponaša poput tanke izotropne gumene ploče [146]. Ovdje je uočljiva gotovo linearna veza deformacije i naprezanja te će se ovaj dio mehaničkog ponašanja u ovom istraživanju aproksimirati pravcem čiji nagib određuje modul elastičnosti E_1 koji će se odrediti provođenjem eksperimentalnog

ispitivanja uzoraka aorte. Također, vidljivo je i kako mali porast sile u ovom području uzrokuje velike deformacije.

U drugom području mehaničko ponašanje postaje izrazito nelinearno. U ovoj fazi počinje orijentacija vlakana kolagena u smjeru opterećivanja te ona počinju preuzimati dio opterećenja lagano se ispravljajući od svoje početne valovite, neopterećene strukture [146]. U svom *in-vivo* stanju pod fiziološkim opterećenjem aorta iskazuje upravo ovakvo ponašanje gdje su i vlakna elastina i kolagena pod utjecajem naprezanja [138] [146].

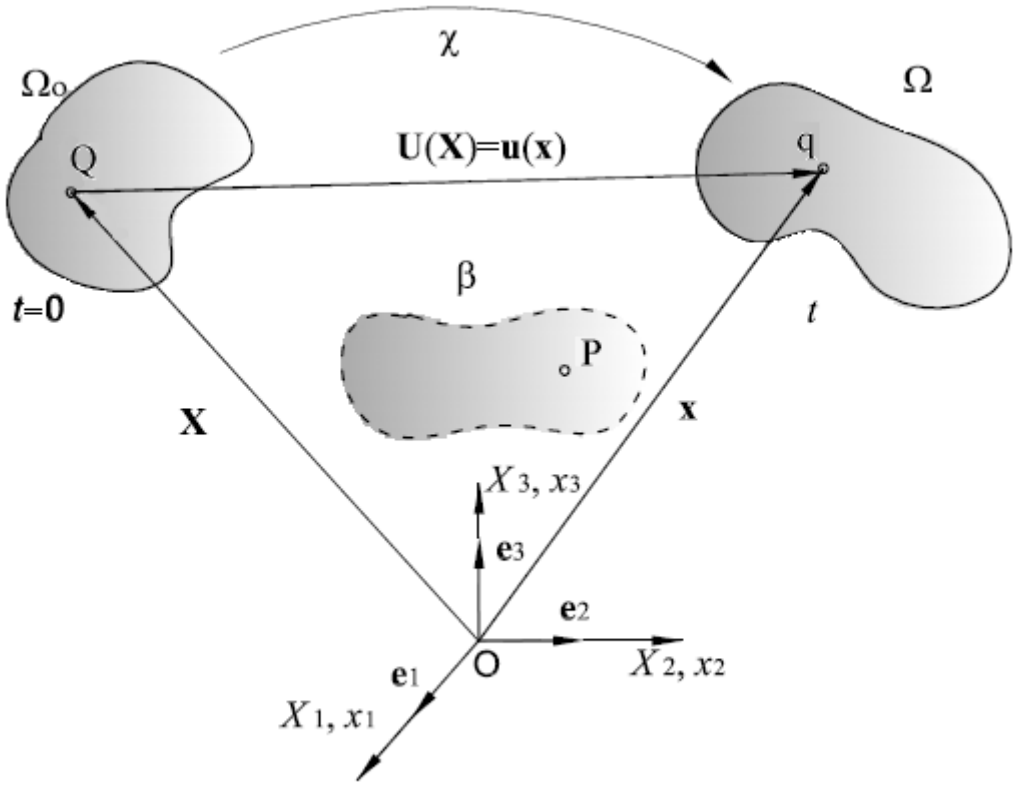
U posljednjoj, trećoj fazi, pri većim naprezanjima vlakna kolagena postaju gotovo potpuno ravna i usmjerena u pravcu opterećenja. Kolagenska vlakna značajno se opiru povećanju naprezanja [67] te u ovom području dolazi do povećanja krutosti cijelog uzorka pri čemu veza deformacije i naprezanja ponovno postaje linearna [57]. Kao i u prvom linearnom dijelu, drugi linearni dio mehaničkog ponašanja aorte aproksimiran je pravcem koji prolazi kroz točke dobivene eksperimentom. Nagib ovog pravca predstavlja modul elastičnosti E_2, tkiva aorte, u visokom rasponu deformacija. Nakon ove faze tkivo doseže vlačnu čvrstoću te počinje pucanje vlakana elastina, potom kolagena, a zatim i čitavog uzorka [146].

3.1. Kinematika kontinuuma

Mehaničko ponašanje materijala određeno je odnosom deformacije i naprezanja tj. pomakom promatrane točke tijela pod utjecajem sile, stoga je važno dobro opisati ovo gibanje. Budući da tkivo aorte već pri malim iznosima naprezanja prolazi kroz velike deformacije kako je pokazano u prethodnom poglavlju, za opis mehaničkog ponašanja tkiva aorte više nije prikladna linearna veza deformacije i naprezanja dana Hookeovim zakonom, kao ni jedinstveni modul elastičnosti budući da aorta prolazi kroz tri područja različitog mehaničkog odziva (Slika 18.) prilikom opterećivanja. Istraživanja su pokazala kako pretpostavka izotropnosti tkiva može dati osnovni uvid u mehaničko ponašanje aorte [17] [22].

Ako se pretpostavi izotropni mehanički odziv čitavog tkiva aorte te ga se opiše kao neprekinutu materiju određene mase, može se koristiti mehanika kontinuuma za

opisivanje gibanja točaka aorte odnosno deformiranja njenog tkiva. Budući da se prilikom promatranja ovog gibanja neće direktno analizirati sile pod čijim je utjecajem to gibanje nastalo, ovdje se govori o kinematskom gibanju kontinuuma. Deformacija i naprezanje koje uzrokuje ovo gibanje opisano je u idućem poglavlju.



Slika 19. Konfiguracija i pomak materijalnog tijela [147]

Slika 19. prikazuje gibanje materijalne točke P na tijela β koje je jednoliko ispunjeno materijom te posjeduje masu m. Referentni koordinatni sustav zadan je ishodištem O i jediničnim vektorima $\mathbf{e}_i$, i = 1, 2, 3. Prilikom gibanja, u početnom trenutku t = 0 tijelo β zauzima referentnu (materijalnu) konfiguraciju Ω_0 pri čemu točka P zauzima položaj Q u odnosu na ishodište O određen vektorom $\mathbf{X}$. Ako se u nekom trenutku t ($t > t_0$)materijalno tijelo β pomakne iz Ω_0 u položaj Ω tada se to naziva trenutnom (prostornom) konfiguracijom u kojoj se točka P nalazi na mjestu q određenom vektorom položaja $\mathbf{x}$. Komponente vektora $\mathbf{X} = X_I\mathbf{e}_I$ nazivaju se referentne (materijalne) koordinate, a komponente vektora $\mathbf{x} = x_i\mathbf{e}_i$ nazivaju se trenutne (prostorne) koordinate. Kako bi se opisalo gibanje materijalne točke kontinuuma potrebno je poznavati funkciju χ koja povezuje referentne koordinate $\mathbf{X}$ s trenutnim koordinatama $\mathbf{x}$ [147].

Očito je dakle kako se gibanje kontinuuma može zapisati na dva načina - kao funkciju pomaka materijalne ili prostorne koordinate.

Materijalni (referentni) opis gibanja, naziva se još i Lagrangeov, a prema njemu gibanje je dano kao funkcija materijalnih koordinata (X_1, X_2, X_3) i vremena t prema

$$\mathbf{x} = \chi(\mathbf{X}, t), \tag{3.1}$$

gdje χ predstavlja funkciju koja određuje trenutnu koordinatu $\mathbf{x}$ preko referentne koordinate $\mathbf{X}$.

Prostorni (trenutni) opis gibanja, naziva se još i Eulerov. Ovdje je gibanje dano kao funkcija prostornih koordinata (x_1, x_2, x_3) i vremena t prema

$$\mathbf{X} = \chi^{-1}(\mathbf{x}, t), \tag{3.2}$$

pri čemu je χ^{-1} inverzna funkcija gibanja koja prikazuje referentnu koordinatu $\mathbf{X}$ preko trenutne koordinate $\mathbf{x}$.

Pomak materijalne čestice (Slika 19.) određen je vektorom pomaka $\mathbf{U}$ za materijalne odnosno $\mathbf{u}$ za prostorne koordinate preko izraza:

$$\mathbf{U}(\mathbf{X}, t) = \mathbf{x}(\mathbf{X}, t) - \mathbf{X}, \tag{3.3}$$

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{x} - \mathbf{X}(\mathbf{x}, t). \tag{3.4}$$

Kako pomak materijalne čestice ne ovisi o izboru koordinatnog sustava, lako se može dokazati kako je $\mathbf{U}(\mathbf{X}, t) = \mathbf{u}(\mathbf{x}, t)$.

Izrazima (3.1) i (3.2) određeno je gibanje materijalnog tijela. Tijekom procesa deformiranja točke, linije, površine i volumeni na materijalnom tijelu transformiraju se iz materijalne u prostornu konfiguraciju. Opis ove transformacije i odnosa geometrijskih elemenata tijela u materijalnoj i prostornoj konfiguraciji osnova je kinematičke analize [147].

Tenzor gradijenta deformiranja $\mathbf{F}$ je linearni operator koji povezuje diferencijalni element linije d$\mathbf{X}$ u referentnoj konfiguraciji s diferencijalnim elementom d$\mathbf{x}$ u trenutnoj konfiguraciji na sljedeći način

$$\mathrm{d}\mathbf{x} = \mathbf{F}(\mathbf{X}, t)\ \mathrm{d}\mathbf{X}. \tag{3.5}$$

Kako je tenzor gradijenta deformiranja funkcija materijalnih koordinata, naziva se još i materijalni gradijent deformiranja, a opisuje gibanje u neposrednoj okolini materijalne

točke. Promatrajući gibanje tkiva aorte pod određenim naprezanjem, diferencijalni elementi linije d**X** tj. d**x** mogu se zamisliti kao linija koja spaja dvije susjedne točke tkiva aorte u referentnoj (neopterećenoj) odnosno trenutnoj (opterećenoj) konfiguraciji. Praćenjem gibanja ovih točaka tj. duljina mogu se dobiti pomaci odnosno deformacije tkiva aorte.

Kvadrat diferencijalnog elementa materijalne linije $(\mathrm{d}s)^2 = \mathrm{d}x_i \mathrm{d}x_i$ u referentnoj konfiguraciji povezan je s kvadratom diferencijalnog elementa u trenutnoj konfiguraciji $(\mathrm{d}s^o)^2 = \mathrm{d}X_i \mathrm{d}X_i$ preko tenzora deformiranosti **C** tako da je

$$\mathbf{C} = \mathbf{F}^T\mathbf{F} \tag{3.6}$$

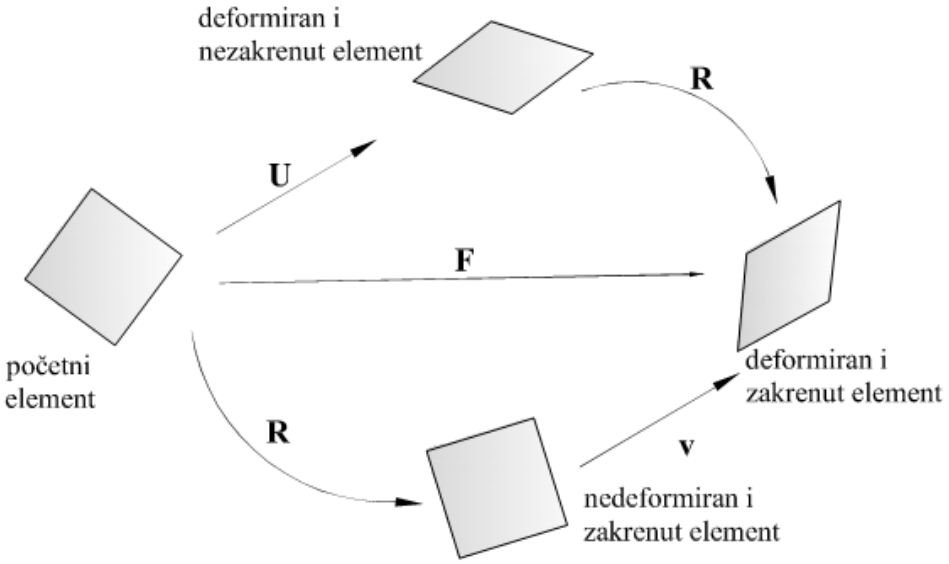
gdje je **C** desni Cauchy-Greenov tenzor deformiranosti.

Razlika kvadrata duljina $(\mathrm{d}s)^2 - (\mathrm{d}s^o)^2$ daje Lagrangeov tenzor deformacije, ponegdje i pod imenom Green-Lagrangeov tenzor deformacije **E**, oblika

$$\mathbf{E} = \frac{1}{2}(\mathbf{C} - \mathbf{I}), \tag{3.7}$$

pri čemu je **I** jedinična matrica ili matrica identiteta (eng. identity matrix).

Slika 20. prikazuje deformiranje elementa na dva načina ovisno o redoslijedu izvođenja rotacije i izduženja prema polarnom razlaganju tenzora deformiranja danom u (3.8) pri čemu se mogu razlikovati dva posebna slučaja; rotacija krutog tijela kod koje vrijedi $\mathbf{U} = \mathbf{v} = \mathbf{I}$ pa je $\mathbf{F} = \mathbf{R}$ te čisto rastezanje pri čemu je $\mathbf{R} = \mathbf{I}$ pa je $\mathbf{F} = \mathbf{U} = \mathbf{v}$.



Slika 20. Polarno razlaganje tenzora gradijenta deformiranja [147]

Tenzor gradijenta deformiranja može se kao i svaki nesingularni tenzor drugog reda rastaviti na ortogonalni i simetrični dio. Ortogonalni dio tenzora deformiranja $\mathbf{F}$ predstavlja tenzor zakreta $\mathbf{R}$ dok simetrični dio tenzora deformiranja ukazuje na izduženje elementa (Slika 20.). Ovisno da li se promatra izduženje u odnosu na referentnu ili trenutnu konfiguraciju može se simetrični dio tenzora deformiranja zapisati kao materijalni (desni) tenzor izduženja $\mathbf{U}$ ili prostorni (lijevi) tenzor izduženja $\mathbf{v}$ povezanih s gradijentom deformiranja preko izraza

$$\mathbf{F} = \mathbf{RU} = \mathbf{vR}. \tag{3.8}$$

Ovdje je tenzor zakreta $\mathbf{R}$ ortogonalni tenzor za kojeg vrijedi da je $\mathbf{R}^{\mathrm{T}}\mathbf{R} = \mathbf{I}$ i čija je determinanta jednaka jedinici, $\det \mathbf{R} = 1$. Tenzori izduženja $\mathbf{U}$ i $\mathbf{v}$ određeni su kao pozitivno definitni simetrični tenzori, a možgu se izraziti kao

$$\mathbf{U} = \sum_{i=1}^{3} \boldsymbol{\lambda}_i \mathbf{u}^{(i)} \otimes \mathbf{u}^{(i)}, \mathbf{v} = \sum_{i=1}^{3} \boldsymbol{\lambda}_i \mathbf{v}^{(i)} \otimes \mathbf{v}^{(i)} \tag{3.9}$$

gdje su $\boldsymbol{\lambda}_i, i = 1, 2, 3$ glavna istezanja odnosno svojstvene vrijednosti tenzora istezanja, dok su $\mathbf{u}^{(\mathrm{i})}$ i $\mathbf{v}^{(\mathrm{i})}$ svojstveni vektori tenzora istezanja $\mathbf{U}$ i $\mathbf{v}$. Glavna istezanja $\boldsymbol{\lambda}_i$ tvore invarijante desnog Cauchy-Greenovog tenzora deformiranosti $\mathbf{C}$ tako da je

$$I_1 = \mathrm{tr}(\mathbf{C}) = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2, \tag{3.10}$$

$$I_2 = \frac{1}{2}[I_1^2 + \mathrm{tr}(\mathbf{C^2})] = \lambda_1^2\lambda_2^2 + \lambda_2^2\lambda_3^2 + \lambda_3^2\lambda_1^2, \tag{3.11}$$

$$I_3 = \det(\mathbf{C}) = \lambda_1^2\lambda_2^2\lambda_3^2. \tag{3.12}$$

Ako se pretpostavi da je tkivo aorte nestlačivo kako je to uobičajeno u literaturi, mora biti zadovoljen uvjet

$$J = \det \mathbf{F} = \lambda_1\lambda_2\lambda_3 = 1, \quad I_3 = 1. \tag{3.13}$$

Ovdje J predstavlja Jacobijevu determinantu koja označava promjenu volumena u odnosu na referentnu konfiguraciju tako da je

$$J = \frac{dV}{dV_{\mathrm{o}}}. \tag{3.14}$$

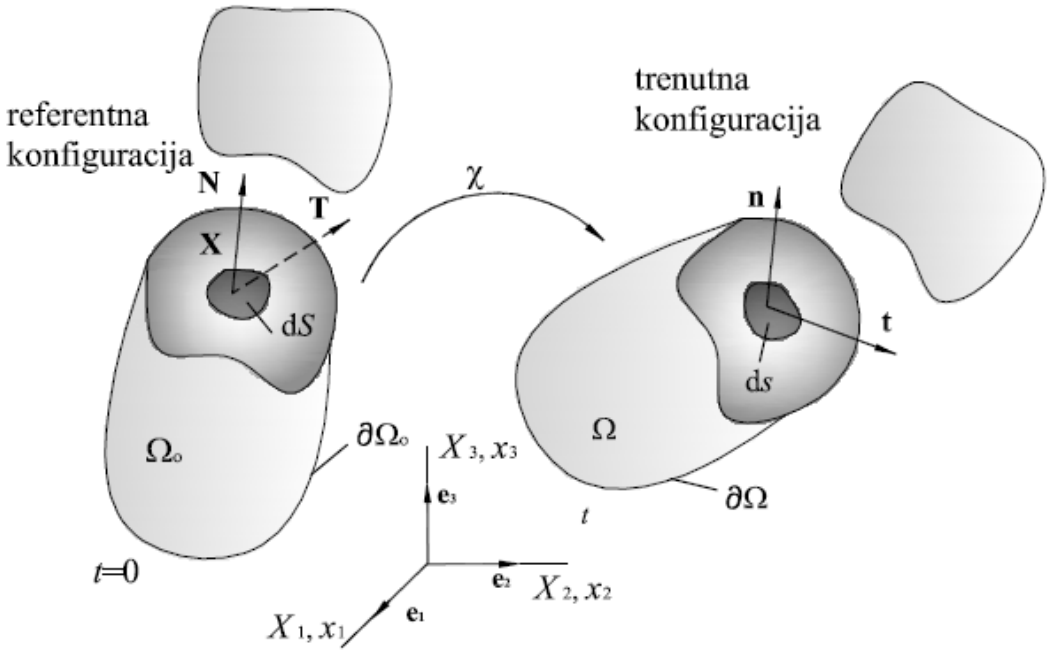
Gradijent deformiranja za jednoosno statičko opterećenje kakvo je narinuto na uzorke aorte u ovom istraživanju oblika je

$$\mathbf{F} = \begin{bmatrix} \lambda & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{\sqrt{\lambda}} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{\sqrt{\lambda}} \end{bmatrix}, \tag{3.15}$$

gdje je λ istezanje uzorka u smjeru opterećenja čiji je iznos omjer trenutne duljine l i početne duljine uzorka L_o tj. $\lambda = \frac{l}{L_o}$, a invarijante se određuju prema (3.10)i (3.11).

3.2. Tenzori naprezanja

Prilikom gibanja odnosno deformacije materijalnog tijela javlja se među susjednim točkama tijela naprezanje. Poznavanje naprezanja bitan je dio proučavanja bilo kojeg materijala budući da veza deformacije i naprezanja za neki materijal daje potpuni opis njegovog mehaničkog ponašanja. Tenzore naprezanja, kao i deformacije, može se zapisati u referentnoj ili trenutnoj konfiguraciji, stoga postoje i različiti zapisi od kojih će ovdje biti spomenuti samo oni zapisi tenzora naprezanja koji su najučestaliji u ovakvim istraživanjima.



Slika 21. Vektor naprezanja za referentnu i trenutnu konfiguraciju [147]

Slika 21. prikazuje materijalno tijelo β na koje djeluju površinske i obujamne sile, a koje u početnom trenutku $t = 0$ zauzima prostor Ω_0 omeđen rubnom plohom $\partial\Omega_0$, dok u nekom trenutku t zauzima prostor Ω omeđen rubnom plohom $\partial\Omega$. Ako se ovo tijelo presiječe tako da postoji presječna ploha dS u referentnoj i ds u trenutnoj konfiguraciji tako da je d$S \subset \partial\Omega_0$ te d$s \subset \partial\Omega$ moraju se na presječne plohe nanijeti sile koje će osigurati isto gibanje i deformaciju kao i prije presijecanja tijela β. Orijentacije presječnih ploha u prostoru definirane su jediničnim vektorom smjera $\mathbf{N}$ za referentnu i jediničnim vektorom smjera $\mathbf{n}$ za trenutnu plohu. Dio ukupne sile koja djeluje na elementarnim ploštinama ovih ploha označava se s d$\mathbf{f}$, a prema Cauchyjevom postulatu za elementarnu površinu vrijedi da je

$$\mathrm{d}\mathbf{f} = \mathbf{t}\mathrm{d}s = \mathbf{T}\mathrm{d}S, \tag{3.16}$$

gdje je ds elementarna ploština u trenutnoj konfiguraciji, dS elementarna ploština u referentnoj konfiguraciji, $\mathbf{t}$ Cauchyjev vektor naprezanja, a $\mathbf{T}$ je prvi Piola-Kirchhoffov vektor naprezanja.

Koristeći Cauchyjev teorem o naprezanju može se povezati vektor naprezanja $\mathbf{t}$ s tenzorom naprezanja $\boldsymbol{\sigma}$ i normalom $\mathbf{n}$ površine na kojoj naprezanje djeluje tako da je

$$\mathbf{t} = \boldsymbol{\sigma}^{\mathrm{T}}\mathbf{n}. \tag{3.17}$$

Ovdje je $\boldsymbol{\sigma}$ Cauchyjev tenzor naprezanja koji je definiran s obzirom na trenutnu konfiguraciju te opisuje stvarno naprezanje.

Na isti način može se povezati prvi Piola-Kirchhoffov vektor naprezanja $\mathbf{T}$ s tenzorom naprezanja $\mathbf{P}$ i normalom $\mathbf{N}$ na površinu djelovanja sile u referentnoj konfiguraciji preko izraza

$$\mathbf{T} = \mathbf{P}^{\mathrm{T}}\mathbf{N}, \tag{3.18}$$

gdje je $\mathbf{P}$ prvi Piola-Kirchhoffov tenzor naprezanja koji prema (3.18) povezuje trenutnu silu te početnu površinu zbog čega se često koristi u eksperimentima, a nešto rjeđe u numeričkim proračunima budući da je tenzor $\mathbf{P} = \mathrm{P}_{\mathrm{aA}}$ nesimetričan te dualan tj. jedan indeks mu se odnosi na trenutnu, a drugi na referentnu konfiguraciju.

Ova dva tenzora naprezanja mogu se koristeći jednadžbe (3.16) do (3.18) povezati tako da je

$$\mathbf{P} = \mathrm{J}\boldsymbol{\sigma}\mathbf{F}^{-\mathrm{T}}, \text{ te} \tag{3.19}$$

$$\boldsymbol{\sigma} = \mathrm{J}^{-1}\mathbf{P}\mathbf{F}^{\mathrm{T}} = \boldsymbol{\sigma}^{\mathrm{T}}. \tag{3.20}$$

Kako se u eksperimentalnom ispitivanju aorte pojavljuju velike deformacije već pri malim naprezanjima te zbog težeg praćenja trenutne površine, a time i stvarnog naprezanja $\boldsymbol{\sigma}$, često se koristi drugi Piola-Kirchhoffov tenzor naprezanja $\mathbf{S}$ koji je u potpunosti neovisan o gibanju krutog tijela te je u cijelosti definiran u referentnoj konfiguraciji tako da je

$$\mathbf{S} = \mathbf{F}^{-1}\boldsymbol{\tau}\mathbf{F}^{-\mathrm{T}}, \tag{3.21}$$

gdje je $\boldsymbol{\tau}$ Kirchhoffov tenzor naprezanja koji se od Cauchyjevog tenzora $\boldsymbol{\sigma}$ razlikuje samo za Jacobijan J

$$\boldsymbol{\tau} = \mathrm{J}\boldsymbol{\sigma}, \tag{3.22}$$

te se dalje drugi Piola-Kirchhoffov tenzor naprezanja može izraziti preko Cauchyjevog tenzora $\boldsymbol{\sigma}$ kao

$$\mathbf{S} = \mathrm{J}\mathbf{F}^{-1}\boldsymbol{\sigma}\mathbf{F}^{-\mathrm{T}}, \tag{3.23}$$

ili preko prvog Piola-Kirchhoffovog tenzora $\mathbf{P}$

$$\mathbf{S} = \mathbf{F}^{-1}\mathbf{P} \tag{3.24}$$

Prema (3.13) za nestlačive materijale vrijedi $\mathrm{J} = 1$ te je u tom slučaju Kirchhoffov tenzor naprezanja jednak Cauchyjevom tj. $\boldsymbol{\tau} = \boldsymbol{\sigma}$.

3.3. Energija deformiranja

Energija deformiranja (eng. strain energy) W povezuje naprezanje s deformacijama kod hiperelastičnih materijala poput gume i mekih bioloških tkiva kakva je aorta [18] [22], a općenito se može izraziti kao

$$W = \rho_0\psi, \tag{3.25}$$

gdje je ρ_0 gustoća nedeformiranog tijela dok ψ predstavlja raspodjelu energije deformacije po masi te se naziva Helmholtzova slobodna energija (eng. Helmholtz free energy), a ukazuje na rad koji neko tijelo može izvršiti u zatvorenom ciklusu pri

konstantnoj temperaturi i volumenu. Funkcija W ujedno predstavlja elastični potencijal tijela koji deriviran po vremenu daje snagu naprezanja (eng. stress power) w

$$w = \dot{W} = \frac{\mathrm{D}W}{\mathrm{D}t} = \rho_0 \dot{e} = \mathbf{S}\colon \dot{\mathbf{E}}, \tag{3.26}$$

pri čemu je $\dot{e}$ vremenska derivacija energije ψ. Za slučaj kada je energija deformiranja W zadana kao funkcija Green-Lagrangeovog tenzora deformacije $W = W(\mathbf{E})$ prema (3.26) slijedi nakon lančanog deriviranja

$$\frac{\mathrm{D}W}{\mathrm{D}t} = \frac{\partial W}{\partial \mathbf{E}} \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}, \tag{3.27}$$

te iz jednadžbi (3.26) i (3.27) slijedi izraz za drugi Piola-Kirchhoffov tenzor naprezanja

$$\mathbf{S} = \frac{\partial W(\mathbf{E})}{\partial \mathbf{E}}. \tag{3.28}$$

Na ovaj su način eksperimentalno dobiveni rezultati naprezanja $\mathbf{S}$ i deformacije $\mathbf{E}$ izraženi preko energije deformiranja W. Ova funkcija daje opis mehaničkog odziva ispitivanog materijala, a koristi se u materijalnim modelima mekih tkiva. Budući da je naprezanje $\mathbf{S}$ dano u referentnoj konfiguraciji ono se može lako odrediti iz eksperimentalnog ispitivanja, kao i istezanje λ_i implicitno sadržano u Green-Lagrangeovom tenzoru deformacije $\mathbf{E}$. Tako za poznavanje mehaničkog odziva aorte ostaje još samo odrediti oblik funkcije energije deformiranja $W(\mathbf{E})$.

4. Materijalni modeli

U poglavlju 3.2 pokazano je kako stvarno ili Cauchyjevo naprezanje $\boldsymbol{\sigma}$ zahtjeva poznavanje trenutne konfiguracije tj. vektora sile i površine na kojoj ta sila djeluje prema (3.16). U dobro planiranom eksperimentu praćenje sila prilikom ispitivanja trivijalan je problem budući da ih kidalica (uređaj za opterećivanje) sama prati prilikom čitavog ispitivanja te ih zapisuje u realnom vremenu. Metodom korelacije digitalne slike (eng. Digital Image Correlation) moguće je pratiti pomake točaka na površini uzorka, međutim. Međutim, pri eksperimentalnom ispitivanju aorte poznavanje trenutne površine poprečnog presjeka uzorka na koju djeluje sila iznimno je zahtijevan pothvat.

Iz ovog razloga razvijeni su materijalni modeli koji naprezanjima $\mathbf{S}$ i deformacijama $\mathbf{E}$ dobivenim eksperimentalnim ispitivanjima pridružuju funkciju energije deformiranja $W(\mathbf{E})$ tako da ona zadovoljava jednadžbu (3.28) te na taj način daje opis mehaničkog odziva ispitivanog materijala. Još od kraja 60.-ih godina prošlog stoljeća u eksperimentalnim ispitivanjima mehaničkog ponašanja mekog tkiva uočena je nelinearna veza drugog Piola-Kirchhoffovog tenzora naprezanja $\mathbf{S}$ i Green-Lagrangeove deformacije $\mathbf{E}$ te su razvijene eksponencijalne funkcije energije deformiranja [24] tako da je

$$\mathbf{S} = \frac{\partial W(\mathbf{E})}{\partial \mathbf{E}} = c e^{Q} \frac{\partial Q}{\partial \mathbf{E}}, \tag{4.1}$$

ovdje je c materijalni parametar kojeg treba identificirati, a Q je funkcija Green-Lagrangeovog tenzora deformacije $\mathbf{E}$. Funkcija Q ponegdje se naziva i funkcija mehaničkog odziva materijala (eng. response function) koja može poprimiti bilo koji oblik ali se zbog korelacije s eksperimentalnim rezultatima i jednostavnosti interpretacije najčešće uzima kao kvadratna funkcija [24].

Općeniti model koji može opisati izotermno mehaničko ponašanje za nestlačive materijale je oblika

$$\mathbf{S} = \frac{\partial W(\mathbf{F})}{\partial \mathbf{F}} - p\mathbf{F}^{-\mathbf{1}}, \qquad \det \boldsymbol{F} = 1, \tag{4.2}$$

gdje je p Lagrangeov multiplikator koji nameće uvijet nestlačivosti sličan onome kod djelovanja hidrostatskog tlaka [138]. U izrazu (4.2) naprezanje $\mathbf{S}$ je dano u referentnoj konfiguraciji te se kao i gradijent deformiranja $\mathbf{F}$ može odrediti iz eksperimentalnog ispitivanja. Ostaje dakle odrediti oblik funkcije $W(\mathbf{F})$ koji će najbolje opisati rezultate dobivene u ispitivanjima, a samim time i mehanički odziv aorte u zadanom načinu opterećenja.

Dodatno pojednostavljenje izraza (4.2) može se dobiti uz pretpostavku izotropnosti [24] te je onda energija deformiranja W funkcija invarijanti I_1, I_2 i I_3 Green-Lagrangeova tenzora deformacije tako da je

$$W = W(I_1, I_2, I_3). \tag{4.3}$$

Invarijante I_1, I_2 i I_3 definirane su u izrazima (3.10) do (3.12) preko istezanja λ iz čega slijedi kako se energija deformiranja kod izotropnih materijala može zapisati isključivo kao funkcija komponenti istezanja

$$W = W(\lambda_1, \lambda_2 \lambda_3). \tag{4.4}$$

Istezanja u (4.4) eksperimentalno se određuju promatrajući pomake točaka na površini uzorka aorte prilikom opterećenja. Pomaci se određuju iz pomaka čeljusti kidalice ili putem digitalnih kamera DIC metodom što je detaljnije opisano u poglavlju 5.1.2.

U nastavku slijedi opis hiperelastičnih fenomenoloških materijalnih modela dostupnih u FEM programu Abaqus 6.14-5 (Dassault Systemes, USA), a korišteni su u ovom istraživanju.

Uz pretpostavku izotropnosti te nestlačivosti ili gotovo nestlačivosti promatranog materijala, može se, razlažući energiju deformiranja na devijatorski i volumetrički dio, zapisati opći oblik funkcije energije deformiranja [148] kao

$$W = f(\bar{I}_1 - 3, \bar{I}_2 - 3) + g(J_{\mathrm{el}} - 1). \tag{4.5}$$

Ako se dalje raspiše $g = \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{D_i} (J_{\mathrm{el}}\text{-}1)^{2i}$, te ako se prva zagrada u izrazu (4.6) razvije u Taylorov red, dolazi se do izraza

$$W = \sum_{i+j=1}^{N} C_{ij} (\bar{I}_1\text{-}3)^{i} (\bar{I}_2\text{-}3)^{j} + \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{D_i} (J_{\mathrm{el}}\text{-}1)^{2i}. \tag{4.7}$$

Ovo je poopćeni polinomski oblik funkcije energije deformiranja koja se koristi u Abaqus programskom paketu, a iz koje se upotrebom određenih parametara C_{ij} te D_i može dobiti i ostale polinomske modele o kojima će više detalja biti u nastavku.

Poopćeni oblik reducirano-polinomskog modela može se dobiti tako da se u izrazu (4.7) svi parametri Cij u kojima je j≠0 izjednače s nulom, pa je izraz za reducirani polinomski model

$$W = \sum_{i=1}^{N} C_{i0} (\bar{I}_1\text{-}3)^{i} + \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{D_i} (J_{\mathrm{el}}\text{-}1)^{2i}. \tag{4.8}$$

Parametar N može poprimiti vrijednosti do 6, iako se u praksi rijetko upotrebljava $N > 2$ kada se uzimaju u obzir obje invarijante deformacije. C_{ij} te D_i su temperaturno zavisni

parametri koje, kao i N, bira sam korisnik. Elastična volumenska deformacija J_{el} slijedi iz ukupne deformacije J te toplinske volumske deformacije J_{th}, gdje je

$$J_{\text{el}} = \frac{J}{J_{th}}, \tag{4.9}$$

pri čemu J_{th} slijedi iz linearne toplinske ekspanzije ε_{th} preko izraza

$$J_{\text{th}} = (1 + \varepsilon_{th})^3. \tag{4.10}$$

Ovdje ε_{th} slijedi iz temperature te koeficijenta izotropne toplinske ekspanzije koju definira sam korisnik. Vrijednost parametra D_i određuje razinu kompresibilnosti materijala, odnosno, ako su svi parametri D_i jednaki 0, tada je materijal koji opisuju ove komponente potpuno nestlačiv. Također, vrijedi ako je $D_1 = 0$ da su i ostali parametri $D_i = 0$. Kako bi se popustio (ublažio) strogi kriterij nestlačivosti te olakšao numerički pristup rješavanja ovakvih problema često valja omogućiti određenu razinu stlačivost materijala.

Kako bi se odredili keoficijenti materijalnih modela, u Abaqus programskom paketu, metodom najmanjih kvadrata interpoliraju se zadani modeli s rezultatima eksperimentalnih ispitivanja danima u obliku inženjerske deformacije i inženjerskog naprezanja. Regresijskom analizom dobiva se koeficijent korelacije R koji opisuje jakost lienarne veze dvaju varijabli. Ovaj koeficijent poprima vrijednosti od -1 do 1 pri čemu 0 predstavlja nedostatak veze između varijabli, -1 predstavlja suprotnu, dok 1 označava potpunu korelaciju eksperimentalnih rezultata i promatranog modela.

Postoji nekoliko formi zapisa funkcije energije deformiranja W dostupnih u Abaqusu [148] kojima se mogu modelirati gotovo nestlačivi izotropni elastomeri, a korisni su i pri identifikaciji mehaničkih svojstava sličnih (bioloških) materijala koji prolaze kroz velike deformacije gotovo ne mijenjajući volumen. Modeli koji su najčešće korišteni u sličnim istraživanjima su:

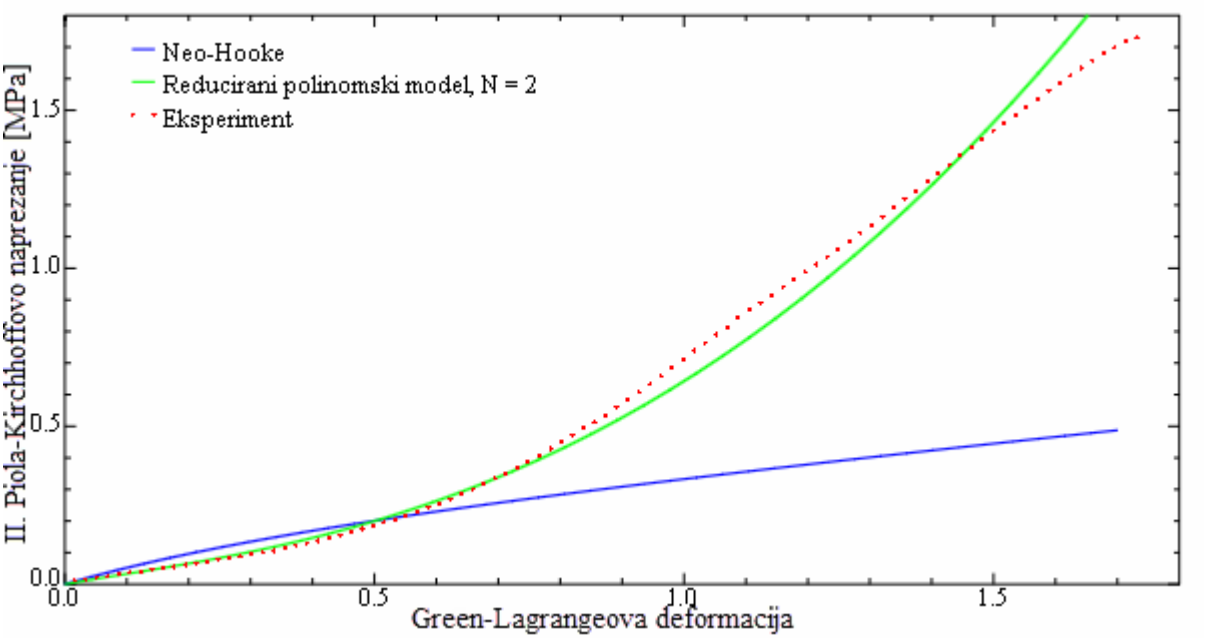
1) Neo-Hooke
2) Mooney-Rivlin
3) Ogden
4) Yeoh.

4.1. Neo-Hooke

Može se smatrati posebnim oblikom reducirano polinomskog modela odnosno specijalnim slučajem Mooney-Rivlin modela u kojem je parametar $C_{01} = 0$, odnosno funkcija energije deformiranja je oblika

$$W = C_{10}(\bar{I}_1 - 3) + \frac{1}{D_1}(J_{el} - 1)^2. \tag{4.11}$$

Iako je dobar izbor za opis materijala uz manji broj dostupnih podataka te pri malim deformacijama, zbog svoje linearne veze s prvom invarijantom deformacije nije prikladan za opis mehaničkog ponašanja pri velikim deformacijama (Slika 22.).



Slika 22. Neo-Hook i reducirani polinomski model (N = 2) pridruženi eksperimentalnim rezultatima

Također valja napomenuti kako ovo nije samo matematički model budući da funkcija koja ga opisuje predstavlja Helmholtzovu slobodnu energiju ψ molekularne mreže prikazane kao Gaussov mrežni model. U takvom modelu biološke makromolekule prikazane su kao mreža masa povezanih oprugama.

4.2. Mooney-Rivlin

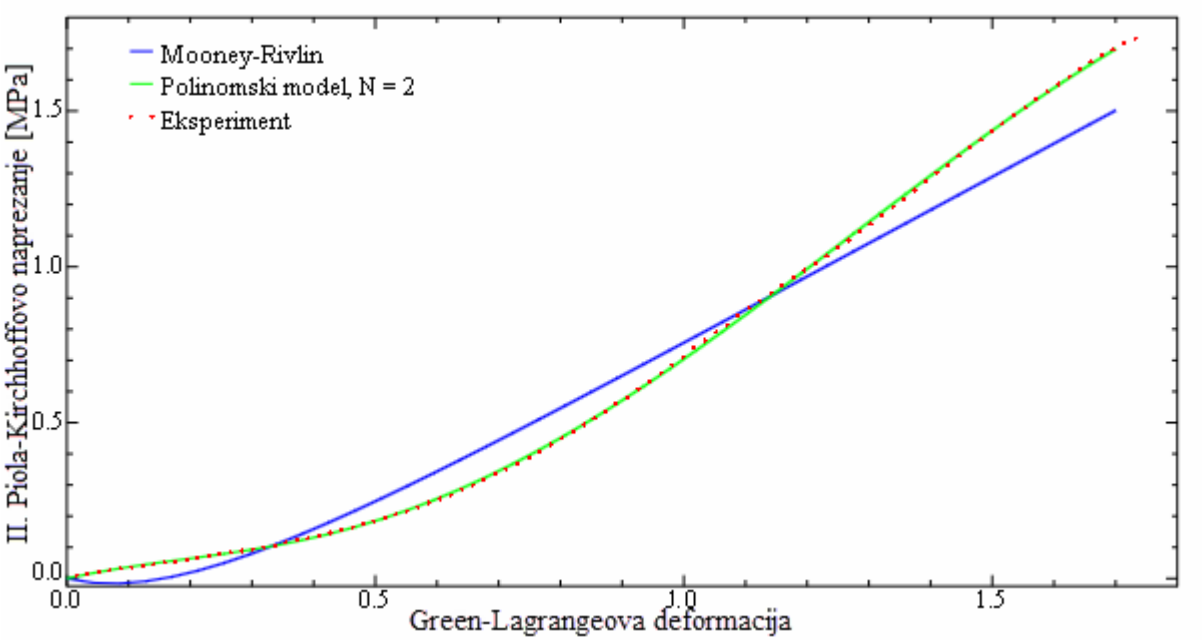
Dvoparametarski fenomenološki konstitutivni model koji uspijeva dobro opisati mehanički odaziv širokog spektra hiperelastičnih materijala do velikih deformacija. Ovaj model može se smatrati proširenjem neo-Hookeovog modela pri čemu se ovdje dodaje zavisnost o drugoj invarijanti Cauchy-Greenovog tenzora deformacije. U nekim slučajevima će ovaj model dati bolje rezultate pri identifikaciji svojstava no treba imati na umu da su i Mooney-Rivlin i neo-Hook modeli u kojima je energija deformiranja samo linearna funkcija invarijanti deformacije. To znači da ti modeli nisu u stanju opisati gornji dio *S-krivulje deformacija-naprezanje* pri velikim deformacijama. Funkcija energije deformiranja je oblika:

$$W = C_{10}(\bar{I}_1\text{-}3) + C_{01}(\bar{I}_2\text{-}3) + \frac{1}{D_1}(J^{\text{el}} - 1)^2, \tag{4.12}$$

gdje su C_{10}, C_{01} i D_1 materijalni parametri zavisni o temperaturi, a $\bar{I}_1$ i $\bar{I}_2$ su devijacijske invarijante deformacije defirnirane kao

$$\begin{aligned} \bar{I}_1 &= \bar{\lambda}_1^2 + \bar{\lambda}_2^2 + \bar{\lambda}_3^2, \\ \bar{I}_2 &= \bar{\lambda}_1^{(-2)} + \bar{\lambda}_2^{(-2)} + \bar{\lambda}_3^{(-2)} \end{aligned} \tag{4.13}$$

pri čemu su devijacijska istezanja $\bar{\lambda}_i = J^{-1/3}\,\lambda_i$, a J je ukupna promjena volumena povezana s elastičnom promjenom J_{el} preko izraza (4.9).



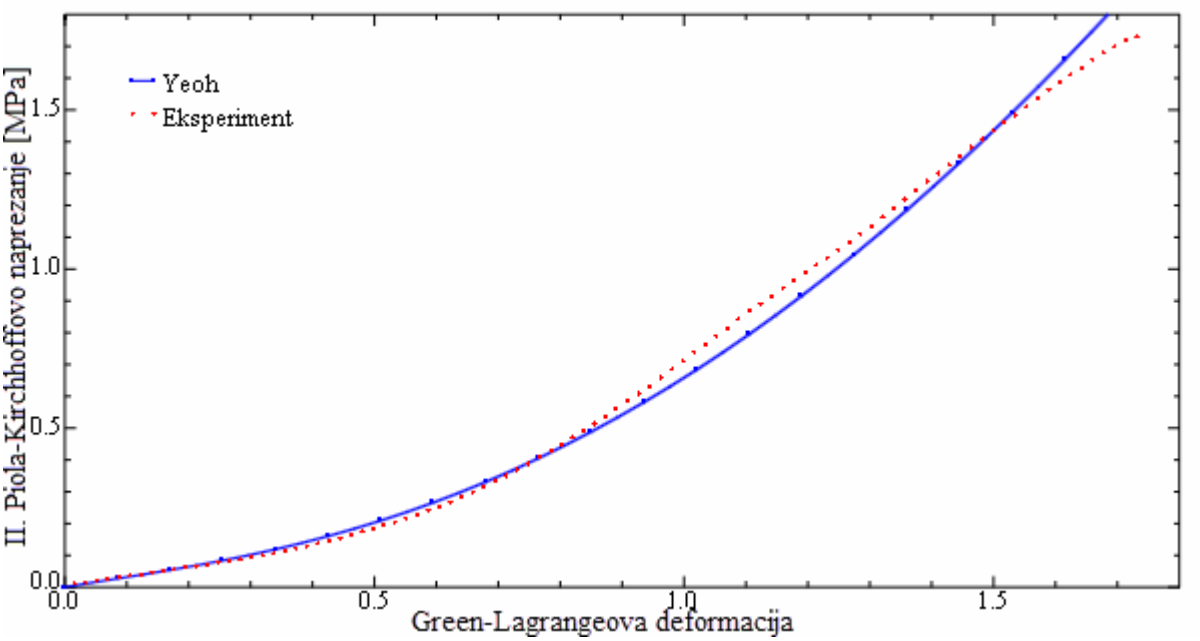
Slika 23. Mooney-Rivlin i polinomski model (N = 2) pridruženi eksperimentalnim rezultatima

Slika 23 prikazuje Mooney-Rivlinov materijalni model pridružen rezultatima eksperimentalnog ispitivanja te je vidljivo kako zbog svoje linearnosti nije u mogućnosti dobro opisati mehanički odaziv aorte dok je polinomski model (N =2) pogodniji za zapis velikih deformacija kakve bilježi tkivo aorte prilikom ispitivanja.

4.3. Yeoh

Godine 1993., Yeoh [149] je predložio fenomenološki model u obliku polinoma trećeg reda temeljenog samo na prvoj invarijanti I_1. Prvotno korišten za karakterizaciju mehaničkog ponašanja gume, Yeoh-ov model u biomehaničkim ispitivanjima krvnih žila može opisati povećanje nagiba krivulje naprezanje-deformacija odnosno povećanje krutosti žile prilikom uključenja kolagenskih vlakana u proces opterećenja (Slika 18). Model ima dobru prilagodbu za veliki raspon naprezanja (Slika 24.) i može simulirati različite oblike deformacije s ograničenim brojem podataka. To dovodi do smanjenja broja potrebnih ispitivanja materijala [150]. Ovaj model također se naziva reducirani polinomski model i za stlačivu gumu energija deformiranja je oblika

$$W = \sum_{i=1}^{3} C_{i0} (\bar{I}_1\text{-}3)^i + \sum_{i=1}^{3} \frac{1}{D_i} (J_{el}\text{-}1)^{2i}. \tag{4.14}$$



Slika 24. Opisivanje eksperimentalnih rezultata Yeoh-ovim materijalnim modelom

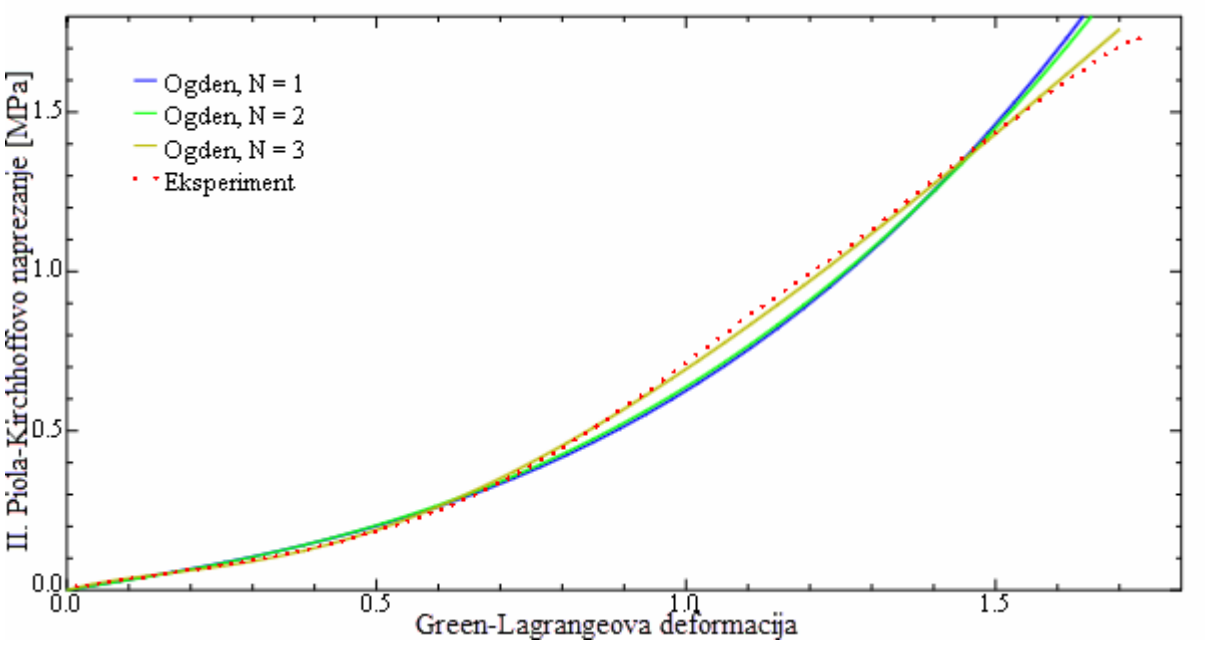
S-krivulja u dijagramu *deformacija-naprezanje*, tipična za mehanički odziv aorte, određena je odnosom koeficijenata ovog modela tako što je; ako za prvi koeficijent C_{10} smatramo da je $C_{10} = 1$, tada je drugi C_{20} negativan i za red veličine ili dva manji od prvog dok je treći koeficijent C_{30} pozitivan te ponekad manji od drugog za red veličine do dva. Pri malim deformacijama C_{10} predstavlja početni modul smičnosti koji se smanjuje povećanjem deformacije kada počinje utjecaj negativnog koeficijenta C_{20}. Pri većim deformacijama pozitivan koeficijent C_{30} zadužen je za opis gornjeg dijela *S-krivulje* što mu omogućava dobar opis mehaničkog odziva tkiva aorte i pri velikim deformacijama.

4.4. Ogden

Model temeljen na Ogdenovom fenomenološkom pristupu, a osnova mu je teorija elastičnosti [151]. Energija deformiranja dana je kao funkcija nominalnog istezanja u poočenom obliku

$$W = \sum_{i=1}^{3} \frac{\mu_i}{\alpha_i} (\bar{\lambda}_1^{\alpha_i} + \bar{\lambda}_2^{\alpha_i} + \bar{\lambda}_3^{\alpha_i} - 3) + \sum_{i=1}^{3} \frac{1}{D_i} (J_{el}-1)^{2i}, \quad (4.15)$$

gdje je $\bar{\lambda}_i = J^{-\frac{1}{3}}\lambda_i$, te $\bar{\lambda}_1\bar{\lambda}_2\bar{\lambda}_3 = 1$. Vrijednost parametra N, te temperaturno zavisnih koeficijenata u_i, i α_i zadaje korisnik. U dosadašnjim ispitivanjima postignuta je dobra konvergencija modela s eksperimentalnim rezultatima (Slika 25.) već pri $N = 3$ [152]. Iz izraza (4.15) može se zaključiti kako u Ogdenovom modelu energija deformiranja nije eksplicitna funkcija invarijanti devijatorskog tenzora deformacije $\bar{I}_1$ i $\bar{I}_2$ kako je to u ostala tri modela, no moguće je eksplicitno povezati derivaciju energije deformiranja W s invarijantama $\bar{I}_1$ i $\bar{I}_2$.



Slika 25. Ogden (N = 1, 2, 3) materijalni modeli pridruženi eksperimentalnim rezultatima

4.5. Druckerov kriterij stabilnosti

Ako materijalni model nije definiran na zadovoljavajući način, numerička analiza rezultata eksperimentalnih ispitivanja može dovesti do netočne ili nepotpune interpretacije mehaničkog ponašanja aorte, budući da se ovdje radi o složenom, nelinearnom problemu. Kako bi se određeni model smatrao stabilnim, definiran je skup matematičkih kriterija kojima se ograničavaju mogući odnosi naprezanja i deformacija

odnosno dopuštaju se samo oni koji imaju fizikalni smisao [153] [154]. Ovaj kriterij naziva se još i Hillov kriterij stabilnosti, a kaže da je neki materijal stabilan ako primjena određenog opterećenja dovodi do stvarne deformacije očekivane za taj materijal. Suprotno tome, materijalni model je nestabilan ako za određenu vrijednost naprezanja dolazi do proizvoljne (nasumične) deformacije. Materijali koji zadovoljavaju Druckerov (Hillov) kriterij nazivaju se stabilni te su općenito dobro prilagođeni za numeričku analizu gdje će ovakav materijal puno rjeđe dovesti do numeričkih poteškoća poput singularnosti ili divergencije rješenja [153].

Druckerov kriterij stabilnosti vezan je za promjenu unutarnje energije tijekom procesa deformiranja. Naime, tijekom deformiranja materijala očekuje se da unutarnja energija strogo raste kako se povećava deformacija tog materijala. Ovo možemo zapisati kao

$$\mathrm{d}\boldsymbol{\sigma} : \mathrm{d}\boldsymbol{\varepsilon} \geq 0, \tag{4.16}$$

gdje $\mathrm{d}\boldsymbol{\sigma}$ predstavlja prirast tenzora naprezanja, a $\mathrm{d}\boldsymbol{\varepsilon}$ je prirast tenzora deformacije. Ove dvije veličine međusobno su povezane u konstitutivnim jednadžbama.

Nestabilnost se može ograničiti promjenom promatranog područja deformacije. Naime, pri jako malim deformacijama može se šum s upravljačke jedinice kidalice pomiješati sa stvarnim rezultatima te dovesti do rezultata koje je teško interpretirati, dok pri velikim deformacijama dolazi do pucanja vlakana te u tom trenutku povećana deformacija može dovesti do smanjenja u naprezanju na što je također potrebno pripaziti prilikom numeričke obrade rezultata budući da ranije navedeni modeli u većini slučajeva nisu u stanju opisati ovaj dio mehaničkog ponašanja aorte.

5. Metodologija

U ovom poglavlju dan je pregled metoda korištenih u provedenom istraživanju.

Prvo je opisana metoda korelacije digitalne slike - DIC (eng. Digital Image Correlation) kojom se prate pomaci velikog broja točaka na površini uzoraka što predstavlja značajan iskorak u odnosu na slična istraživanja.

Krioprezervacija je standardizirana metoda dugotrajne pohrane bioloških tkiva za buduću upotrebu. Ova metoda iskorištena je za pohranu aorti u provedenom istraživanju te je ovdje detaljno opisana.

5.1. Korelacija digitalne slike

U dosadašnjim istraživanjima utjecaja krioprezervacije na mehanička svojstva aorti, za određivanje deformacija koristili su se pomaci dviju točaka dobivenih iz pomaka čeljusti kidalice u jednoosnim [155] ili četiriju točaka u dvoosnim statičkim vlačnim testovima [156]. Nedostaci ovakvih metoda su:

- nemogućnost kvalitetnog opisivanja nelinearnih odnosa naprezanja i deformacije,
- nepostojanje uvida u mehaničko ponašanje tkiva između dvije odnosno četiri mjerne točke, te
- osjetljivost na gibanja krutog tijela budući da kidalica ne raspoznaje proklizavanje uzorka u čeljustima već bilježi pomake samih čeljusti.

Korištenjem metode korelacije digitalne slike (eng. DIC – Digital Image Correlation) moguće je dobiti iznose pomaka velikog broja točaka na površini uzorka te na taj način dobiti uvid u mehaničko ponašanje čitavog tkiva. Ova metoda koristi princip objektnog rastera kakvim raspolaže optički mjerni sustav Aramis (GOM GmbH, Njemačka) korišten u ovom istraživanju za bezkontaktno mjerenje pomaka uzorka. Sustav se koristi za trodimenzionalno mjerenje promjene oblika površina objekata opterećenih statičkim ili dinamičkim opterećenjima, u realnom vremenu [157].

Zavisno o pripremi mjernih uzoraka, ispitnom okruženju i kompleksnosti eksperimenta, sustav Aramis može odrediti deformacije s točnošću do 0,01%, a ukoliko su poznata svojstva materijala program može izračunati i komponente tenzora naprezanja [158].

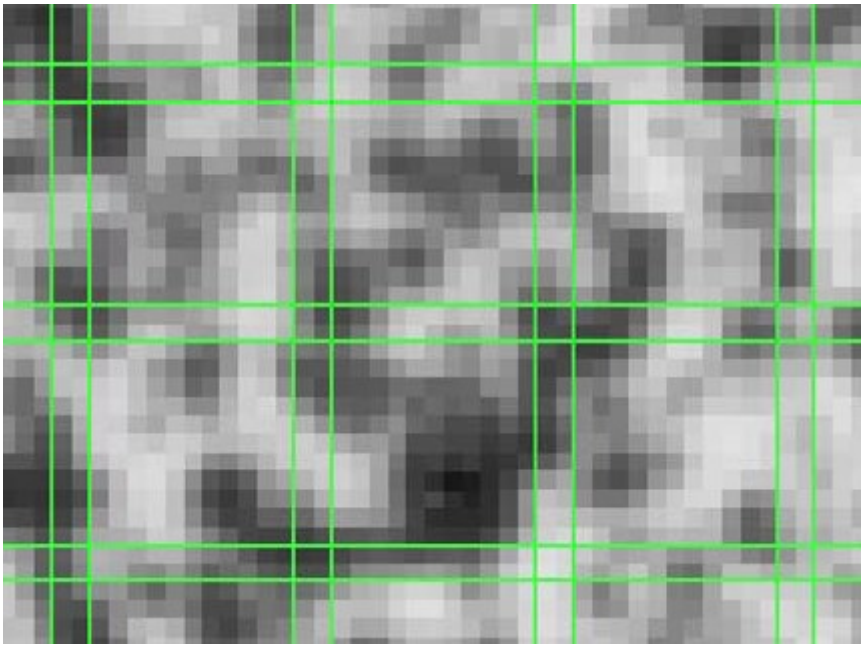
Sustav koji je korišten u ovom eksperimentu (Slika 26.) sastoji se od sljedećih osnovnih elemenata:

- dvije digitalne CCD (eng. charge-coupled device) kamere Dalsa Falcon 4M60 s frekvencijom od 60 do 480 Hz i rezolucijom 2358×1728 piksela,
- dvije leće 50 mm Titanar,
- kalibracijskog objekta CP20/MV90×72,
- upravljačke jedinice s foto senzorom i tipkalom,
- rasvjetne jedinice LEDscale 30372-0001A 30°,
- dva framegrabber-a X64CL iPro,
- programskog paketa Aramis v6.3.



Slika 26. Optički sustav Aramis za mjerenje pomaka DIC metodom (GOM GmbH, Njemačka)

Metoda objektnog rastera koristi algoritam koji uspoređuje vrijednost sive skale na površini uzorka te traži područja ekvivalentne vrijednosti u svim snimkama pojedinog mjerenja. U tu svrhu potrebno je na površinu ispitivanog uzorka nanijeti crno-bijeli raster odnosno stohastički raspodijeljene crne točkice na bijeloj podlozi ili obratno. Kako bi algoritam lakše identificirao područja jednake razine sive skale bitno je osigurati stohastičnost rasporeda crno-bijele boje na površini ispitnog uzorka. Slike dobivene ovim postupkom prvo se dijele na osnovne slikovne elemente tzv. fasete (Slika 27.) koje predstavljaju mjerne točke čija se veličina definira u pikselima, a preklapanje između njih se također mjeri u broju preklapajućih piksela.



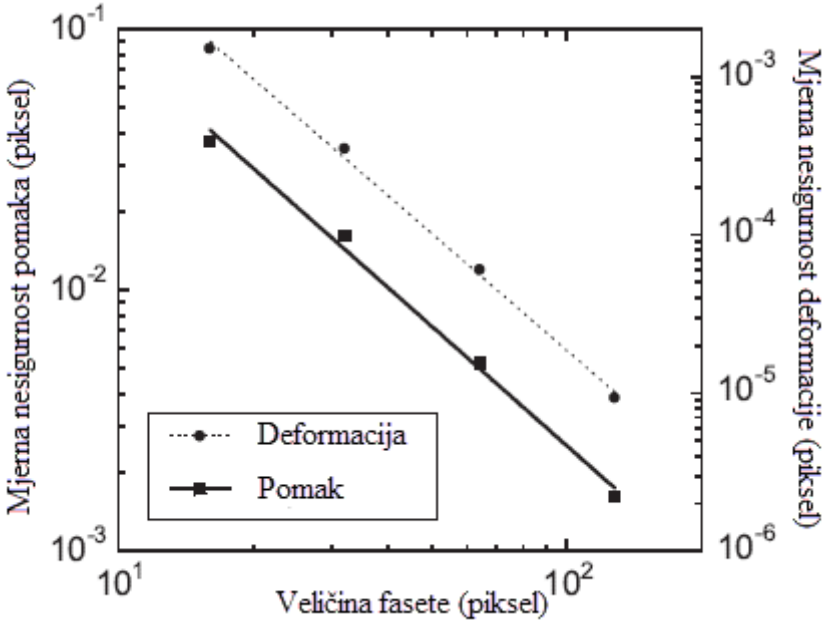
Slika 27. Faseta veličine 15x15 s dva preklapajuća piksela [158]

Slika 27. prikazuje sustav faseta kakve su korištene prilikom izvođenja eksperimenata opisanih u ovom radu. Kako bi se odredile prostorne koordinate točaka na ispitnom uzorku valja pronaći slikovne koordinate na slikama lijeve i desne kamere. Ovo se često u literaturi naziva problemom jednoznačnosti te se rješava primjenom principa epipolarnih ravnina. Ovaj princip nalazi se unutar Aramisovog algoritma što znači da je neovisan o promatranom objektu već ovisi isključivo o unutrašnjim parametrima kamere i njihovoj relativnoj orijentaciji koji su definirani za pojedini mjerni volume. Više o rješavanju problema jednoznačnosti dano je u poglavlju 5.1.2 dok je proces kalibracije mjernog sustava Aramis opisan u poglavlju 5.1.1. Mjerni volumen sustava je dio prostora

u kojem mora biti smješten ispitni uzorak kako bi kamere mogle odrediti pomake unutar granica tolerancije.

U ovom istraživanju korištene su fasete veličine 15x15 piksela budući da predstavljaju kompromis između točnosti i vremena potrebnog za računanje pomaka te ih je u većini slučajeva uputno koristiti te prilagoditi površinski raster shodno tome [158].

Naravno, odstupanja od ove veličine su moguća te se tako povećanjem veličine fasete smanjuje mjerna nesigurnost izračuna pomaka ali to produljuje vrijeme izračuna. Suprotno tome, manje fasete smanjuju točnost ali ubrzavaju izračun pomaka (Slika 28.). Također, veće fasete ne mogu opisati lokalne pomake [158].



Slika 28. Ovisnost mjerne nesigurnosti pomaka i deformacija o veličini fasete [159]

Korak fasete, odnosno preklapanje susjednih faseta (Slika 27.), također utječe na mjernu nesigurnost i vrijeme izračuna pomaka i to tako da veći korak (preklapanje) fasete vodi smanjenju mjernih točaka što povećava mjernu nesigurnost ali i skraćuje vrijeme izračuna, dok se smanjenjem koraka dobiva veći broj mjernih točaka ali i izračun pomaka postaje zahtjevniji [158].

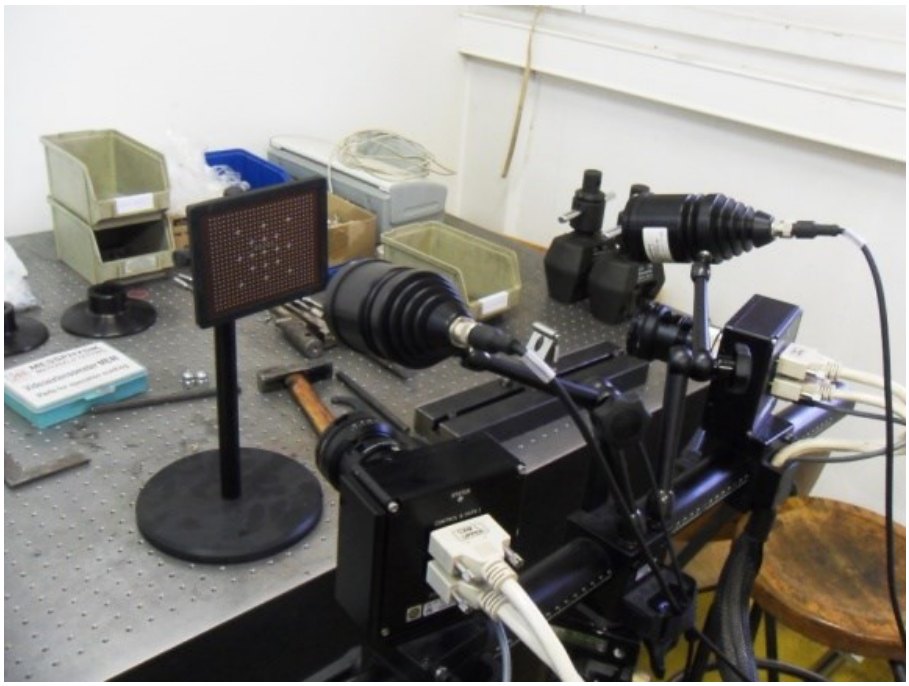
Osim veličine faseta, na mjernu nesigurnost DIC sustava utječe još nekoliko čimbenika od kojih su najvažniji:

- karakteristike rastera - veličina i raspodjela crnih i bijelih točkica na mjernom objektu,

- parametri analize - algoritam, kriteriji korelacije i parametri fasete,
- parametri kamere - poput rezolucije, šuma i distorzije te
- utjecaj okoline – temperatura, osvjetljenje, vibracije stalka kamera...

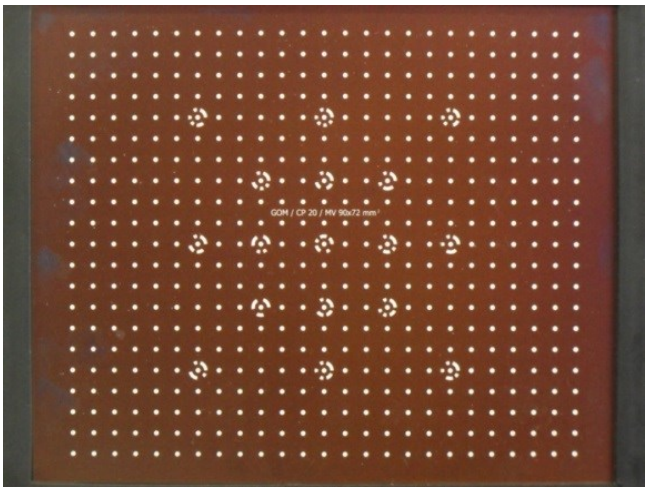
5.1.1. Kalibracija mjernog sustava

Kako bi se slikovne koordinate kamera povezale s prostornim koordinatama snimanog objekta potrebno je prije početka ispitivanja kalibrirati optički sustav (Slika 29.) čime se također smanjuju moguće pogreške i nepravilnosti te ubrzava postupak mjerenja.



Slika 29. Kalibracija Aramis mjernog sustava [157]

Kalibracija je postupak strogo propisan od strane proizvođača te je dan u uputama za kalibraciju s potrebnim parametrima orijentacije kamera. Pod orijentacijom se smatra relativni položaj jedne kamere u odnosu na drugu kameru i snimani objekt [158]. Povezivanje prostornih i slikovnih koordinata vrši se snimanjem kalibracijskog objekta (Slika 30.) zadanog od proizvođača za određeni mjerni volumen, a na kojem se nalaze mjerne točke umjerene na definiranu udaljenost i položaj na samom objektu.

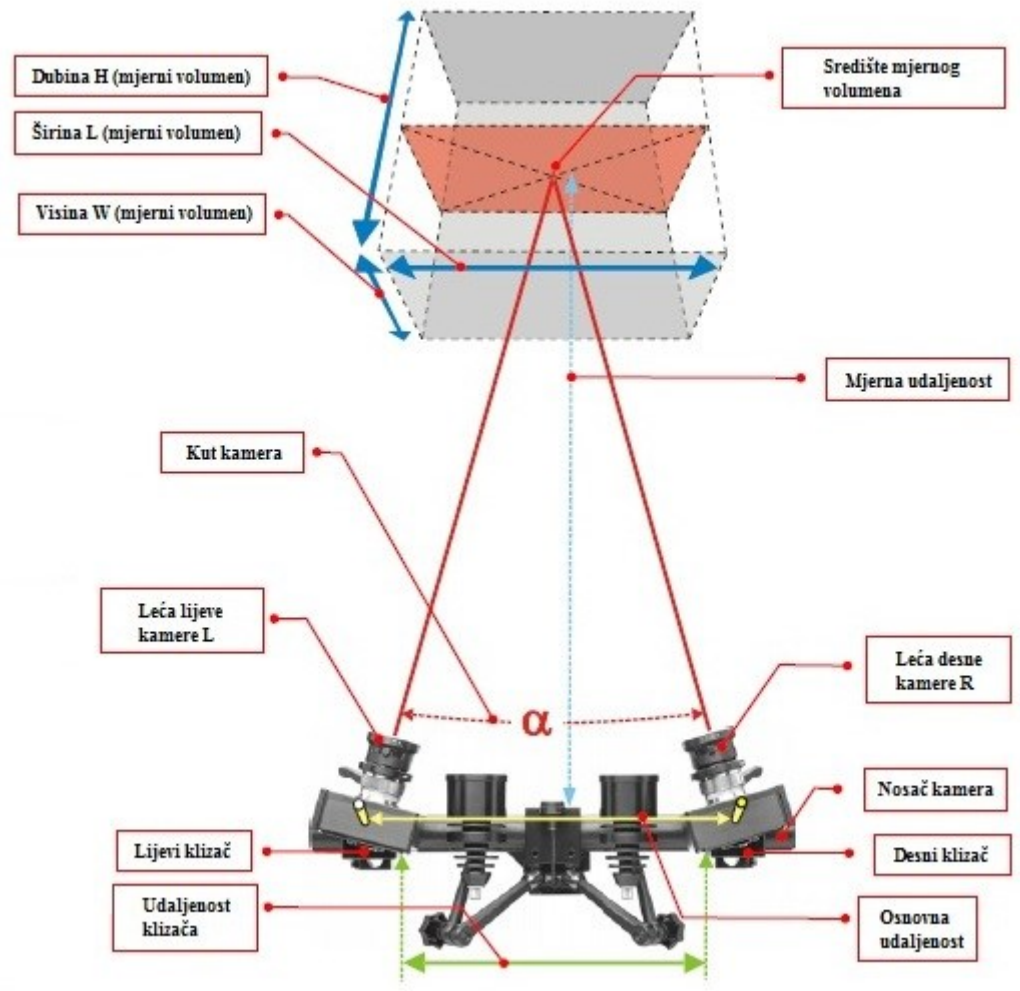


Slika 30. Kalibracijski objekt [157]

Ovakvim postupkom kalibracije povezuje se broj piksela na kameri sa stvarnim dimenzijama snimanog objekta u milimetrima. Predefinirana orijentacija kamera koristiti se za rješavanje problema jednoznačnosti čime je moguće povezati dimenzije uzorka u milimetrima s brojem piksela koji ga predstavljaju na digitalnoj slici i tako pratiti njegove pomake u prostornim dimenzijama.

Orijentacija kamera unaprijed je određena za odgovarajući mjerni volumen – dio prostora unutar kojega kamere sustava Aramis mogu koristiti DIC algoritam za praćenje pomaka. Tako za potrebni mjerni volumen valja namjestiti: međusobnu udaljenost kamera, kut kamera, udaljenost kamera od mjernog objekta, otvor blende, fokus i polarizaciju kamera. U ovom istraživanju korišten je kalibracijski objekt *CP20/MV90/72*, a parametri za snimanje (Slika 31.) u ovom radu su sljedeći:

- objektiv: 50 mm,
- mjerni volumen: 200×150 mm,
- mjerna udaljenost: 695 mm,
- međusobna udaljenost kamera: 282 mm,
- kut kamera: 25°.



Slika 31. Parametri Aramis mjernog sustava [158]

Radi lakšeg razumijevanja parametara, na slici 30 dan je prikaz parametara definiranih od strane proizvođača sustava Aramisa. Nakon uspješno provedene kalibracije dobivene postavke se mogu pohraniti i koristiti za iduća mjerenja istog volumena pri čemu valja zadržati parametre sustava kamera. Kod ispravno provedene kalibracije greška sustava trebala bi biti između 0,01 i 0,04 piksela [158].

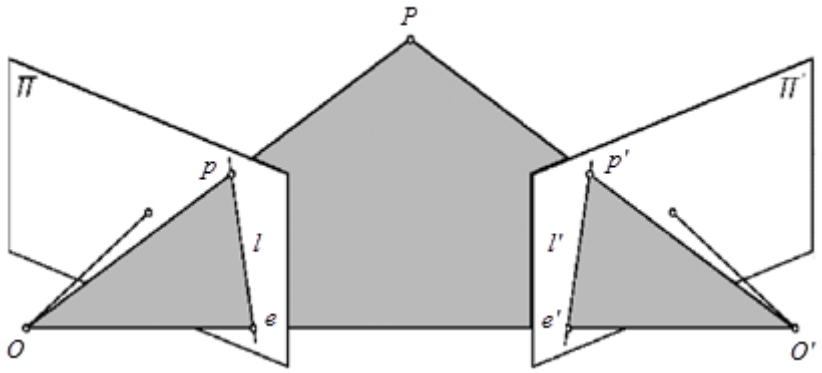
5.1.2. Mjerenje pomaka i deformacija

U prijašnjim poglavljima opisana je sama metoda korelacije digitalne slike kojom je moguće raspoznati različite točke na uzorku dok je prije opisanim postupkom kalibracije moguće povezati dimenzije uzroka na digitalnoj slici u pikselima s njegovim

stvarnim dimenzijama u milimetrima. Ostaje još opisati problem jednoznačnosti kojim se željena točka na uzorku pronalazi u obje kamere Aramis mjernog sustava.

Na slici 31 točka *P* označava točku na ispitnom uzorku promatranu kamerama *Π* (lijeva kamera) i *Π'* (desna kamera). Točka *p* predstavlja projekciju točke *P* na kameri *Π* dok položaj slikovnog osjeta objektne točke *p'* u desnoj kameri nije poznat što znači da nije zadovoljen uvjet jednoznačnosti [160].

Točke *O* i *O'* projekcijska su središta lijeve i desne kamere, a spajanjem ovih dviju točaka dobiva se tzv. osnovna linija. Spajanjem točaka *P* i *O* te točaka *O* i *O'*, dobivaju se dva pravca koji leže u istoj ravnini pri čemu je pravac *OO'* koji prolazi točkama *e* i *e'* vidljiv svim objektnim točkama *P*. Ovako definirana ravnina naziva se epipolarna ravnina (Slika 32.).



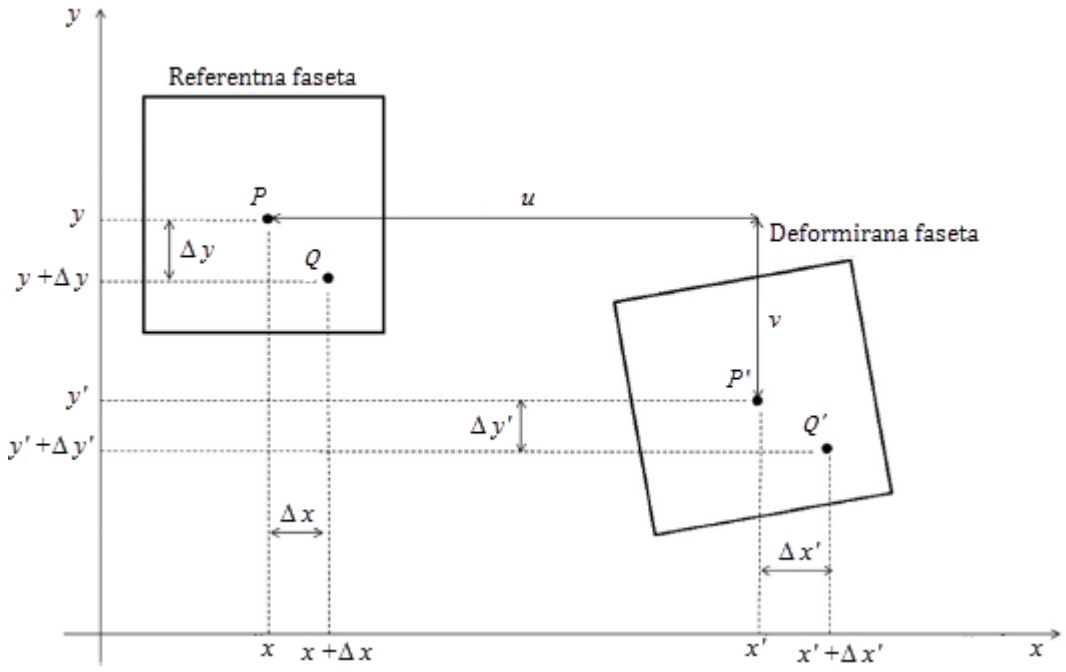
Slika 32. Epipolarna ravnina [160]

Na gornjoj slici točke *e* i *e'* virtualne su slike optičkog središta jedne kamere viđene drugom kamerom, a nazivaju se epipolovima. Na istoj slici *l* predstavlja projekciju epipolarne ravnine u lijevoj dok je *l'* projekcija epipolarne ravnine u desnoj kameri na kojoj po definiciji mora ležati tražena slikovna točka *p'*.

U početnom trenutku nije poznat položaj točke *p'* u desnoj kameri. Ovaj problem rješava se pod uvjetom da točka P leži u vidnom polju desne kamere te da slikovni osjeti točke *P* ne prolaze točkama *e* odnosno *e'* [160].

Točka *p'* leži na pravcu *l'* te se problem pronalaženja točke *p'* u desnoj kameri svodi s ravninskog na jednodimenzijski problem. Na ovaj način optički sustav u stanju je pronaći bilo koju točku na mjernom objektu i mapirati je u prostornim koordinatama.

Kako bi se pratilo gibanje točaka na mjernom uzorku tijekom vremena, potrebno je definirati točke tako da ih kamere mogu razlikovati. Ovo se postiže nanošenjem stohastičkog rastera kako je opisano u poglavlju 5.1. Slika se potom dijeli na više manjih polja piksela odnosno faseta, najčešće kvadratnog oblika. Svaka faseta za sebe ima jedinstvenu raspodjelu intenziteta sive boje što ih čini međusobno različitima. Raspodjela intenziteta sive boje na referentnoj slici označena je s $f(x,y)$, a na slici deformiranog uzorka s $g(x',y')$ te se na ovaj način može princip korelacije definirati kao preslikavanje Z iz referentne konfiguracije P i Q u trenutnu (deformiranu) konfiguraciju P' i Q' (Slika 33.).



Slika 33. Faseta prije i nakon deformiranja [161]

Na gornjoj slici P i Q označavaju središta faseta u referentnom (neopterećenom) položaju definirane koordinatama x i y dok P' i Q' označavaju središte fasete P i Q u deformiranom položaju pri čemu su im koordinate x' i y'.

Ako se princip korelacije zapiše preko ranije spomenute funkcije preslikavanja Z, dobiva se

$$g(x', y') = Z[f(x, y)] \tag{5.1.1}$$

ili zapisano preko koordinata položaja i pomaka točaka P i Q

$$x' = x + u_x(x, y)], \tag{5.1.2}$$

$$y' = y + u_{\mathrm{y}}(x, y)].$$

Uz pretpostavku konstantna raspodjele Δ gradijenta pomaka u cijeloj faseti trenutne koordinate *x'* i *y'* se mogu definirati na sljedeći način:

$$\begin{aligned} x' &= x + u_{\mathrm{x,P}} + \frac{\partial u_{\mathrm{x,P}}}{\partial x}\Delta x + \frac{\partial u_{\mathrm{x,P}}}{\partial y}\Delta y, \\ y' &= y + u_{\mathrm{y,P}} + \frac{\partial u_{\mathrm{y,P}}}{\partial x}\Delta x + \frac{\partial u_{\mathrm{y,P}}}{\partial y}\Delta y. \end{aligned} \tag{5.1.3}$$

Kao što je vidljivo na slici 32 promjena položaja točaka P u P' te točke Q u Q' interpretira se kao pomak. Za pronalaženje točaka P' i Q' u trenutnoj konfiguraciji potrebno je definirati kriterij podudarnosti raspodjele intenziteta sive boje između dvije fasete. Ovaj kriterij često se naziva i korelacijski koeficijent C, a u slučaju trodimenzionalnog mjerenja funkcija je dvanaest varijabli, tri komponente pomaka $u_{\mathrm{x,P}}, u_{\mathrm{y,P}}$ i $u_{\mathrm{z,P}}$ i devet gradijenata pomaka $\partial u_{\mathrm{x,P}}/\partial x$, $\partial u_{\mathrm{x,P}}/\partial y$, $\partial u_{\mathrm{x,P}}/\partial z$, $\partial u_{\mathrm{y,P}}/\partial x$, $\partial u_{\mathrm{y,P}}/\partial y$, $\partial u_{\mathrm{y,P}}/\partial z$, $\partial u_{z,\mathrm{P}}/\partial x$, $\partial u_{z,\mathrm{P}}/\partial y$ i $\partial u_{z,\mathrm{P}}/\partial z$.

Postoje različiti zapisi korelacijskih koeficijenata no svi DIC algoritmi funkcioniraju na način da traže ekstreme odnosno minimalni ili maksimalni iznos koeficijenta korelacije. U Aramis mjernom sustavu koeficijent korelacije C je zbroj kvadrata razlike (eng. SSD - sum squared difference) koji govori o razlici intenziteta sive skale među promatranim fasetama te se minimiziranjem ovog koeficijenta pronalaze odgovarajuće fasete u deformiranom stanju.

Korelacijski koeficijent C, definiran je izrazom

$$C = 1 - \frac{\sum_{m,n}\left[f(x_m y_n) - \bar{f}\right]\left[g(x'_m y'_n) - \bar{g}\right]}{\sqrt{\sum_{m,n}\left[f(x_m y_n) - \bar{f}\right]^2 \sum_{m,n}\left[g(x'_m y'_n) - \bar{g}\right]^2}} \tag{5.1.4}$$

gdje su $\bar{f}$ i $\bar{g}$ srednje vrijednosti matrica **F** i **G** koje predstavljaju vrijednosti intenziteta nijansi sive boje svih piksela unutar promatrane fasete u referentnoj (**F**) i deformiranoj konfiguraciji (**G**) pri čemu *m* predstavlja broj piksela u vertikalnom smjeru, a *n* broj piksela u horizontalnom smjeru . Općenito, matrice **F** i **G** mogu se zapisati u obliku

$$\mathbf{F} = \begin{bmatrix} f_{1,1} & \cdots & f_{1,n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ f_{m,1} & \cdots & f_{m,n} \end{bmatrix}, \mathbf{G} = \begin{bmatrix} g_{1,1} & \cdots & g_{1,n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ g_{m,1} & \cdots & g_{m,n} \end{bmatrix}. \tag{5.1.5}$$

Metoda korelacije sada se svodi na usporedbu preklapanja dvaju matrica **F** i **G**. Pri rješavanju korelacijskog problema razlikuju se globalni i lokalni način definiranja mjernih točaka faseta.

Globalni pristup temelji se, kao i lokalni, na diskretizaciji slike u podskupove piksela odnosno fasete s tom razlikom da su mjerne točke u globalnom pristupu vrhovi faseta dok je kod lokalnog pristupa mjerna točka u samom središtu fasete [159]. Aramis mjerni sustav koristi lokalni pristup te je on korišten u ovom istraživanju za određivanje pomaka i deformacija točaka na površini aorte.

5.2. Krioprezervacija

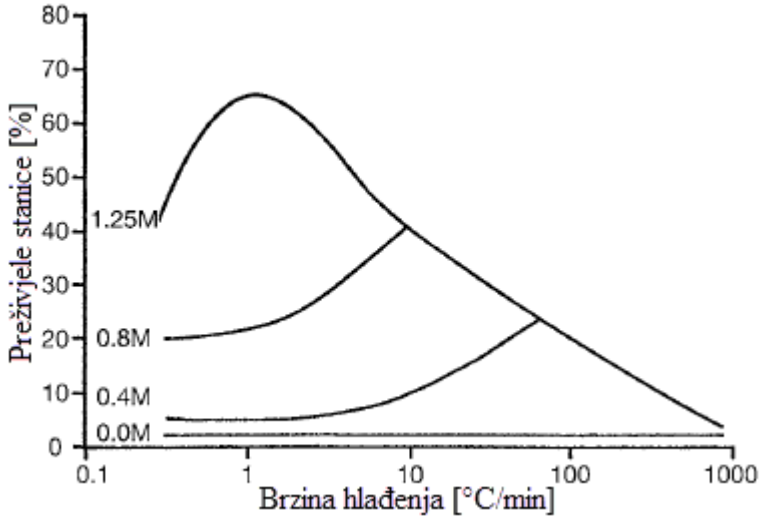
Krioprezervacija je proces pohrane bioloških struktura poput stanica, organela ili tkiva kojim se u kontroliranom postupku zamrzavanja na iznimno niske temperature sprječava oštećenje stanica i tkiva uzrokovano kemijskom kinetikom te se čuvaju njihova svojstva i karakteristike za buduću upotrebu [162].

Tijekom 1950-ih godina jedan od najvažnijih teoretičara krioprezervacije James Lovelock sugerirao je kako su oštećenja crvenih krvnih stanica prilikom zamrzavanja posljedica povećanog osmotskog tlaka na stijenkama stanica. Također je utvrdio kako do ovog povećanja tlaka dolazi s povećanjem koncentracije soli unutar stanice koje je posljedica dehidracije koja se dešava tijekom hipotermije. Do dehidracije stanice dolazi uslijed gubitka vode nastale stvaranjem kristala leda izvan nje te može dovesti do smanjenja funkcije, oštećenja ili u konačnici smrti stanice što utječe na vijabilnost zamrznutog tkiva [44].

Vijabilnost ima različito značenje u kontekstu vijabilnosti tkiva i vijabilnosti stanica. Tkiva koja se pohranjuju na ovaj način mogu se podijeliti na tkiva kojima je neophodno prisustvo intaktnih i vijabilnih stanica (onih koje su funkcijski aktivne, dijele se te izvode očekivane funkcije) te tkiva kod kojih prisustvo intaktnih stanica nije ključno. Intaktne stanice s punom metaboličkom funkcijom neophodne su na primjer kod transplantacije rožnice ili prilikom transplantacije krvotvornih matičnih stanica, dok su s druge strane pri transplantaciji kostiju ključni mehanički i biomehanički integritet tkiva.

Trenutno ne postoje dokazi u prilog tezi da transplantati srčanih zalistaka moraju sadržavati žive stanice nakon odmrzavanja kako bi vršili svoju funkciju nakon transplantacije te je ovdje cilj ispuniti funkcije za koje je tkivo predodređeno *in-vivo* nakon vraćanja u fiziološke uvjete [162].

Rana istraživanja su otkrila kako naglo zamrzavanje (Slika 34.) nije dobro u pogledu vijabilnosti tkiva nakon odmrzavanja [162]. Upotreba krioprotektanata (eng. CPA – cryoprotective agents) služi kao svojevrsni antifriz budući da im je primarni cilj minimizirati količinu nastalog leda te snižavanje temperature prijelaza iz tekuće u krutu fazu vode i to od -90°C do -115°C.



Slika 34. Utjecaj brzine zamrzavanja na broj preživjelih stanica [162]

Na slici 34. prikazan je utjecaja brzine zamrzavanja u procesu krioprezervacije na broj preživjelih stanica pri čemu je krioprotektivni agent glicerol, čiji je molarni udio na gornjoj slici označen s M. Iz slike je vidljivo da najveći broj stanica preživi zamrzavanje ako se ono provodi brzinama oko -1 °C/min što se u današnje vrijeme postiže uređajima za kontrolirano zamrzavanje (Slika 35.) [163].



Slika 35. Uređaj za kontrolirano zamrzavanje Planer PLC, UK

Valja napomenuti kako postoji nekoliko različitih krioprotektanata poput glicerola, propilen glikola ili dimetilsulfoksida (DMSO). Kako bi određena tvar mogla služiti kao krioprotektant ona treba biti:

- izrazito topljiva,
- sposobna smanjiti točku ledišta,
- sposobna penetrirati u stanice,
- što manje toksična.

Svi penetrirajući krioprotektanti djeluju tako da reduciraju koncentraciju soli unutar stanice koja se inače povećava tijekom hipotermije, dok toksični učinak na stanice u određenom vremenu nakon odmrzavanja ovisi o samom postupku krioprezervacije [162].

Tijekom hipotermije kompromitiran je rad pumpi u staničnoj membrani te stanice upijaju vodu uslijed osmotskog pritiska intracelularnog miljea što može dovesti do rasta i na koncu pucanja stanica [162]. U ovom istraživanju kao krioprotektant koristio se dimetilsulfoksid (DMSO) koji kod sporog zamrzavanja ograničava pasivnu izmjenu vode i iona kroz staničnu membranu koju inače reguliraju stanične pumpe.

5.2.1. Postupak krioprezervacije aorte

U ovom poglavlju opisan je postupak kontroliranog zamrzavanja uzoraka aorte ispitivanih u ovom radu. Proces krioprezervacije tj. kontroliranog zamrzavanja obavljen je u Banci kardiovaskularnog tkiva pri Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb prema ustaljenoj praksi pohrane tkiva kakvu inače koriste banke tkiva.

Uzorci aorte za dugotrajnu pohranu prvo se uranjaju u krioprotektivnu otopinu sastavljenu od 10% dimetilsulfoksida (DMSO) u TCM199 mediju (eng. TCM - Tissue Culture Medium). Uzorci se stavljaju u vrećicu za zamrzavanje tkiva, a potom u još jednu vanjsku zaštitnu aluminijsku vrećicu koja se zatim zavari.

Kako bi se omogućilo prodiranje krioprotektivne tekućine (DMSO) u tkivo aorte, uzorci tkiva upakirani na opisani način, inkubiraju se na 4°C tijekom 30 minuta. Ovaj korak je neophodan kako bi krioprotektivna tekućina uspjela prodrijeti u sve stanice te ih sačuvati od oštećenja tijekom procesa zamrzavanja.

Nakon inkubacije, kreće proces zamrzavanja koji se vrši u uređaju za kontrolirano zamrzavanje KRYO560-16 (Planer PLC, UK) i to brzinom od -1 °C/min dok se ne dostigne -40°C, te nakon toga brzinom od -5 °C/min do -100 °C.

Kad uzorak dosegne -100 °C, prebacuje se u spremnik za pohranu u plinovitoj fazi tekućeg dušika na temperaturi -155 °C.

Nakon pohrane, u zadanim vremenskim točkama, uzorci se odmrzavaju kroz nekoliko koraka grijanja u kupkama (37 °C - 40 °C) te ispiranja tkiva od krioprotektivne otopine nakon čega se pohranjuju u ohlađenu fiziološku otopinu te ispituju unutar tri sata u Laboratoriju za eksperimentalnu mehaniku Fakulteta strojarstva i brodogradnje u Zagrebu.

5.3. Statistička obrada rezultata

U ovom poglavlju opisane su statističke metode korištene u provedenom istraživanju kako bi se odredila statistički značajna razlika u rezultatima eksperimentalnih ispitivanja svježih i odmrznutih uzoraka aorte. Statistička obrada provedena je korištenjem Matlab R2013b programskog paketa unutar kojega se nalaze sve korištene metode, te je u nastavku opisana i njihova sintaksa unutar ovog programskog paketa. Poredane prema redoslijedu izvođenja, korištene metode su:

- Lilleforsov test,
- Studentov (t-test),
- ANOVA i
- Tukeyjev test.

Statistička obrada rezultata, modula elastičnosti i vlačne čvrstoće uzoraka aorte, počinje s Lillieforsovim testom normalnosti

```
h = lillietest (x)
```
(5.3.1)

kojim se određuje valjanost `h`, nul-hipoteze koja kaže da se podaci dani vektorom (`x`) ponašaju prema normalnoj razdiobi uz 5% signifikantnosti tj. vjerojatnosti da je greškom odbijena nul-hipoteza. Test vraća vrijednost 0 ako je nul-hipoteza prihvaćena, a 1 u suprotnom slučaju. Provođenjem Lilleforsovog testa na svim rezultatima modula elastičnosti i vlačne čvrstoće, za sve skupine uzoraka, potvrđeno je da se rezultati ponašaju prema normalnoj razdiobi.

Određivanje statističke značajnosti razlike rezultata svježih `x` i odmrznutih uzoraka `y` postiže se t-testom

```
[h, p] = ttest2 (x, y).
```
(5.3.2)

Nul-hipoteza je da podaci dani kao vektori `x` i `y` dolaze iz nezavisnih normalnih razdiobi s istom srednjom vrijednošću i istim, ali nepoznatim varijancama, te je u tom slučaju vrijednost `h` jednaka 0. U suprotnom slučaju, $h = 1$, što znači da podaci `x` i `y` nisu jednaki uz 5% signifikantnosti. T-test kao rezultat još daje `p`-vrijednost koja ukazuje na vjerojatnost dobivanja jednakog ili ekstremnijeg rezultata u slučaju prihvaćanja nul-

hipoteze. Odbijanjem nul-hipoteze u ovom testu, određuje se statistički signifikantna razlika rezultata svježih i odmrznutih uzoraka.

Nakon provedenog t-testa, valja napraviti tzv. ANOVA test odnosno analizu varijance kojom se dodatno utvrđuje razlika među srednjim vrijednostima rezultata svježih i odmrznutih uzoraka

```
[p, stats] = anova1 (x),
```
(5.3.3)

pri čemu je `x` matrica u kojoj su stupci rezultati pojedinih skupina uzoraka, prvo za module elastičnosti, a onda i za vlačnu čvrstoću. Nul-hipoteza je da svi podaci unutar matrice `x` dolaze iz iste populacije s istom srednjom vrijednošću pri čemu `p` određuje vjerojatnost ostvarivanja nul-hipoteze. U slučaju da je `p` 0 ili blizu 0 ovo znači da je barem jedan iz skupine promatranih rezultata statistički značajno različit od ostalih. Kako je metoda pogodna za istovremeno testiranje više skupina uzoraka na ovaj način će se odrediti značajnost u rezultatima svih odmrznutih uzoraka.

Tukeyjev test kao ulazni podatak uzima rezultate ANOVA testa (stats)

```
c = multcompare (stats),
```
(5.3.4)

te dodatno provjerava sve parove među skupinama rezultata dajući kao rezultat područje pouzdanosti – `c` (eng. confidence level). Ako se unutar intervala `c` nalazi 0, tada se ne može osporiti nul-hipoteza da su promatrane skupine rezultata iz iste populacije uz 5% signifikantnosti.

Polje deformacije površine uzorka aorte ne ponaša se prema normalnoj razdiobi te se za određivanje statističke značajnosti rezultata dobivenih DIC sustavom koristi neparametarijska analiza varijance. U Matlab R2013b programskom paketu neparametarijska analiza varijance provodi se Kruskal-Wallisovim testom

```
[h,p] = kruskalwallis (x),
```
(5.3.5)

u kojem stupci vektora (`x`) predstavljaju podatke o deformacijama svježeg, odnosno odmrznutog uzorka. Test daje vrijednost $h = 0$ ako su deformacije svježih i odmrznutih uzoraka iz iste razdiobe, dok je $h = 1$ kada uzorci nisu iz iste razdiobe te daje vrijednost p koji govori o značajnosti rezultata.

6. Eksperimentalno ispitivanje

U ovom poglavlju dan je opis eksperimentalnog ispitivanja kojeg čine:

- priprema ispitnih uzoraka aorte,
- mjerni uređaji i oprema te
- jednoosni statički vlačni test.

Mehanička svojstva svježih i odmrznutih aorti eksperimentalno su ispitivana u Laboratoriju za eksperimentalnu mehaniku pri Zavodu za tehničku mehaniku, Fakulteta strojarstva i brodogradnje Sveučilišta u Zagrebu.

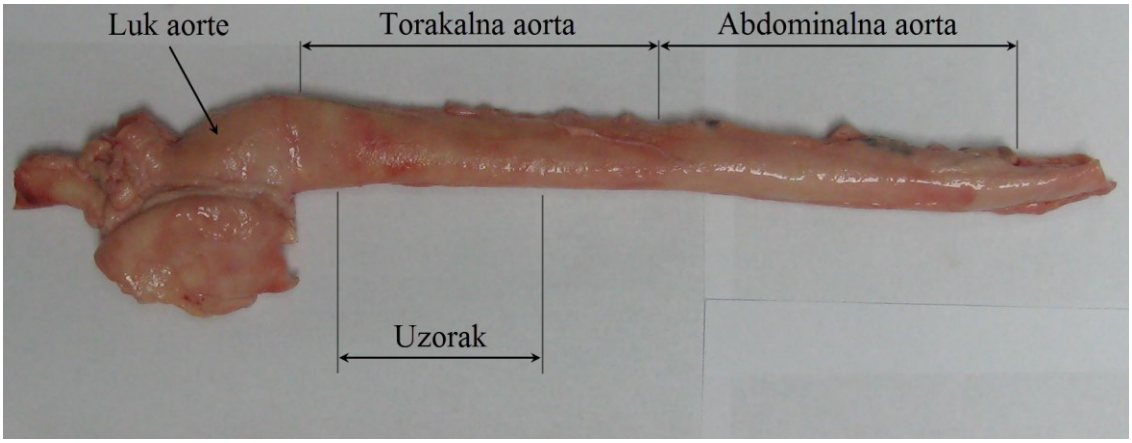
6.1. Priprema ispitnih uzoraka

Sve aorte ispitivane u ovom istraživanju prikupljene su od strane proizvođača, PIK Vrbovec, Mesna industrija d.d. nositelja oznake Meso hrvatskih farmi kojeg dodjeljuje Hrvatska poljoprivredna agencija proizvođačima koji ispunjavaju najviše svjetske standarde tehnologije i higijene te sljedivosti proizvoda od farme do stola. U konkretnom slučaju ovo znači da su aorte korištene u ovom istraživanju dobivene od svinja uzgojenih u jednakim i strogo kontroliranim uvjetima.

Hrvatska poljoprivredna agencija zadužena je za poslove selekcije u stočarstvu i poljoprivredi te je od 1994. godine, pod raznim imenima, zadužena za upravljanje kvalitetom i sljedivošću proizvoda hrvatskih farmi pa tako i velikih proizvođača poput PIK Vrbovca. Međunarodni komitet za kontrolu proizvodnosti domaćih životinja – ICAR (eng. ICAR – International Committee for Animal Recording), međunarodna je organizacija i najviše tijelo koje donosi i propisuje standarde za provedbu postupaka praćenja podrijetla i proizvodnih svojstava domaćih životinja te za opremu i pribor koji se u tim poslovima koriste [164], a članice koje procesom certifikacije potvrde sukladnost svojih uzgojnih i proizvodnih postupaka s propisanim normama dobivaju pravo korištenja ICAR-ovog Certifikata kvalitete kakvog posjeduje i Hrvatska poljoprivredna agencija od 2004. godine od kada je i punopravna članica Komiteta.

Svinje korištene u ovom radu starosti su 6 mjeseci te prosječne težine 115 kg. Aorte su izdvojene iz ostatka tkiva u klaonici tvrtke PIK Vrbovec d.d. u Vrbovcu, a ostatak obrade uzoraka, kao i samo izdvajanje iz ostatka tkiva aorte obavljeno je u Laboratoriju za eksperimentalnu mehaniku Fakulteta strojarstva i brodogradnje.

Iz jedne aorte izdvojena su po dva uzorka torakalnog dijela (Slika 36.), jedan za ispitivanje unutar 6 sati (svježi uzorci) dok je drugi uzorak pohranjen u Banci kardiovaskularnog tkiva unutar 3 sata (zamrznuti uzorci). Uzorci tkiva su bili zamrznuti i pohranjeni u plinovitoj fazi tekućeg dušika 1, 4 ili 9 mjeseci, nakon čega su bili odmrznuti i podvrgnuti biomehaničkim testiranjima.

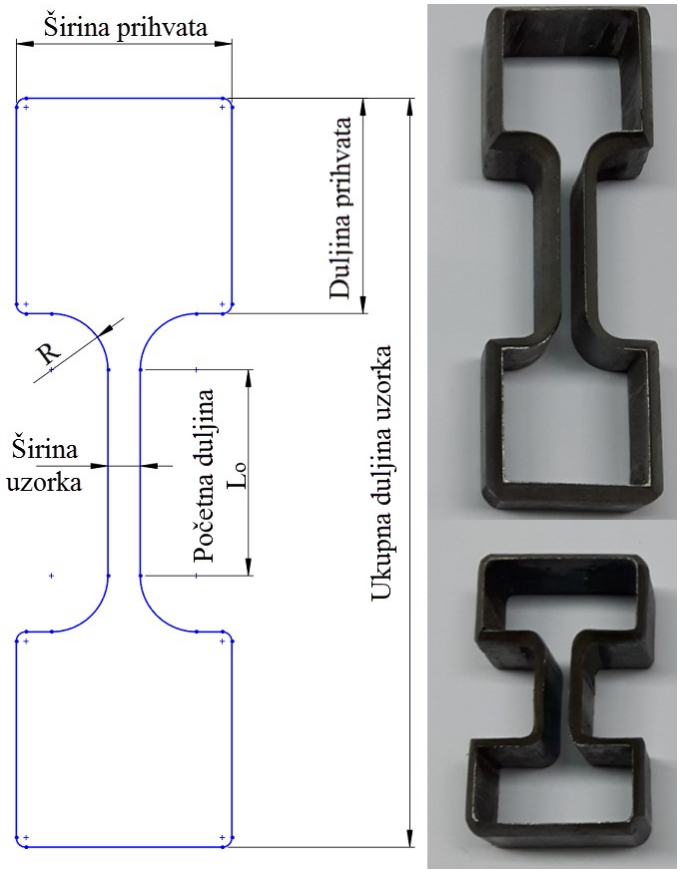


Slika 36. Dio svinjske torakalne aorte iz kojeg je izdvojen ispitni uzorak

Dimenzije svinjske aorte, promjera u prosjeku 25 mm, nisu dovoljne za izdvajanje uzdužnog i poprečnog uzorka iz iste aorte. Posljedično tome, uzorci u poprečnom i uzdužnom smjeru izdvajani su iz dvaju različitih skupina aorti. Tako su prvo ispitani uzorci u uzdužnom smjeru pri čemu su svježi i uzorci za pohranu u trajanju od 9 mjeseci izdvojeni iz iste skupine aorti. Sljedeću skupinu činili su uzorci izdvojeni iz istih aorti u poprečnom smjeru; svježi i za pohranu u trajanju od 9 mjeseci. Isti postupak ponovljen je za ispitne skupine s pohranom u trajanju od mjesec dana i 4 mjeseca, prvo u uzdužnom, a potom i u poprečnom smjeru.

Postupak izdvajanja uzorka započinje pažljivim otvaranjem aorte u uzdužnom smjeru upotrebom škara, a prateći interkostalne arterije. Kirurškim skalpelom se potom odvaja torakalni dio od luka i abdominalnog dijela aorte (Slika 36.). Iz ovako pripremljenog torakalnog dijela izdvajaju se po dva uzorka, jedan za ispitivanje u svježem stanju, a drugi za pohranu i naknadno ispitivanje nakon odmrzavanja.

Izdvajanje uzorka za ispitivanje iz toraklanog dijela aorte (Slika 36.) provedeno je pomoću izrađenog kalupa odnosno dvaju noževa za izrezivanje uzoraka i to jedan za uzorke u uzdužnom i jedan za izrezivanje uzoraka u poprečnom smjeru (Slika 37.).



Slika 37. Izgled kalupa za izdvajanje uzorka iz ostatka tkiva aorte

Kalup se postavi na rastvoreno tkivo aorte i pomoću pritiska ostvarenog upotrebom vijčane preše izrezuje uzorak oblika svoje konture (Slika 38.).



Slika 38. Torakalni dio aorte nakon rezanja kalupom

Kirurškim skalpelom se potom pažljivo odvaja uzorak od ostatka tkiva aorte nakon čega se dobiva njegov konačni oblik prikazan na slici 38.



Slika 39. Uzorak aorte izdvojen iz ostatka tkiva

Korištenjem ovih kalupa značajno su ujednačene dimenzije uzoraka (Tablica 4.) unutar pojedine skupine – uzdužnih odnosno poprečnih uzoraka.

Tablica 4. Dimenzije ispitnih uzoraka

	Uzdužni uzorci	Poprečni uzorci
Duljina - L_o [mm]	26 ± 1	$13 \pm 0{,}5$
Širina [mm]	$4 \pm 0{,}3$	$4 \pm 0{,}3$
Debljina [mm]	$2 \pm 0{,}3$	$2 \pm 0{,}3$
Površina poprečnog presjeka - A_o [mm^2]	$8 \pm 0{,}1$	$8 \pm 0{,}1$

Dimenzije uzoraka dane su u tablici 4 pri čemu L_o ujedno predstavlja početnu duljinu (Slika 46.) potrebnu za izračun inženjerske deformacije dok se površina poprečnog presjeka A_o koristi pri izračunu inženjerskog naprezanja. Dimenzije uzoraka mjerene su digitalnim pomičnim mjerilom (Mitutoyo, Ltd., UK) rezolucije 0,01 mm.

Mjerni sustav Aramis, korišten u ovom istraživanju, zahtjeva nanošenje stohastičnog rastera na površinu uzorka kako bi sustav mogao pratiti pomake točaka na samom uzorku kako je opisano u poglavlju 5.1. U tu svrhu, prije ispitivanja, na uzorak pripremljen kako je ranije opisano (Slika 39.) nanesen je stohastički uzorak crne vodootporne boje (Slika 40.) kako bi se osiguralo da boja prijanja na površinu aorte te se giba zajedno s njom. Nakon što se nanese raster, aorta se stavlja u čeljusti uređaja opisane u idućem poglavlju te se započinje s ispitivanjem.



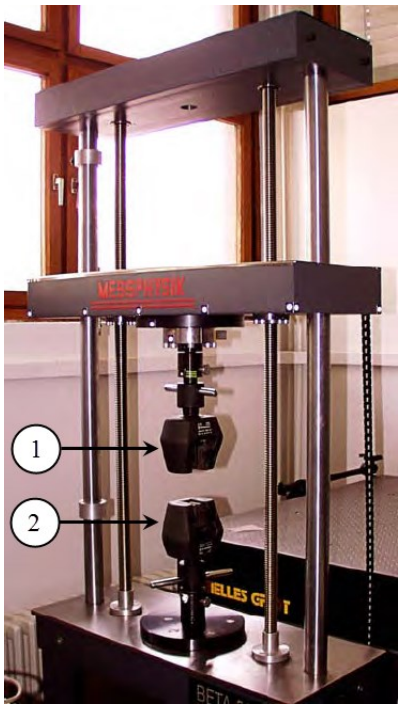
Slika 40. Uzorak aorte s nanesenim rasterom za ispitivanje DIC metodom

Odmah nakon izdvajanja iz ostatka tkiva uzorci za dugotrajnu pohranu stavljaju se u posebne spremnike napunjene fiziološkom otopinom te se transportiraju u Banku kardiovaskularnog tkiva pri Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC-a Zagreb, gdje se pohranjuju postupkom krioprezervacije na period od 1, 4 i 9 mjeseci. Nakon kontroliranog odmrzavanja opisanog u poglavlju 5.2 aorte se prenose u Laboratorij za eksperimentalnu mehaniku gdje se nakon opisanog postupka pripreme uzorci ispituju na kidalici.

6.2. Mjerni uređaji i oprema

U eksperimentalnim ispitivanjima mehaničkog ponašanja uzoraka korištena je kidalica Beta 50-5 (Messphysik GmbH, Austrija) s elektromotornim pogonom i maksimalnom silom od 50 kN (Slika 41.) dok je u ovom istraživanju korištena mjerna doza od 500 N (GTM GmbH, Njemačka). Kidalicom, namijenjenom za vlačna, tlačna i savojna ispitivanja, upravlja EDC25 upravljačka jedinica (DOLI Elektronik GmbH, Njemačka) koja prati pomak i silu u realnom vremenu zapisujući podatke brzinom od otprilike 30 podataka po sekundi, zasebno za silu i pomak.

Upravljačka jedinica zapisuje podatke u tekstualne datoteke u kojima su osim podataka o sili i pomaku dani i neki osnovni podaci o uzorku poput naziva i dimenzija uzorka te podaci o samom testu poput brzine deformiranja, temperature pri kojoj se provodi eksperiment i slično. Ovdje valja napomenuti kako su navedeni pomaci koje upravljačka jedinica bilježi pomaci samih prihvata, odnosno to je podatak o pomaku čeljusti tijekom ispitivanja. To znači da sama kidalica ne može zabilježiti eventualno proklizavanje uzorka unutar čeljusti što može dovesti do pogrešne interpretacije rezultata. Također, upravljačka jedinica nije u stanju pratiti pomake i deformacije pojedinačnih točaka uzoraka između čeljusti te je ovdje iskorištena prednost DIC metode kako bi se odredilo cijelo polje pomaka na mjernoj površini uzorka.

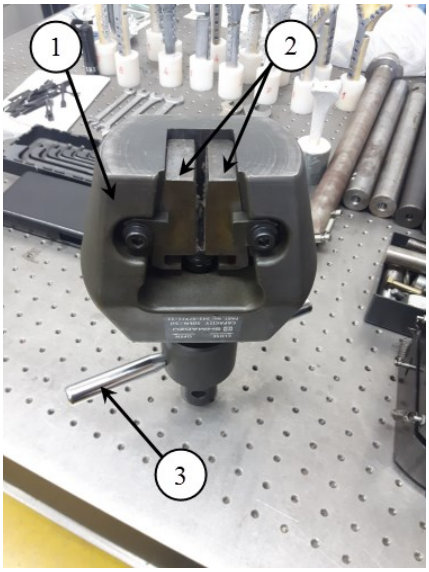


Slika 41. Kidalica Beta 50-5 (Messphysik GmbH, Austrija)

Vlačno opterećenje uzorka postiže se tako da se uzorak prvo pričvrstiti u čeljusti kidalice (Slika 41.) nakon čega se čeljust označena s 1 pomiče uz pomoć elektromotora brzinom koju definira sam korisnik, dok čeljust 2 miruje. Klasični prihvat uzorka (Slika 42.) na kidalici sastoji se od čeljusti (1) u kojoj su dvije metalne ploče tzv. pakne (2).

Krajevi uzoraka stave se unutar pakni koje pritiskom osiguravaju držanje uzorka u čeljusti. Pritisak na paknama namješta se putem posebnog vijka (3) na samim čeljustima, te se one približavaju ili udaljuju jedna od druge ovisno o rotaciji vijka. Jednom kad se uzorak pričvrsti, te počne ispitivanje, nije moguće povećati pritisak pakni

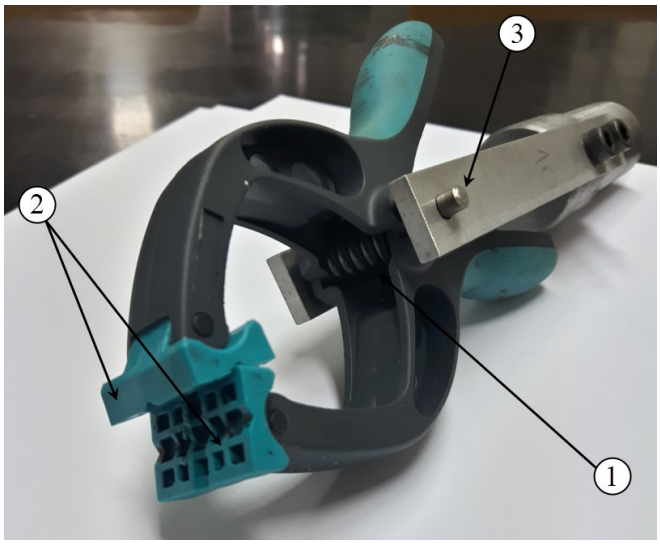
na prihvatu bez utjecaja na ishod eksperimenta. Proklizavanje uzoraka u čeljustima kidalice posljedica je viskoelastičnih svojstava aorte koja proizlaze iz visokog udjela vode u tkivu. Naime, u trenutku kada dovoljno vode izađe iz dijela aorte pod pritiskom prihvata, ona smanji svoj obujam među čeljustima što može dovesti do proklizavanja i u konačnici do izvlačenja uzorka iz prihvata.



Slika 42. Čeljusti kidalice sa sastavnim djelovima za ispitivanja inženjerskih materijala

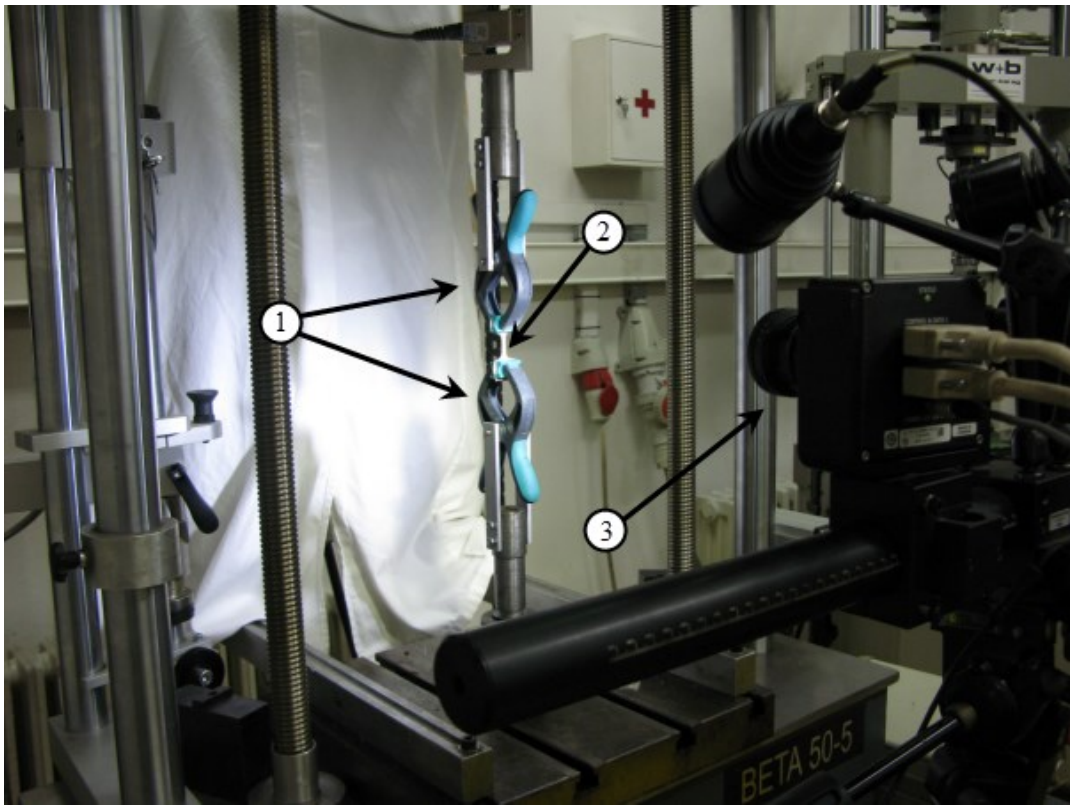
Za izradu posebnog prihvata korištena je opružna stezaljka FZ40 (Wolfcraft GmbH, Njemačka) čime je problem proklizavanja uzoraka gotovo u potpunosti otklonjen. Novi prihvat (Slika 43.) sastoji se od kliješta s oprugom (1) koja osigurava dodatni pritisak kako se tkivo aorte pod njom deformira (stanjuje). Šupljine unutar samih čeljusti novog prihvata (2) osiguravaju prihvat oblikom te dodatno poboljšavaju držanje uzorka.

Opružna stezaljka osno je centrirana na kidalicu pomoću dijela izrađenog po mjeri kako prikazuje detalj (3) na Slika 43. Ovo je potrebno kako bi uzorak bio usmjeren u pravcu opterećenja.



Slika 43. Nove čeljusti s dinamičkim prihvatom uzorka pomoću opruge

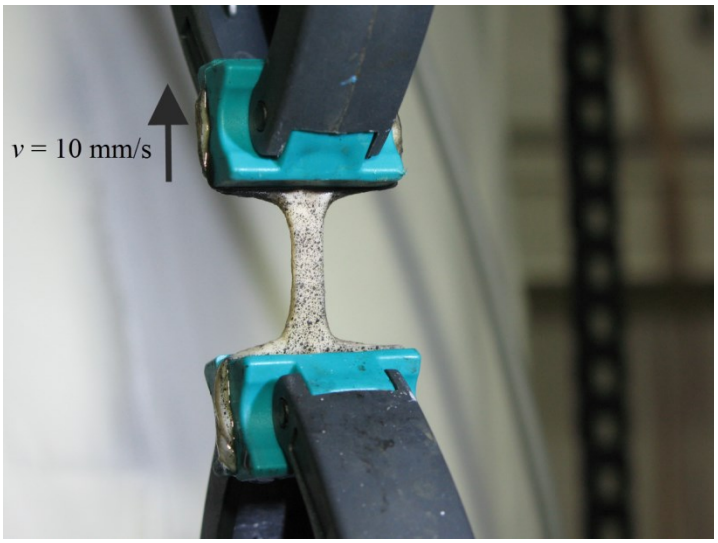
Jednom kada se uzorak namjesti u prihvatu uređaja, ispitivanje može započeti (Slika 44.). Na Slika 44. prikazan je eksperimetnalni postav za provedbu testa; pripremljeni uzorak (2) pričvršćen je u novim čeljustima (1) na kidalici. Aramis mjerni sustav (3) kalibriran je za volumen ispitnog uzorka.



Slika 44. Eksperimentalni postav za provedbu vlačnog ispitivanja

6.3. Jednoosni statički vlačni test

Jednoosnim statičkim vlačnim testom eksperimentalno su ispitivana mehanička svojstva svježih i odmrznutih uzoraka aorte kako bi se odredio utjecaj pohrane na ta svojstva. Navedeni test sastoji se od vlačnog ispitivanja tj. rastezanja uzorka u jednom smjeru (Slika 45.) pri čemu se vlačno opterećenje kontrolira pomakom čeljusti čiju brzinu definira sam korisnik.



Slika 45. Uzorak aorte u čeljustima kidalice prilikom provedbe vlačnog testa

Brzina ispitivanja za sve uzorke iznosila je $v = 10$ mm/min što znači da se čeljust kidalice pomiče navedenom brzinom (Slika 45.), vlačno opterećujući uzorak. Donja čeljust kidalice je statična što znači da upravljačka jedinica kidalice prati samo pomak gornje – pomične čeljusti.

Prije samog ispitivanja potrebno je tkivo aorte predkondicionirati kako je to opisano u poglavlju 3, a što je i ustaljena praksa prilikom ovakvih eksperimenata na mekim tkivima [138].

Predkondicioniranje je provedeno kroz 5 ciklusa opterećenje-rasterećenje pri silama do 5 N kako bi se postigla željena orijentacija vlakana prilikom provedbe jednoosnog testa odnosno kako bi se osiguralo da su mehanička svojstva identificirana eksperimentom upravo *in-vivo* svojstva aorte (Slika 14.). Nakon predkondicioniranja provodi se vlačni test do pucanja uzorka.

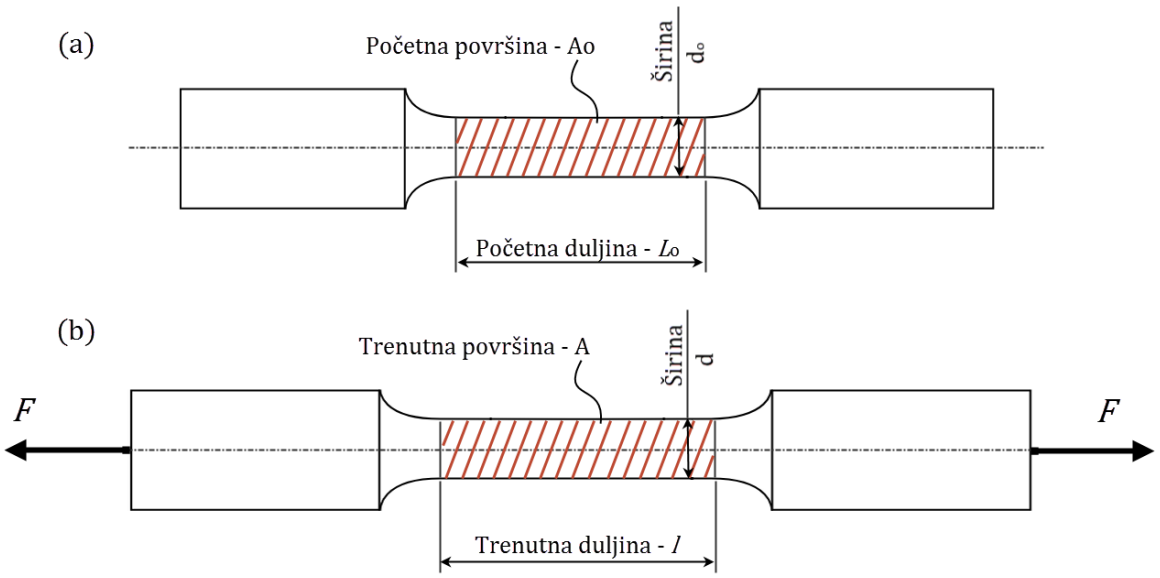
Slika 46. prikazuje uzorak prilikom statičkog vlačnog testa u referentnom-neopterećenom (a) i deformiranom stanju (b) opterećenom silom *F*. Bez korištenja korelacije digitalne slike, slična istraživanja promatrala su samo pomak kraja uzorka (pomak pomične čeljusti) pri čemu je deformacija definirana u smislu istezanja λ tako što je

$$\lambda = \frac{l}{L_0}. \tag{6.1}$$

Ovdje je l trenutna duljina, a L_o početna duljina uzorka (Slika 46.). U ovom istraživanju rezultati s kidalice određuju inženjersku deformaciju E_{ing} koja je oblika

$$E_{\text{ing}} = \lambda - 1. \tag{6.2}$$

Upotrebom Aramis mjernog sustava, korelacijom digitalne slike, mjeri se polje pomaka na čitavoj površini uzorka što daje bolji uvid u deformaciju nelinearnih-heterogenih materijala kakva je aorta.



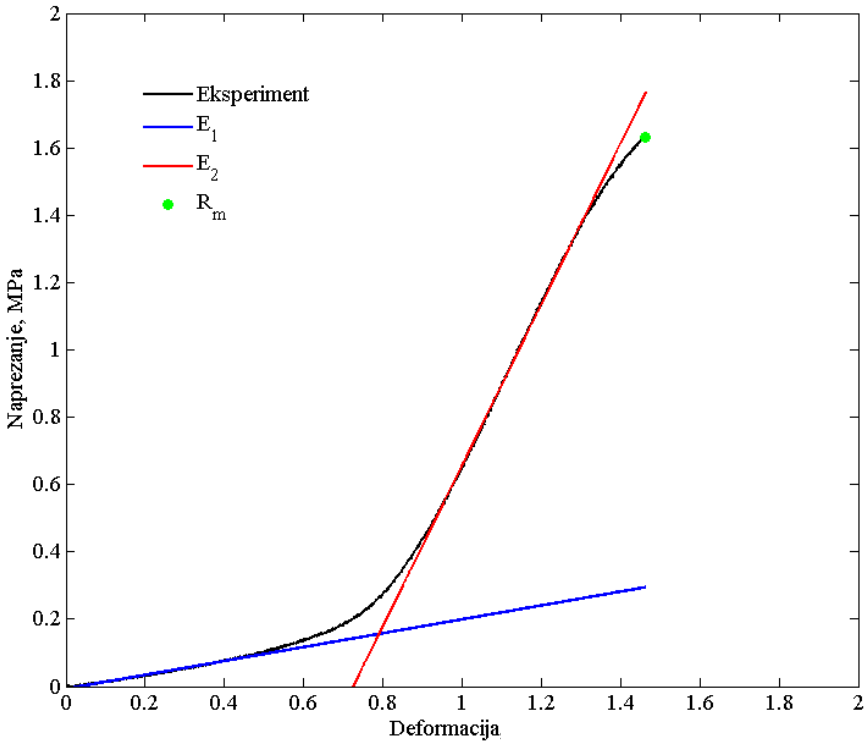
Slika 46. Uzorak u referentnoj (a) i deformiranoj konfiguraciji (b)

Kako bi se zanemario utjecaj koncentracije naprezanja na mjestu prihvata, mjereno je polje pomaka zadane površine uzorka kako je prikazano na gornjoj slici.

7. Rezultati

Kod provedbe jednoosnog statičkog vlačnog testa podaci o trenutnoj duljini uzorka (l) te trenutnoj sili (F) zapisuju se pomoću upravljačke jedinice EDC25, dok se polje pomaka na površini aorte, u referentnoj (A_0) i deformiranoj konfiguraciji (A), zapisuje pomoću mjernog sustava. Svi podaci bilježe se u realnom vremenu i pohranjuju na tvrdi disk računala.

Podaci s upravljačke jedinice koriste se za određivanje veze naprezanje-deformacija prilikom pomaka gornje čeljusti kako je opisano u prethodnom poglavlju. Na ovaj način dobiva se odnos sila-pomak koji se poznavanjem dimenzija uzorka jednostavno pretvara u odnos *deformacija-naprezanje* pri čemu je deformacija određena pomakom samih čeljusti. Rezultati s kidalice dani su u obliku inženjerske deformacije i inženjerskog naprezanja, u daljnjem tekstu označenih samo kao deformacija odnosno naprezanje (Slika 47.).



Slika 47. Dijagram *deformacija-naprezanje* s interpoliranim modulima elastičnosti

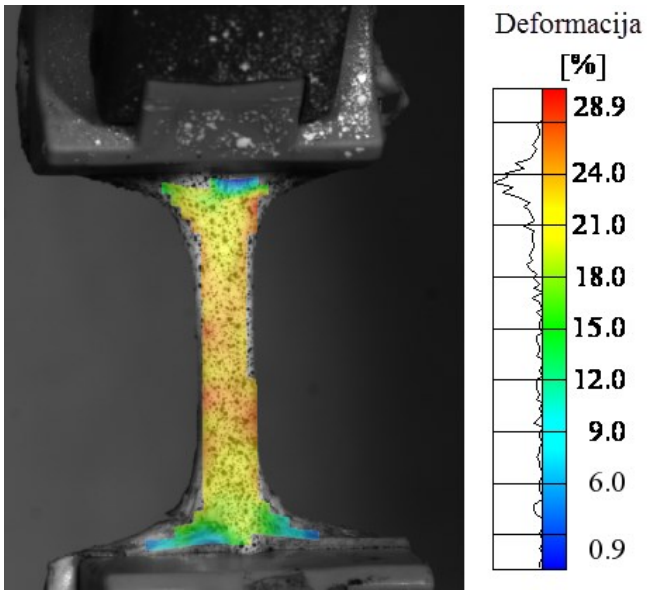
Slika 47. prikazuje tipičan, eksperimentalno dobiveni odnos *deformacija-naprezanje* (crna linija) za uzorak aorte, dok su plavi i crveni pravac linearne interpolacije metodom

najmanjih kvadrata provedene u Matlab R2013b programskom paketu. Linearna interpolacija provedena je kako bi se odredila dva linearna djela mehaničkog ponašanja aorte pri malim (plavi pravac), odnosno velikim deformacijama (crveni pravac). Ova dva pravca moraju zadovoljiti koeficijent determinacije R^2 koji ukazuje na linearnu povezanost eksperimentalnih rezultata te pravca kojim su ti rezultati interpolirali pri čemu 0 označava nedostatak korelacije, a 1 predstavlja potpunu korelaciju. Ukoliko bi vrijednost koeficijenta bila manja od 0,95 interpolacija se prekida te se zapisuje nagib pravca. Nagibi ovih pravaca predstavljaju module elastičnosti pri malim (E_1) te pri velikim deformacijama (E_2) koji će se statistički uspoređivati među skupinama svježih i odmrznutih uzoraka.

Kako je kod određenih uzoraka prilikom provedbe statičkog testa došlo do proklizavanja uzoraka i/ili rotacije prihvata, na tim djelovima dijagrama *deformacija-naprezanje* pojavljuje se šum u signalu sile s upravljačke jedinice kidalice. Radi preglednosti, na dijagramima *deformacija-naprezanje* na tom dijelu prikazana je samo linearna interpolacija tog dijela mehaničkog odziva tkiva aorte te se ovaj dio deformacije neće koristiti za određivanje modula elastičnosti, što je posebno naznačeno za pojedini uzorak kod kojeg je zamjećeno ovakvo ponašanje.

Samo ispitivanje završava pucanjem uzorka pri čemu se dobiva podatak o vlačnoj čvrstoći (R_m), odnosno o naprezanju koje dovodi do pucanja tkiva aorte. Utjecaj krioprezervacije na vrijednost vlačne čvrstoće odredit će se ranije opisanim statističkim metodama.

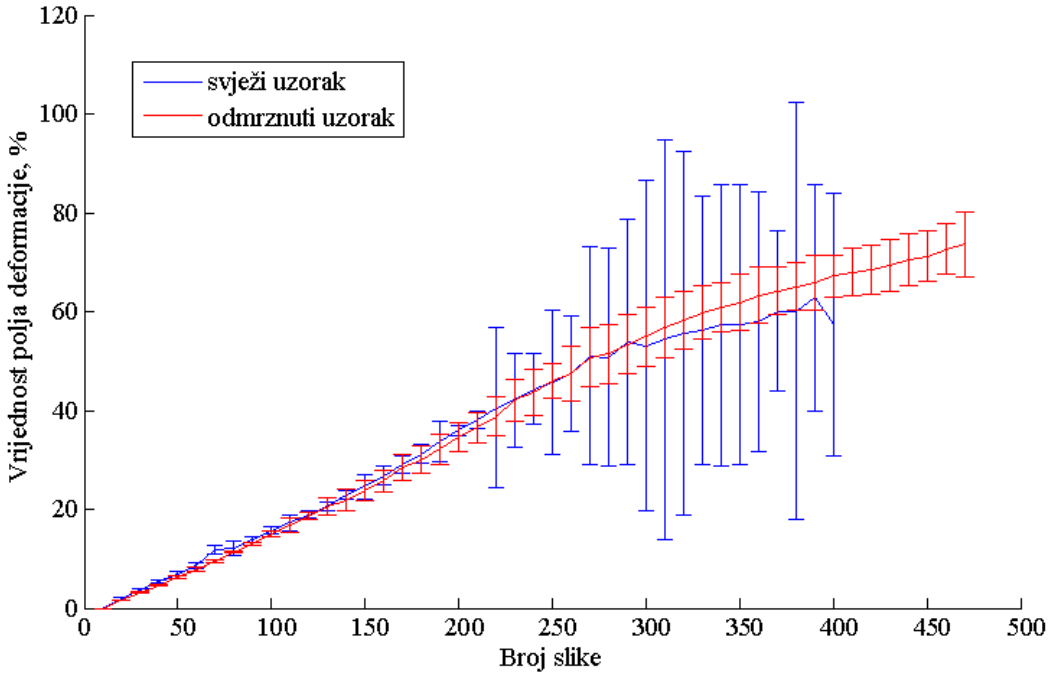
Korelacijom digitalne slike, kamere Aramis sustava prate gibanje velikog broja točaka unutar zadane površine uzorka. Pomaci ovih točaka određuju tenzor gradijenta deformiranja $\mathbf{F}$ definiranog izrazom (3.5). Metodom korelacije digitalne slike, opisane u poglavlju 5.1., dobiveno polje pomaka pretvara se u polje deformacija velikog broja točaka na površini tkiva aorte što daje bolji uvid u mehaničko ponašanje ovakve vrste materijala.



Slika 48. Polje deformacija svježeg poprečnog uzorka aorte dobiveno DIC metodom

Tijekom procesa deformiranja kod uzoraka je u prosjeku dobiveno 450 slika. Na Slika 48. prikazano je polje von Mises deformacije na površini svježeg poprečnog uzorka u 200-toj slici dobiveno Aramis optičkim mjernim sustavom.

Zbog velikog broja slika te radi bolje preglednosti, rezultati ovih ispitivanja dani su u obliku dijagrama (Slika 49.) koji prikazuje prosječnu vrijednost polja deformacije u određenoj slici tijekom eksperimenta za poprečni svježi i uzorak odmrznut nakon mjesec dana. Također, na Slika 49. okomitim linijama predstavljeni su rasponi polja deformacije u svim slikama tijekom eksperimenta, od minimalnog do maksimalnog iznosa.



Slika 49. Dijagram vrijednosti polja deformacija tijekom ispitivanja za poprečni svježi i uzorak odmrznut nakon mjesec dana pohrane

Budući da ARAMIS sustav nije povezan s upravljačkom jedinicom kidalice zbog tehničkih nedostataka sustava, vrijednosti deformacije nisu direktno prikazane u zavisnosti o naprezanju već su prikazane u dijagramima (Slika 49.) kao funkcija slike u kojoj su određene. Iz ovog razloga opis rezultata dobivenih metodom korelacije digitalne slike više je kvalitativne prirode, a odlična je podloga za daljnja istraživanja mehaničkih svojstava mekih tkiva poglavito računalnim simulacijama metodom konačnih elemenata.

U programskom paketu Abaqus 6.14-5 eksperimentalni podaci o naprezanju i deformaciji validirati će postojeće modele opisane u poglavlju 4. te će se na ovaj način odrediti onaj model koji najbolje opisuje mehaničko ponašanje torakalne aorte u svježem i odmrznutom stanju.

7.1. Rezultati eksperimentalnog ispitivanja

Rezultati eksperimentalnog ispitivanja podijeljeni su u dvije skupine s obzirom na izvor prikupljanja podataka prilikom jednoosnog statičkog vlačnog testa; prvu skupinu čine podaci prikupljeni pomoću upravljačke jedinice kidalice, dok su u drugoj skupini podaci dobiveni Aramis optičkim mjernim sustavom. Podaci s kidalice daju odnos *deformacija-naprezanje* jedne točke aorte, dok je optičkim mjernim sustavom dobiveno polje deformacija velikog broja točaka na površini uzorka kako je ranije opisano. U narednim poglavljima dani su rezultati eksperimentalnog ispitivanja svježih i odmrznutih uzoraka svinjske aorte u uzdužnom i poprečnom smjeru.

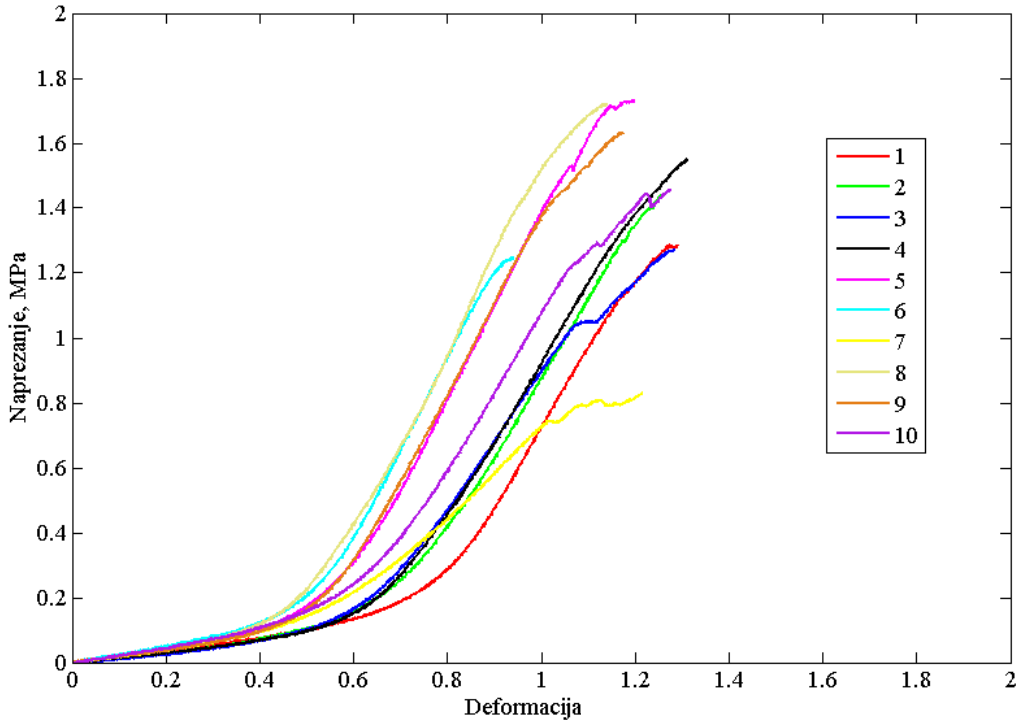
7.1.1. Uzdužni uzorci

Rezultati su podijeljeni u tri skupine prema trajanju pohrane u krioprezerviranom stanju i to na jedan mjesec, četiri te devet mjeseci. Za svaku skupinu dani su rezultati eksperimentalnog ispitivanja svježih uzoraka, a potom i rezultati uzoraka odmrznutih nakon odgovarajućeg perioda pohrane.

- **Jedan mjesec pohrane**

Ukupno je ispitano 10 svježih uzoraka aorte za pohranu u trajanju od mjesec dana. Svi testovi su provedeni do pucanja uzorka. Prilikom ispitivanja uzorak 7 se izvlačio iz čeljusti pri deformacijama iznad 0,6%, dok je u sličnom rasponu deformacije kod uzorka 8 došlo do rotacije prihvata. Uzorci 7 i 8 iz tog razloga nisu uzeti u obzir prilikom određivanja modula elastičnosti u tom rasponu deformacija (E_2). Uzorak 7 na kraju se i izvukao iz prihvata te za njega nije određena vlačna čvrstoća.

Slika 50. prikazuje dijagram *deformacija-naprezanje* ovih uzoraka dobivenih eksperimentalno jednoosnim vlačnim testom.



Slika 50. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih uzdužnih uzoraka aorte za pohranu u trajanju od mjesec dana

Tablica 5. Rezultati ispitivanja svježih uzdužnih uzoraka za pohranu na mjesec dana

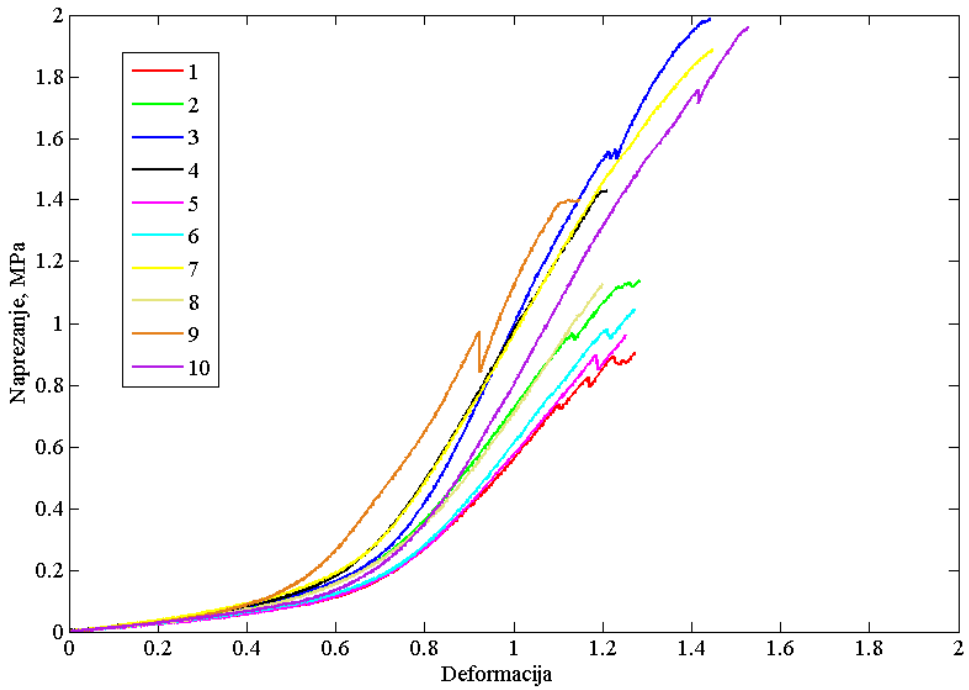
Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.196890	2.400499	1.285040
2	0.193659	2.383465	1.442702
3	0.207878	2.074856	1.271460
4	0.183178	2.412444	1.549455
5	0.265745	2.872091	1.732607
6	0.262294	2.81109	1.248444
7	0.244574	-	-
8	0.210285	-	1.720697
9	0.233954	2.744703	1.632534
10	0.236692	2.361594	1.456209
M	0.223515	2.507593	1.482128
St. dev.	0.029174	0.274043	0.189364

Tablica 5 sadrži rezultate eksperimentalnih ispitivanja svježih uzoraka pri čemu je za sve skupine rezultata dana prosječna vrijednost (M) te standardna devijacija.

Svi odmrznuti uzorci, osim uzorka 9 koji se izvukao iz prihvata, završili su ispitivanje pucanjem tkiva čime je dobivena vlačna čvrstoća za odmrznute uzorke.

Kod većine uzoraka (osim uzoraka 4, 7 i 8) vlakna elastina i kolagena popuštala su u nekoliko navrata prije konačnog pucanja cijelog uzorka te je u tom slučaju za vlačnu čvrstoću uzeto najveće naprezanje prije konačnog pucanja. Uzorak 3 proklizavao je tijekom eksperimenta pri deformacijama većim od 0,8% te modul elastičnosti u tom području (E_2) nije uzet u obzir, kao ni za uzorak 9 kod kojeg je došlo do rotacije prihvata te djelomičnog izvlačenja uzorka u istom rasponu deformacija.

Slika 51 prikazuje dijagram *deformacija-naprezanje* za uzdužne uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane u krioprezerviranom stanju. U Tablica 6. dani su rezultati modula elastičnosti (E_1, E_2) te vlačne čvrstoće (R_m) za sve odmrznute uzorke.

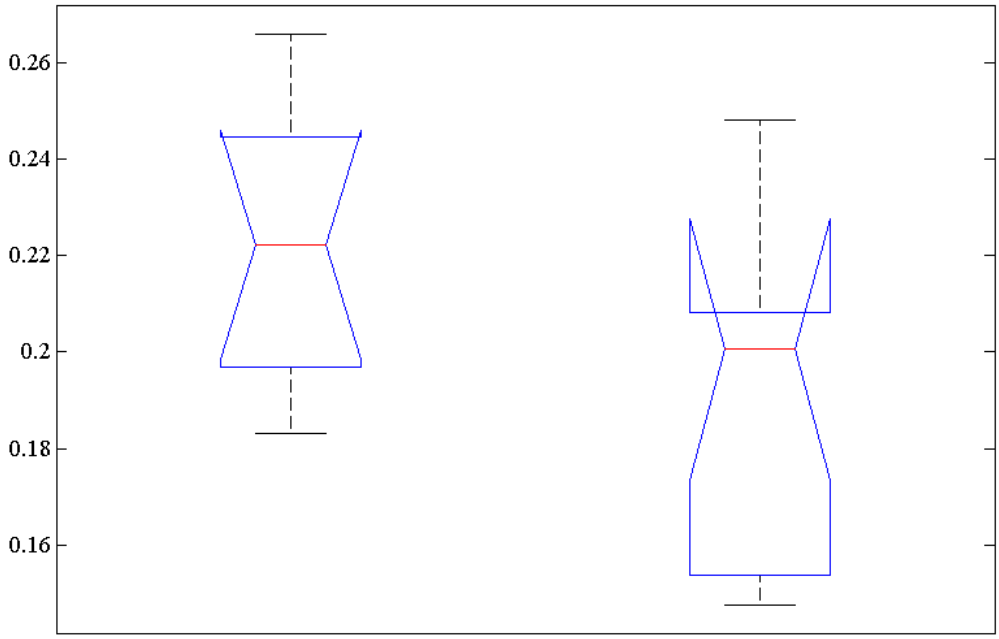


Slika 51. Dijagram *deformacija-naprezanje* uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon mjesec dana pohrane

Tablica 6. Rezultati ispitivanja uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon mjesec dana pohrane

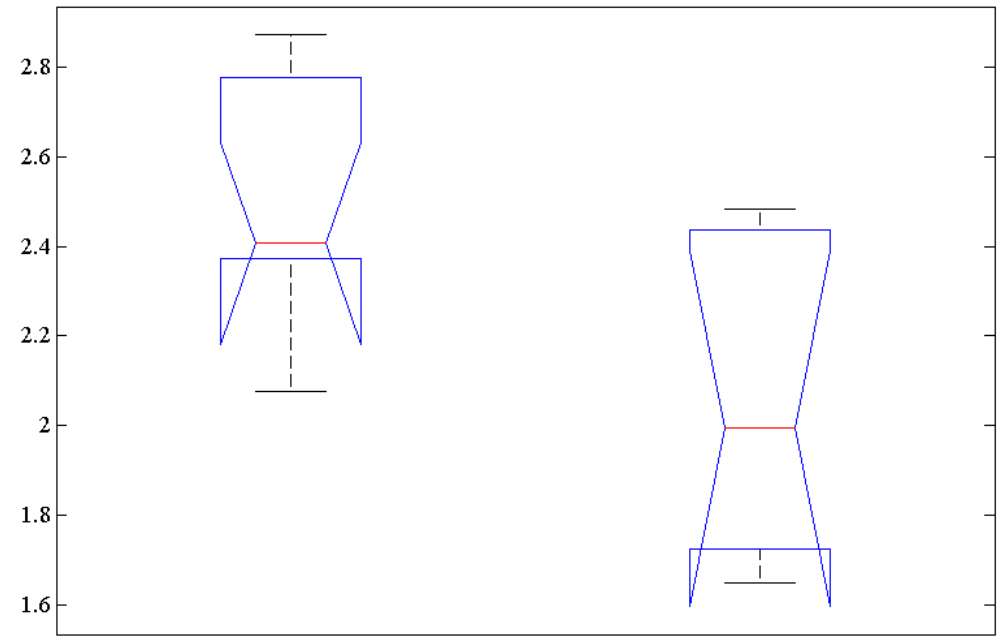
Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.153617	1.674818	0.903486
2	0.208285	1.88555	1.137473
3	0.200819	-	1.988453
4	0.223246	2.407247	1.430719
5	0.153868	1.648469	0.961147
6	0.147693	1.774781	1.045897
7	0.248138	2.482368	1.888453
8	0.200236	2.101645	1.127306
9	0.20381	-	-
10	0.178264	2.469366	1.959695
M	0.191798	2.055531	1.384452
St. dev.	0.032926	0.358097	0.422222

T-testom utvrđena je statistički značajna razlika (p=0,035) modula elastičnosti E_1 između svježih (0.2235 MPa) i odmrznutih uzoraka (0.1918 MPa), a koja je potvrđena i ANOVA-om (p=0,350). Rezultati analize varijance prikazani su na Slika 52. gdje su na vertikalnoj osi vrijednosti modula E_1, crvena linija predstavlja srednju vrijednost, donja horizontalna plava linija određuje prvi, a gornja treći kvartil. Plava linija naginje prema rezultatu koji je najveći, a nije smatran dijelom populacije (eng. outlier). Na lijevoj su strani prikazani rezultati svježih uzoraka dok su na desnoj rezultati uzoraka odmrznutih nakon mjesec dana pohrane. Tukyjevim testom dobiven je interval pouzdanosti [0,0025-0,0609] koji ne sadrži 0 što potvrđuje statističku značajnost rezultata unutar $p<0.05$.



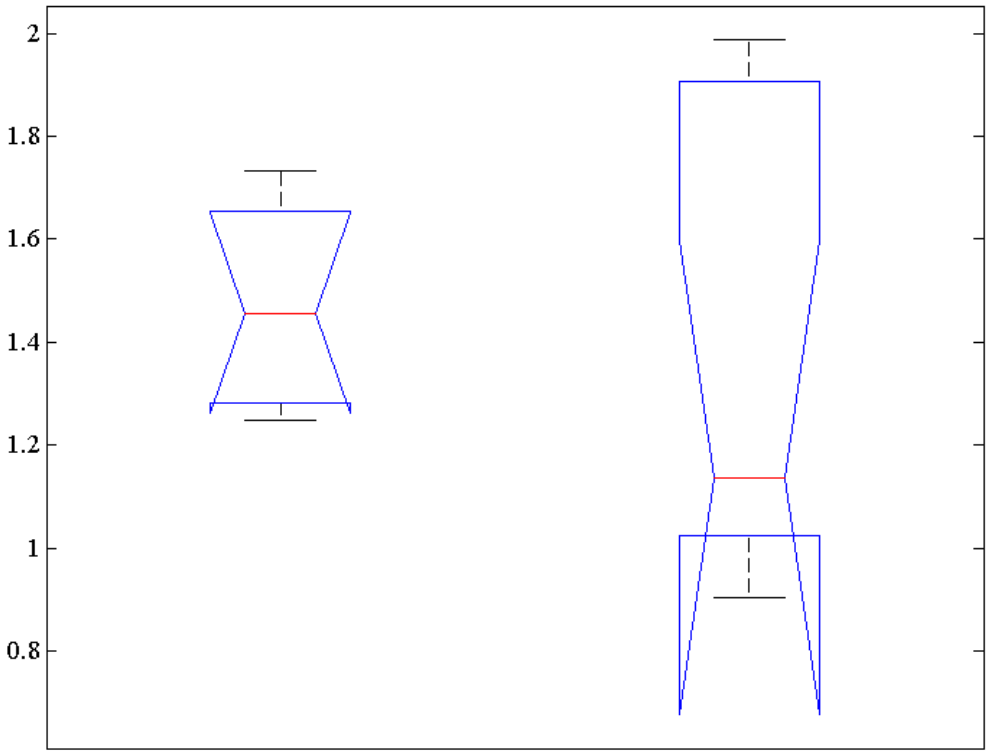
Slika 52. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno)

T-testom potvrđena je i statistička značajnost rezultata modula elastičnosti E_2 (p=0,0132). Slika 53. prikazuje rezultate analize varijance koji otvrđenuju statističku značajnost razlike rezultata (p=0,0132). U Tukyjevom testu interval pouzdanosti [0,1101-0,7940] ukazuje da je modul E_2 odmrznutih aorti (2.0555 MPa) statistički značajno manji od modula E_2 svježih uzoraka aorti (2.5076 MPa).



Slika 53. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno)

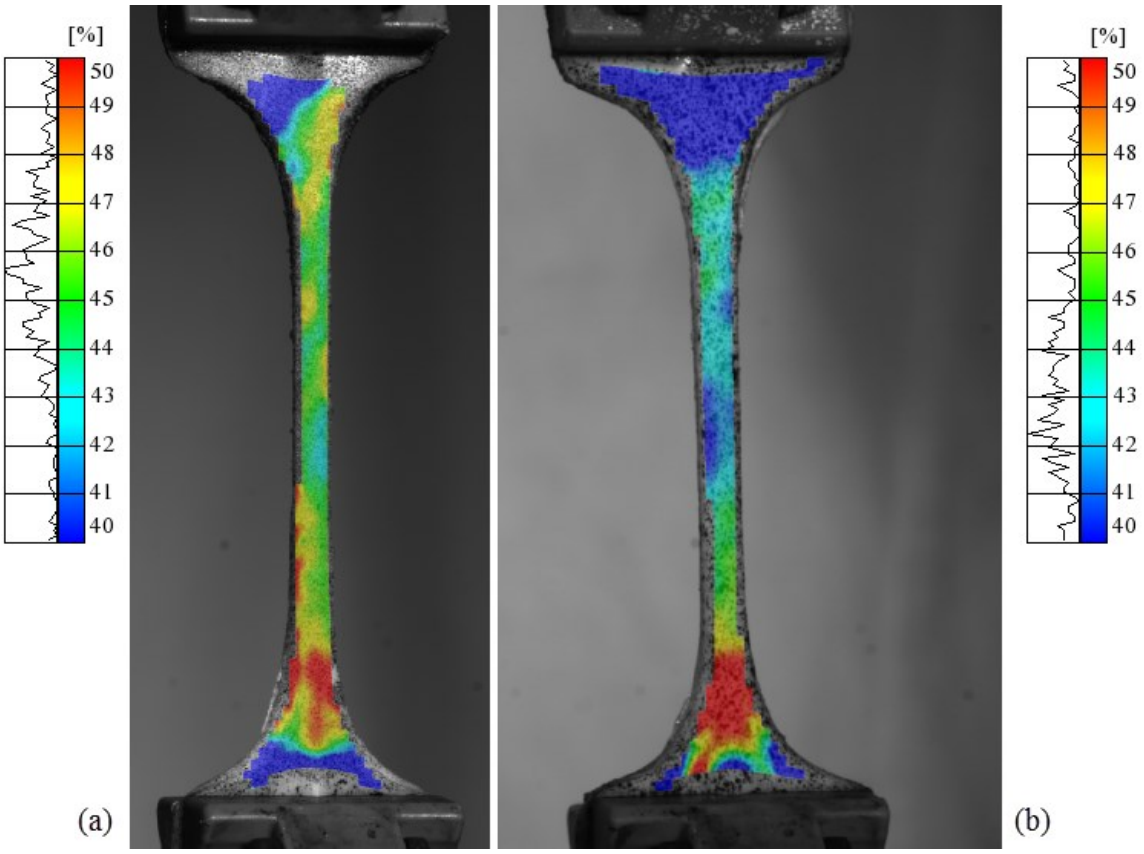
Promatrajući rezultate vlačne čvrstoće za svježe (R_m = 1.4168 MPa) i odmrznute uzorke (R_m = 1.3845 MPa) t-testom nije dobivena statistički značajna razlika (p = 0,5474) što je potvrđeno i ANOVA-om (p = 0,5474) čiji rezultati su dani na Slika 54.



Slika 54. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće uzdužnih svježih (lijevo) i uzoraka odmrznutih nakon mjesec dana pohrane (desno)

Tukeyjevim testom dobiven je interval pouzdanosti [-0,2439, 0,4432] koji sadrži 0. Ovo znači da rezultati vlačne čvrstoće ne pokazuju statistički značajnu razliku između svježih i odmrznutih uzoraka.

Slika 55. prikazuje polje deformacija dobiveno DIC metodom za svježi (a) i uzorak odmrznut (b) nakon mjesec dana pri von Misesovoj deformaciji od 40-50%. Budući da u ovom istraživanju nisu korištene histološke metode kako bi se utvrdila točna orijentacija vlakana ovi rezultati su interpretirani bez zaključaka o povezanosti orijentacije vlakana i deformacije samog tkiva aorte.

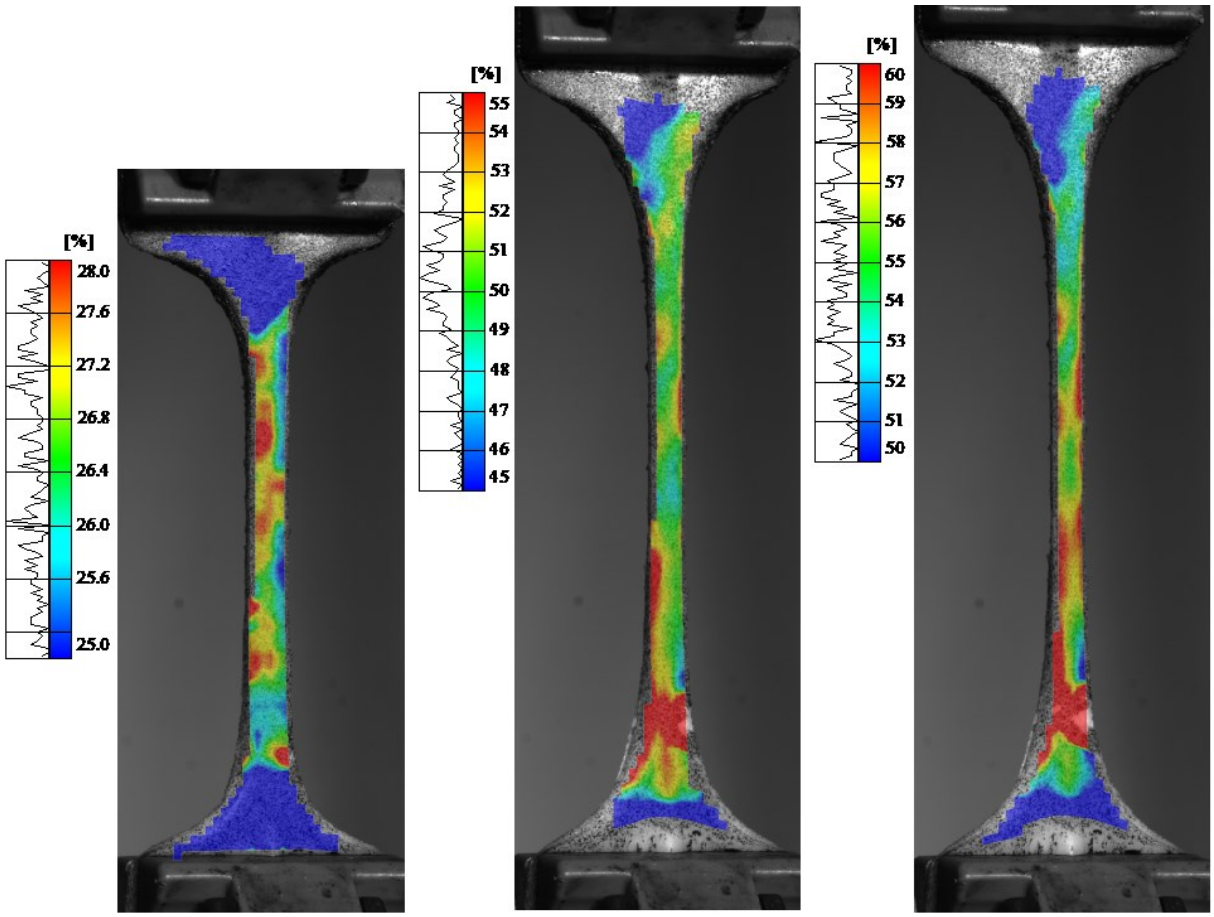


Slika 55. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon mjesec dana (b)

Na gornjoj slici plavom bojom obojani su dijelovi uzorka s najmanjom deformacijom, a crvenom bojom područja maksimalne deformacije. Unatoč nedostatku poznavanja točne orijentacije vlakana unutar tkiva uzorka, rezultati optičkih mjerenja jasno ukazuju na heterogenost polja deformacije koje proizlazi iz heterogene strukture uzorka odnosno anizotropnosti svojstava tkiva aorte.

Prilikom eksperimentalnog ispitivanja, korelacijom digitalne slike uočeno je povećano naprezanje blizu prihvata kao posljedica rubnih uvijeta. Naime, tijekom izrade uzoraka za ispitivanje upotrebom kalupa za izdvajanje tkiva i eventualnim oštećenjima prilikom izdvajanja kirurškim skalpelom, prekidaju se veze među pojedinim vlaknima te se na tim mjestima prvo pojavljuju povećane deformacije te naknadno prva mjerljiva pucanja tkiva. U pravilu, ovo su mjesta uz rub uzorka, kako je prikazano na Slika 56. gdje su crvenom bojom označena područja veće, a plavom bojom područja manje deformacije po von Misesu prikazane za tri uzastopne slike tijekom eksperimentalnog ispitivanja.

Također, povećano naprezanje odnosno deformacija javlja se i u blizini čeljusti kao posljedica prihvata kojim se dodatno opterećuje uzorak na tom mjestu.

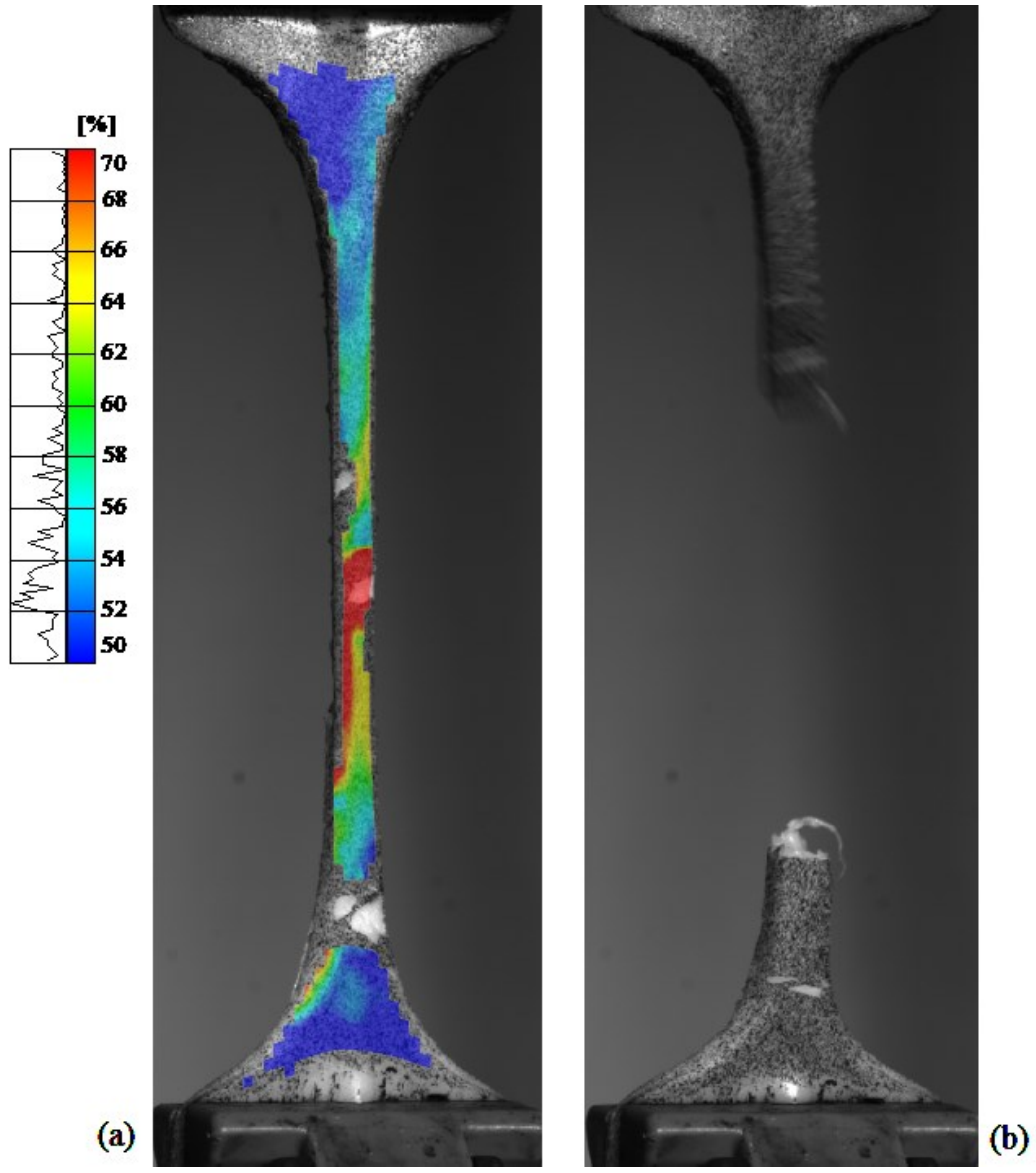


Slika 56. Porast polja deformacije prilikom eksperimentalnog ispitivanja

Povećanje deformacija dovodi do pucanja tkiva, i to prvo sloja intime odnosno sloja endotelnih stanica i tanke elastične lamine. Na gornjoj slici vidljivo je pucanje intime blizu donjeg prihvata nakon čega, uslijed porasta deformacije, počinje pucanje intime i na drugim mjestima. Na Slika 57. (a) vidljiva su čak tri mjesta na kojima je intima pukla.

Nakon pucanja ovog sloja gube se podaci o pomacima na tom području budući da je ovdje tkivo nakon pucanja bez nanesenog rastera što je očita prepreka ispitivanju aorte koja nakon pucanja intime može još uvijek prenositi opterećenje, sve do konačnog pucanja ostalih slojeva tj. cijelog uzorka (Slika 57. (b)).

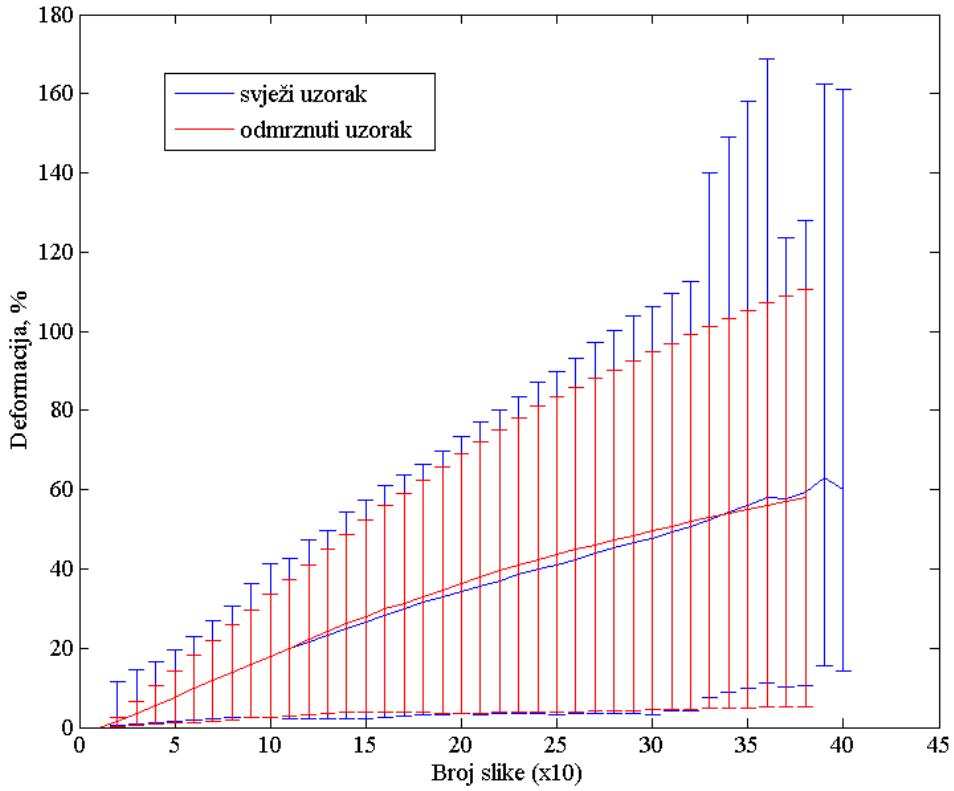
Unatoč pucanju intime na nekoliko mjesta, svi uzorci (uzdužni i poprečni) koji su završili test pucanjem, odnosno nisu se izvukli iz prihvata, konačno su pukli pri sredini uzorka kako je i priželjkivano za dobro proveden eksperimentalni test.



Slika 57. Slika uzorka prije samog pucanja (a) te uzorak nakon pucanja (b)

Svježi uzorci iskazuju nešto veće maksimalne deformacije prilikom istog opterećenja što se vidi i na dijagramu (Slika 58.) koji prikazuje vrijednosti polja deformacije u pojedinoj slici za svježi i odmrznuti uzorak. Vertikalne linije opisuju maksimalni odnosno minimalni iznos deformacije u određenoj slici dok se prosječna vrijednost mijenja prema prikazanim linijama.

Promatrajući kretanje polja deformacije tijekom eksperimenta (Slika 58.) može se uočiti nelinearni mehanički odziv tkiva aorte u jednoosnom vlačnom testu. Na ovaj način metodom korelacije digitalne slike dokazano je nelinearno ponašanje tkiva svinjske torakalne aorte.



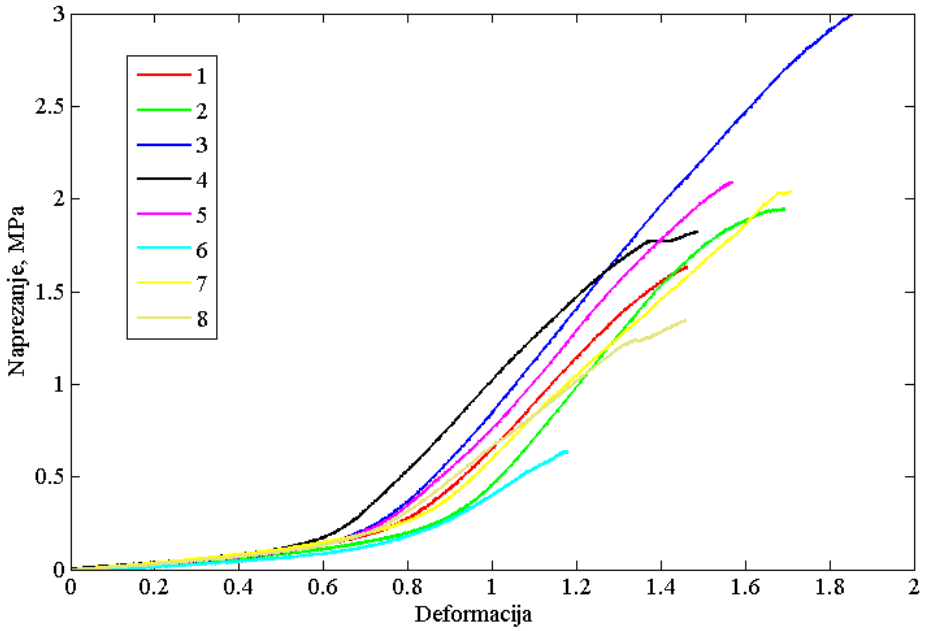
Slika 58. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane

Neparametarskom analizom varijance utvrđena je statistički signifikantna razlika u vrijednosti polja pomaka odmrznutih i svježih uzoraka (p= 3.8299e-06) što navodi na zaključak kako se mehanički odziv u uzdužnom smjeru mijenja već nakon mjesec dana zamrzavanja. Na ovo upućuju i eksperimentalni rezultati dobiveni s kidalice.

➢ Četiri mjeseca pohrane

Ukupno je ispitano 10 svježih uzoraka aorte od kojih je 8 uzoraka puklo tijekom eksperimentalnog ispitivanja. Uzorak 9 puknuo je pri stavljanju u prihvat uslijed reza prilikom čišćenja uzorka kirurškim skalpelom, dok je uzorak 10 proklizavao tijekom čitavog eksperimenta. Iz ovih razloga, uzorci 9 i 10 nisu uspješno završili ispitivanje te njihovi rezultati nisu razmatrani prilikom određivanja modula elastičnosti (E_1 i E_2) kao ni vlačne čvrstoće (R_m). Slika 59. prikazuje dijagrame *deformacija-naprezanje* za svježe uzdužne uzorke, za pohranu u trajanju od četiri mjeseca.

Rezultati modula elastičnosti i vlačne čvrstoće svježih uzoraka dani su u tablici 8.



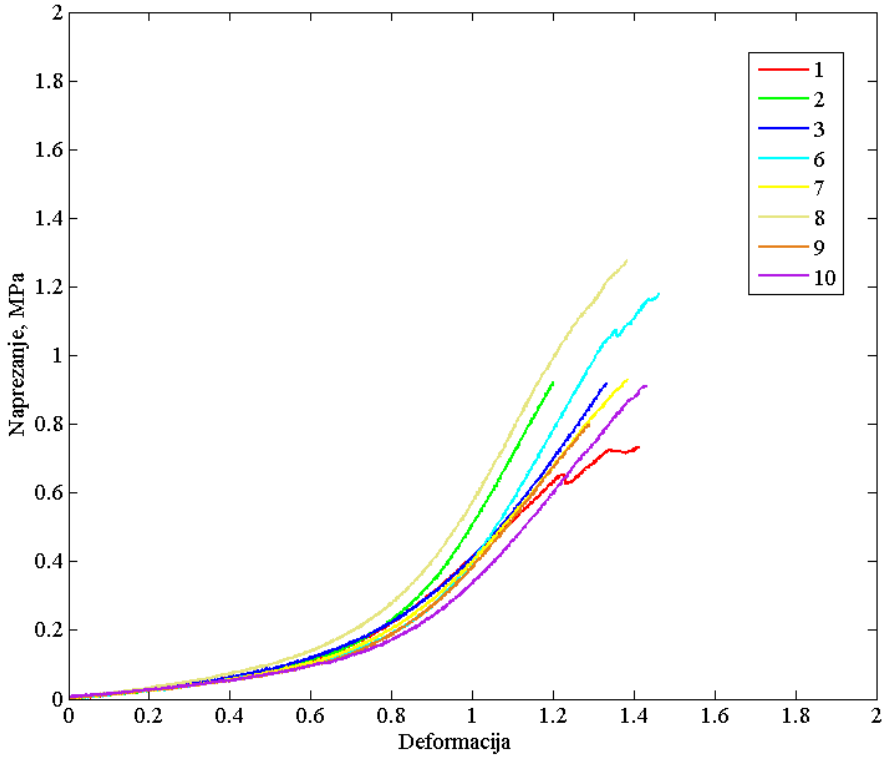
Slika 59. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih uzdužnih uzoraka aorte za pohranu od četiri mjeseca

Tablica 7. Rezultati ispitivanja svježih uzdužnih uzoraka za pohranu od četiri mjeseca

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.206094	2.389699	1.632244
2	0.202001	2.742754	1.944154
3	0.199939	2.780663	3.017066
4	0.205820	2.374846	1.820407
5	0.188729	2.580457	2.093319
6	0.169758	1.373806	0.637328
7	0.227752	2.207785	2.037400
8	0.198395	1.763284	1.344154
9	-	-	-
10	-	-	-
M	0.199811	2.276662	1.815759
St. dev.	0.016428	0.488352	0.679348

Dijagram *deformacija-naprezanje* za uzdužne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane prikazan je na Slika 60. dok su vrijednosti za module i vlačnu čvrstoću dani u Tablica 8.

Prilikom ispitivanja odmrznutih uzoraka, uzorci 4 i 5 izvlačili su se iz prihvata tijekom eksperimenta i to iznad 0,6% odnosno 1% deformacije te rezultati modula elastičnosti (E_2) za ove uzorke nisu uzeti u obzir. Kako su se isti uzorci izvukli iz čeljusti prije pucanja, za ove uzorke nije određen niti iznos vlačne čvrstoće, te je i ovdje uspješno ispitano 8 uzdužnih uzoraka.



Slika 60. Dijagram *deformacija-naprezanje* uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon četiri mjeseca pohrane

Eksperimentom je utvrđeno kako se modul elastičnosti E_1 smanjuje nakon četiri mjeseca odmrzavanja s 0,1998 MPa na 0,1579 MPa što ukazuje na pad krutosti tkiva aorte u prvom linearnom dijelu mehaničkog odziva.

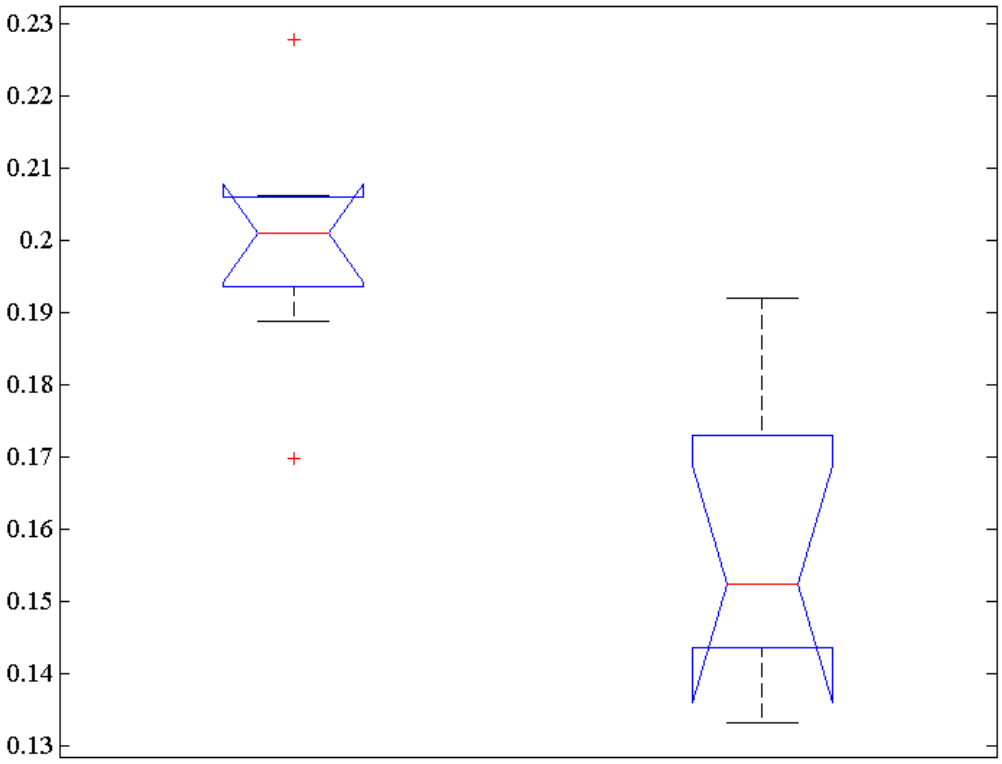
Odmrznuti uzorci iskazali su i pad modula pri velikim deformacijama odnosno u drugom linearnom dijelu (E_2) mehaničkog ponašanja pri čemu se modul smanjio s ,2767 MPa za svježe na 1,6254 MPa za odmrznute uzorke.

Vlačna čvrstoća veća je kod svježih uzoraka (1,8158 MPa) i to dva puta (0,9597 MPa) što jasno govori o promjenama u mehaničkim svojstvima tkiva aorte nakon četiri mjeseca pohrane.

Tablica 8. Rezultati ispitivanja uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon četiri mjeseca pohrane

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.164903	1.085587	0.73406
2	0.15832	2.09069	0.922222
3	0.181156	1.54168	0.918809
4	-	-	-
5	-	-	-
6	0.133201	1.987474	1.183297
7	0.146391	1.425329	0.930719
8	0.191892	2.01283	1.274873
9	0.145801	1.469982	0.800145
10	0.141165	1.389527	0.913725
M	0.157854	1.625388	0.959731
St. dev.	0.020405	0.361726	0.181946

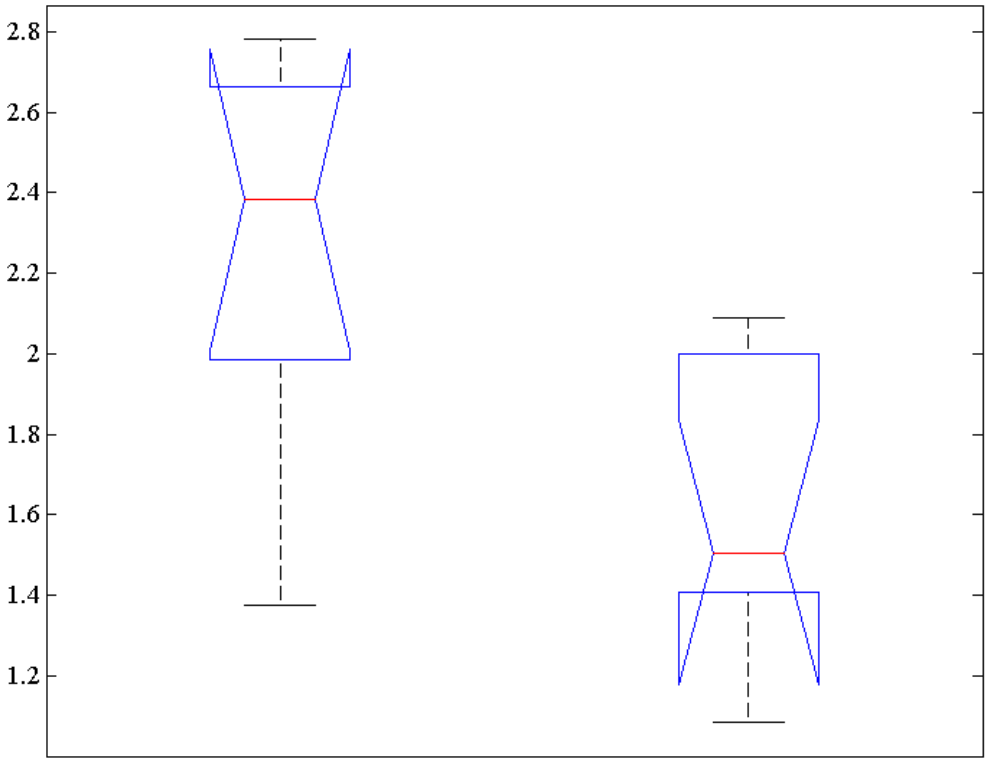
Modul elastičnosti E_1 odmrznutih aorti (0,1579 MPa) manji je od modula E_1 svježih aorti (0,1998 MPa). Statistička signifikantnost ovih rezultata utvrđena je t-testom ($p = 0{,}0004$) te provjerena analizom varijance ($p = 0{,}0005$) čije rezultate prikazuje Slika 61, na kojoj su crvenim križićima označeni outlieri. U Tukyjevom testu interval pouzdanosti [0,0221, 0,0618] ne sadržava 0 te se i ovi rezultati mogu smatrati statistički signifikantnima pri $p < 0{,}05$.



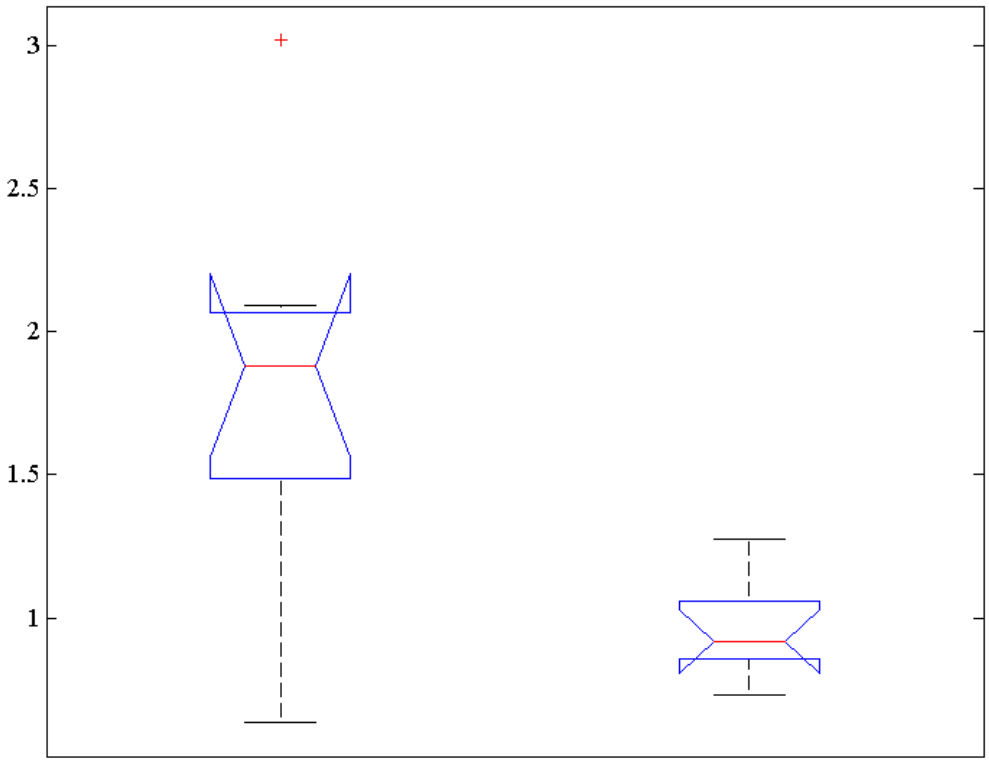
Slika 61. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno)

Pri velikim deformacijama modul elastičnosti E_2 odmrznutih uzoraka aorte (1,6254 MPa) manji je od onog kod svježih uzoraka (2,2767 MPa). T-test pokazuje da su ti rezultati statistički značajno različiti ($p = 0{,}009$). Slika 62. prikazuje rezultate analize varijance kojom je dokazano kako su vrijednosti modula E_2 za svježe i odmrznute uzorke statistički značajno različiti ($p = 0{,}009$). Ovo je potvrđeno i Tukyjevim testom u kojem interval pouzdanosti [0,1904, 1,1121] ne sadrži 0 te se ovi rezultati mogu smatrati statistički signifikantnima.

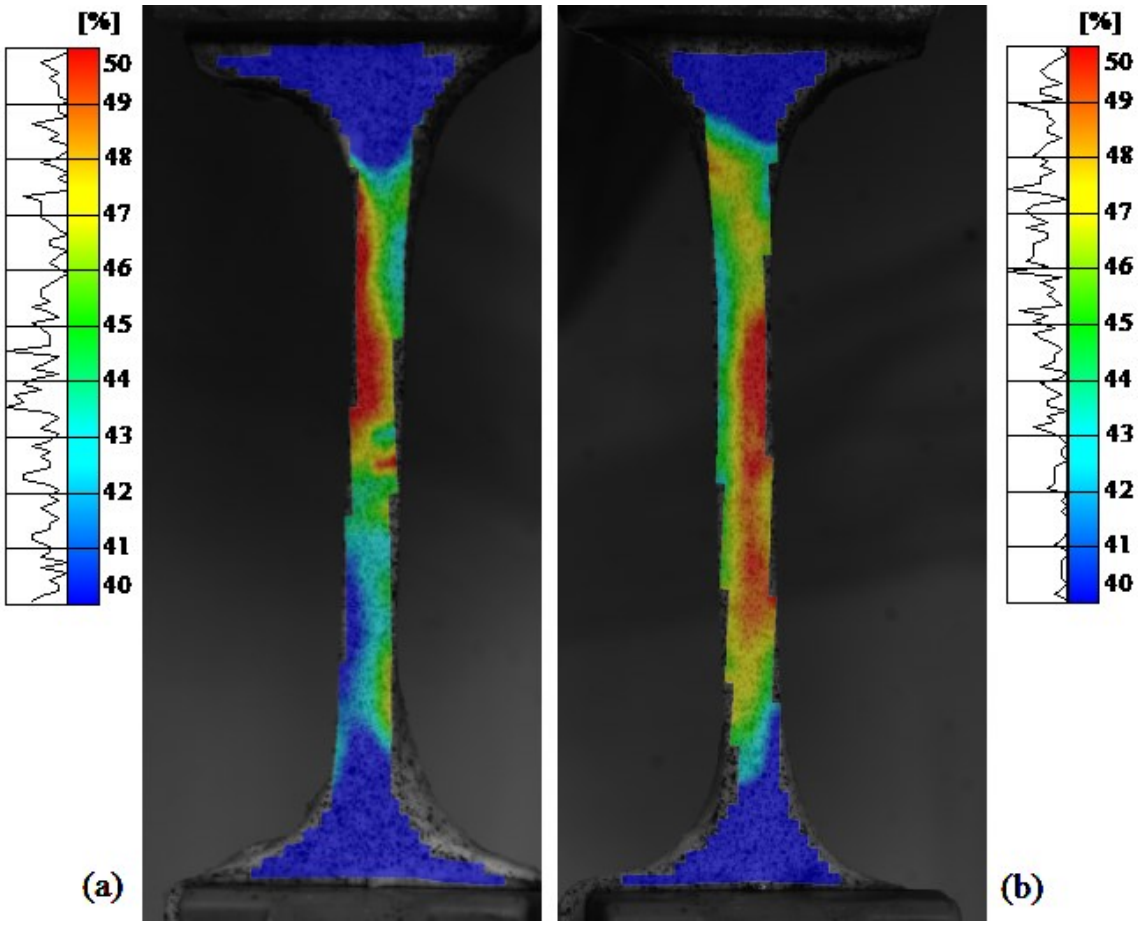
Nakon pohrane u trajanju od četiri mjeseca eksperimentalno je utvrđeno kako je vlačna čvrstoća odmrznutih uzoraka (0.9597 MPa) manja od vlačne čvrstoće svježih uzorka (1,8158 MPa). T-test pokazao je signifikantnost razlike ovih rezultata ($p = 0{,}004$) što je potvrđeno provedenom analizom varijance ($p = 0{,}004$) čije rezultate prikazuje Slika 63. Tuky testom utvrđen je interval pouzdanosti rezultata vlačne čvrstoće [0,3227, 1,3893] koji ne sadrži 0 što konačno dokazuje kako se rezultati R_m svježih i odmrznutih uzdužnih uzoraka statistički značajno razlikuju.



Slika 62. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno)



Slika 63. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno)



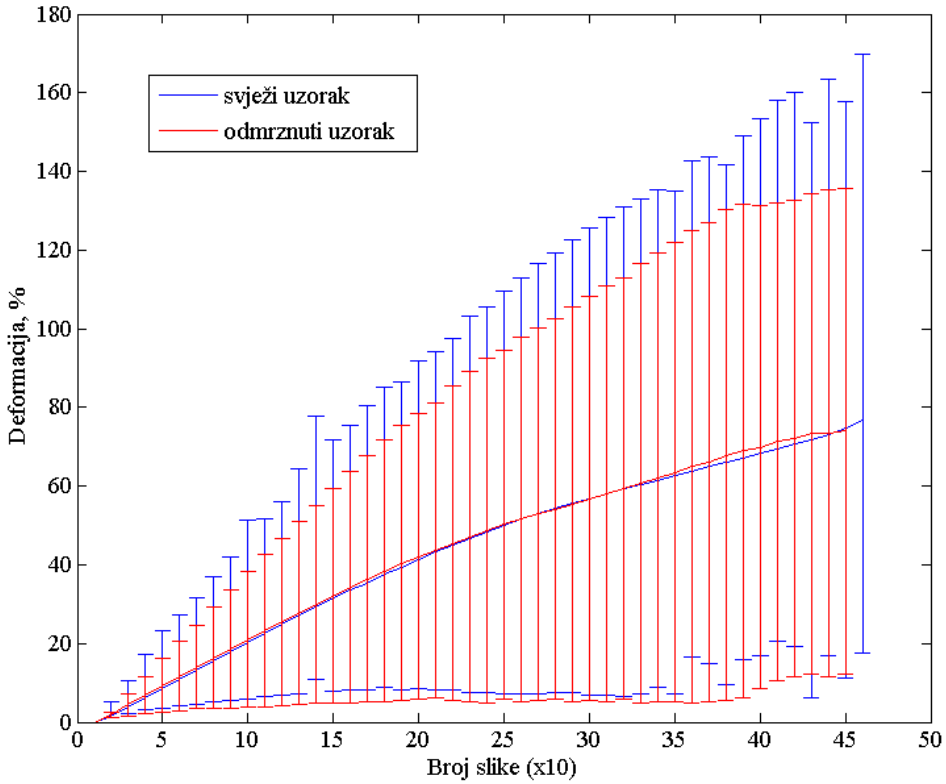
Slika 64. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon četiri mjeseca (b)

Prilikom eksperimentalnog ispitivanja uzoraka nakon četiri mjeseca pohrane uočeni su isti efekti kao i kod skupine uzoraka pohrane u trajanju od mjesec dana. Prije svega, promatrajući kretanje polja deformacije tijekom ispitivanja (Slika 65.) može se uočiti njegovo nelinearno ponašanje što ukazuje na nelinearno mehaničko ponašanje tkiva aorte.

Također, uočen je i porast deformacije na rubnim djelovima uzoraka dok su deformacije nešto manje u blizini prihvata uzorka. Kao što je ranije navedeno, ovo je posljedica prihvata te pripreme uzorka prilikom koje dolazi do neminovnog prekida vlakana na liniji po kojoj se uzorak izdvaja iz ostatka tkiva. Posljedica rezanja vlakana je smanjena krutost uzorka na tom mjestu što dovodi do povećane deformacije pri istom naprezanju.

Promatrajući dijagram na Slika 65. može se uočiti kako svježi uzorci prilikom eksperimenta poprimaju širi spektar deformacija od odmrznutih uzoraka, vidljivo iz razlike maksimalnih vrijednosti polja (vertikalne linije). U slučaju da je poznata veza

između broja slike i naprezanja (sile opterećenja) u toj slici, površina ispod ovih krivulja mogla bi se povezati s energijom deformiranja. Oprema korištena u ovom istraživanju, Aramis optički sustav i upravljačka jedinica kidalice, nije u mogućnosti povezati ova dva signala te se u ovom radu neće izvoditi zaključci o vrijednosti i kretanju energije deformiranja tkiva aorte.

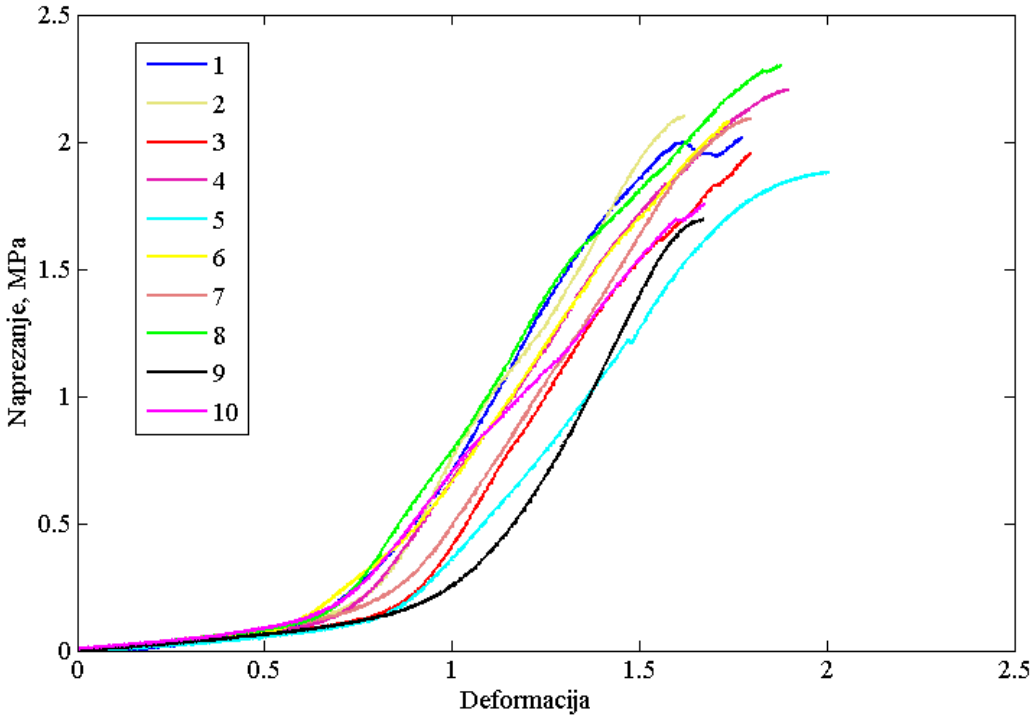


Slika 65. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za uzdužne svježe i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane

Neparametarskom analizom varijance provedenom na rezultatima uzoraka odmrznutih nakon četiri mjeseca pohrane nije ustanovljena statistički značajna promjena ($p=0,3807$), iako rezultati i dalje upućuju na veći raspon deformacija koje poprimaju svježi uzorci tijekom eksperimenta, kao i na nešto veću maksimalnu deformaciju svježeg tkiva aorte (Slika 65.).

➢ Devet mjeseci pohrane

Od ukupno 10 svježih uzoraka za eksperimentalno ispitivanje, tri uzorka (3, 7 i 5) proklizavala su pri niskim deformacijama, dok je kod uzorka 10 došlo do rotacije čeljusti pri deformacijama iznad 1%. Rezultati uzoraka 3, 4 i 5 za modul elastičnosti E_1 nisu uzeti u obzir zbog izvlačenja uzorka na početku testa. Unatoč proklizavanju, svi uzorci završili su test pucanjem tkiva te je dobiven iznos vlačne čvrstoće za sve svježe uzorke.



Slika 66. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih uzdužnih uzoraka aorte za pohranu od devet mjeseci

Slika 66. prikazuje eksperimentalno dobiven odnos *deformacija-naprezanje* za uzdužne svježe uzorke čiji su odgovarajući parovi uzoraka pohranjeni u tekućem dušiku na devet mjeseci dok Tablica 9. prikazuje rezultate ovih uzoraka za modul elastičnosti pri malim deformacijama (E_1), modul elastičnosti u drugom linearnom dijelu mehaničkog ponašanja tkiva aorte (E_2) te vlačnu čvrstoću (R_m) odnosno naprezanje pri kojem je došlo do pucanja uzorka.

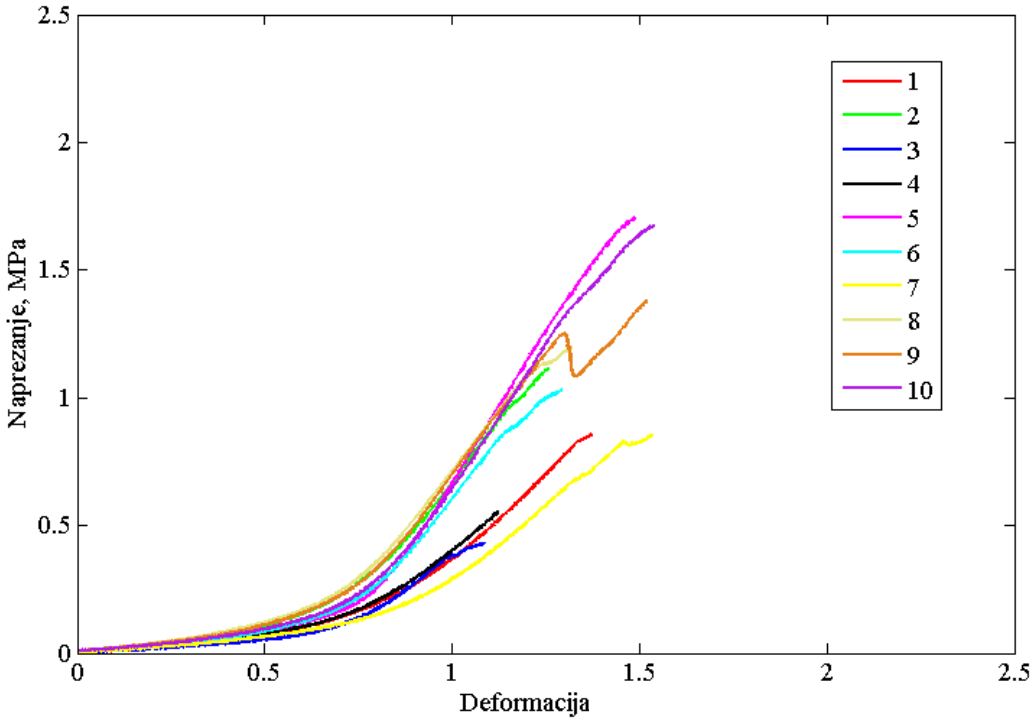
Tablica 9. Rezultati ispitivanja svježih uzdužnih uzoraka za pohranu od devet mjeseci

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.188667	2.647017	2.01358
2	0.159165	2.380478	2.09833
3	-	2.444254	1.952796
4	-	2.128555	2.205374
5	-	1.977121	1.879956
6	0.140846	2.173337	2.081627
7	0.167492	2.278191	2.093537
8	0.153366	2.272891	2.302033
9	0.13442	2.829067	1.693464
10	0.168518	1.901960	1.752505
M	0.158925	2.3032870	2.007320
St. dev.	0.018295	0.286132	0.191482

Slika 67. prikazuje odnos *deformacija-naprezanje* dobiven eksperimentalnim ispitivanjem uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon 9 mjeseci. Eksperimentalni rezultati modula elastičnosti E_1 i E_2 te vlačne čvrstoće R_m dani su u Tablica 10. s istaknutim prosječnim vrijednostima te standardnom devijacijom pojedinog rezultata.

Tijekom ispitivanja uzoraka odmrznutih nakon 9 mjeseci došlo je do namještanja određenih uzoraka (2, 8 i 9) u čeljustima kidalice na samom početku testa, pa za navedene uzorke nije dobiven rezultat modula elastičnosti (E_1). Nakon početnog namještanja uzoraka eksperimenti su provedeni do kraja uz pucanje uzoraka čime je dobiven iznos vlačne čvrstoće za sve uzorke.

Promatrajući navedene rezultate može se uočiti pad krutosti tkiva aorte nakon odmrzavanja na što ukazuje smanjenje vrijednosti modula elastičnosti E_1 i E_2 kao i vlačne čvrstoće R_m. Modul E_1 se smanjio s 0,1589 MPa kod svježih na 0,1365 MPa kod odmrznutih uzoraka. Modul elastičnosti pri velikim deformacijama (E_2) prolazi kroz još veće promjene nakon odmrzavanja te opada s 2,3033 MPa na 1,7126 MPa nakon odmrzavanja, dok je vlačna čvrstoća nakon odmrzavanja (1,0798 MPa) gotovo dvostruko manja nego kod svježe aorte (2,0073 MPa).

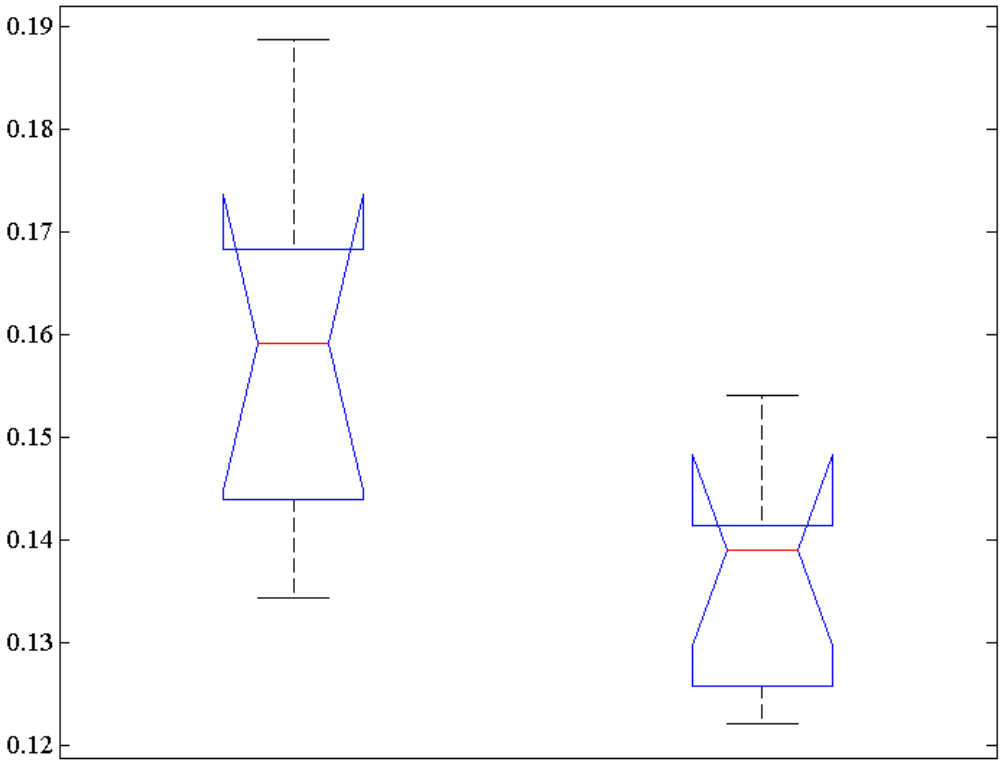


Slika 67. Dijagram *deformacija-naprezanje* uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon devet mjeseci pohrane

Tablica 10. Rezultati ispitivanja uzdužnih uzoraka aorte odmrznutih nakon devet mjeseci pohrane

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.141162	1.384299	0.858025
2	-	1.946095	1.110675
3	0.122737	1.141969	0.432389
4	0.139049	1.152442	0.552796
5	0.154067	2.374021	1.704139
6	0.134979	1.879408	1.030937
7	0.122172	1.203075	0.854611
8	-	1.904884	1.197095
9	-	1.921007	1.380247
10	0.141573	2.218741	1.676979
M	0.136534	1.712594	1.079789
St. dev.	0.011251	0.454997	0.428247

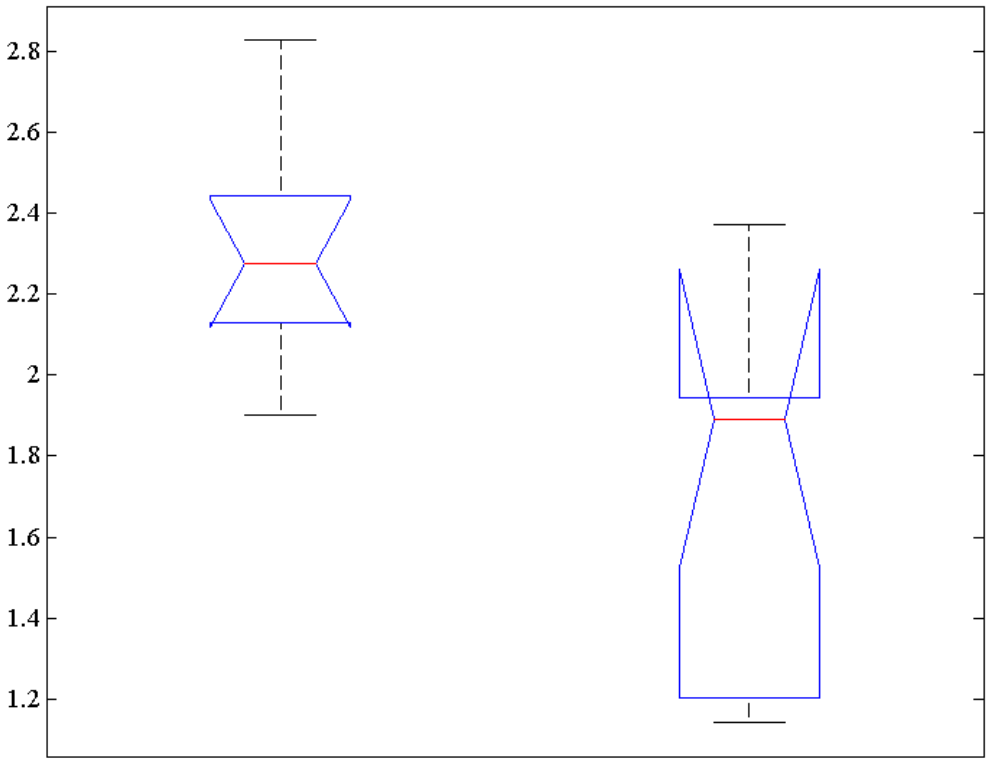
Statističkom obradom eksperimentalnih rezultata za module elastičnost E_1, t-testom je pokazana statistički značajna razlika (p = 0,0173) između modula odmrznutih (0,1365 MPa), odnosno svježih uzoraka (0,1589 MPa), a potvrđena je analizom varijance (p = 0,0173) (Slika 68.). Tuky test ne sadrži 0 [0,0047, 0,0401] te se rezultati smatraju statistički značajnima.



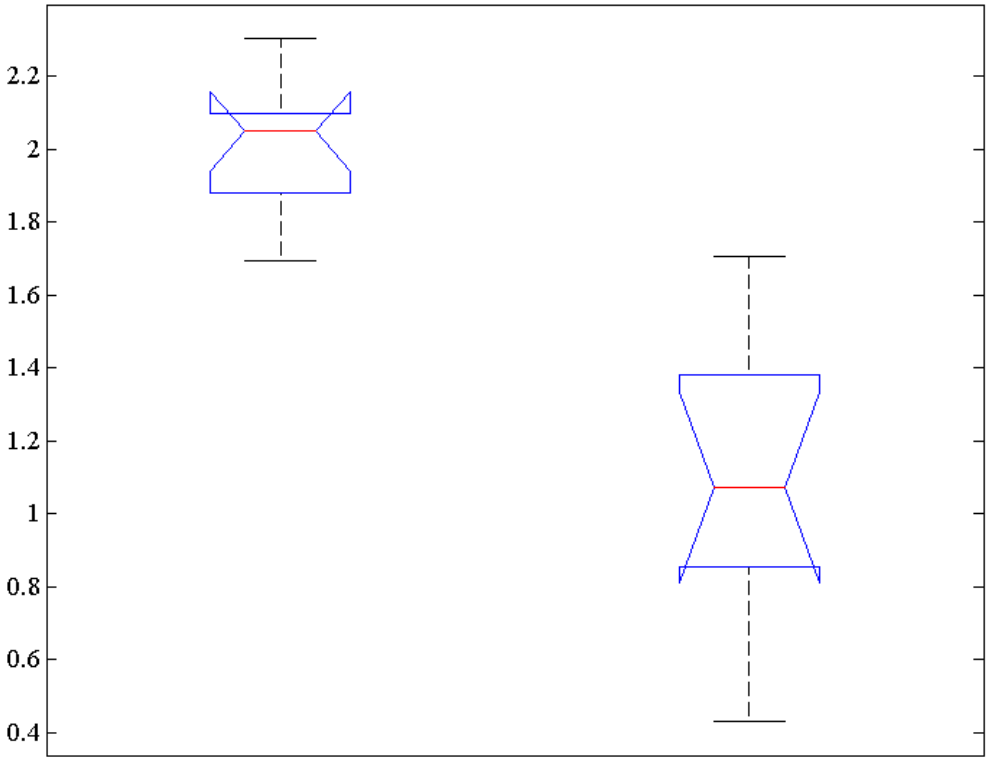
Slika 68. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno)

Modul elastičnosti E_2, manji je kod odmrznutih aorti (1,7126 MPa) nego kod svježih uzoraka (2,3033 MPa) što je pokazano t-testom (p = 0,0027), a potvrđeno analizom varijance (p = 0,0027) čije rezultate pokazuje Slika 69. Tuky testom interval pouzdanosti [0,2336, 0,9478] ne sadržava 0 te se ovi rezultati smatraju statistički značajnima.

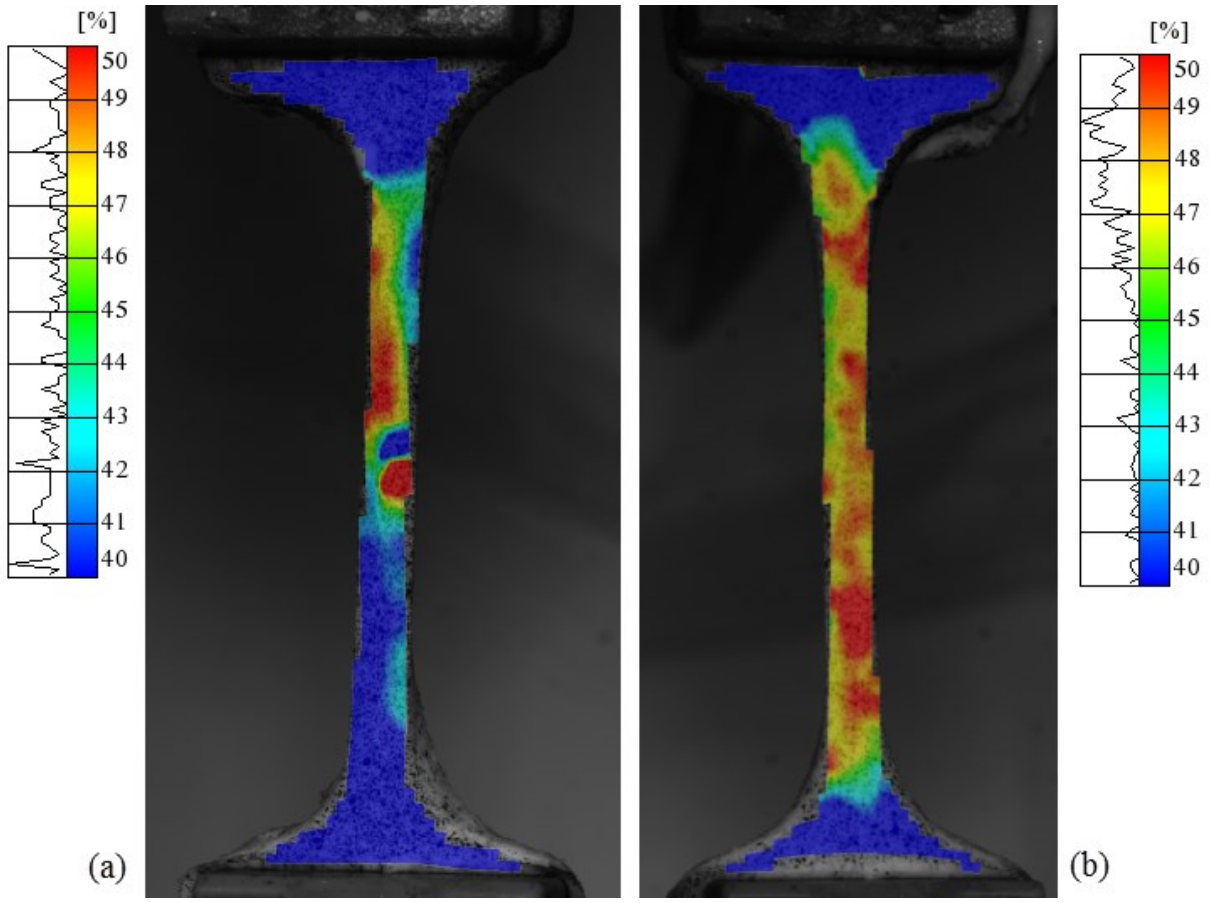
Nakon 9 mjeseci pohrane, odmrznute aorte postizale su statistički značajno (p = 6.7468e-06) manju vlačnu čvrstoću (1.0798 MPa) od svježih uzoraka (2.0073 MPa) što je potvrđeno ANOVA-om (p = 6.7468e-06) te Tuky testom [0,6159, 1,2392]. Slika 70. prikazuje rezultate analize varijance za vlačnu čvrstoću.



Slika 69. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno)



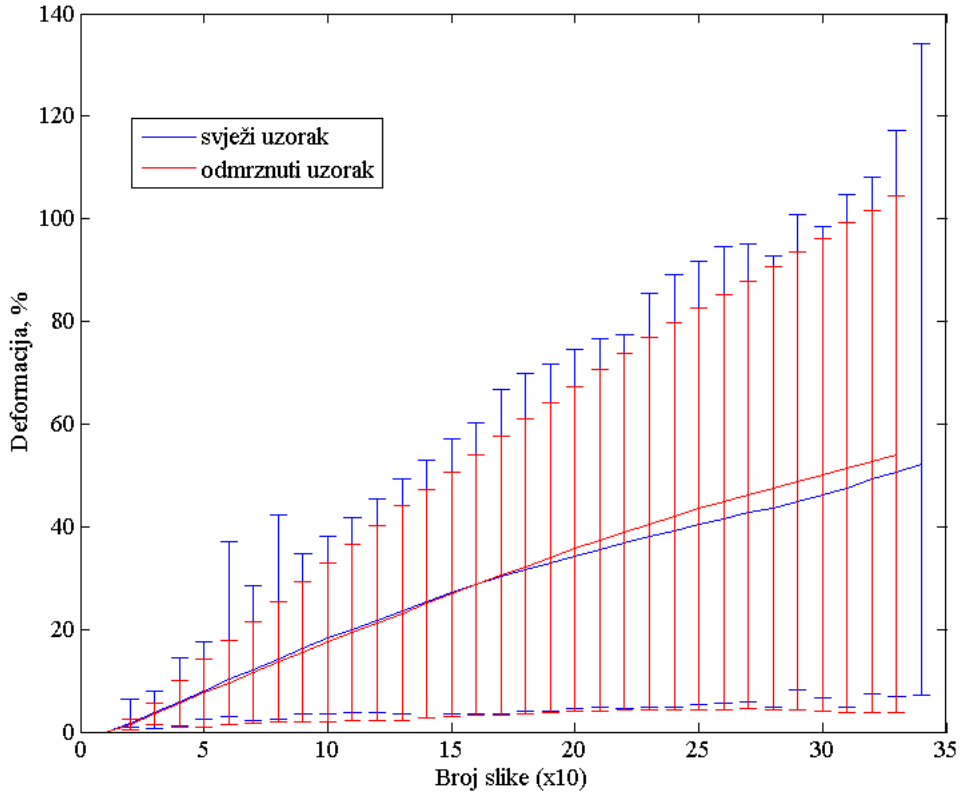
Slika 70. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za uzdužne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno)



Slika 71. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon devet mjeseci (b)

Aramis sustavom uhvaćeno je polje deformacije na uzdužnim uzorcima nakon pohrane od devet mjeseci (Slika 71.). Kao što je i očekivano, skok u iznosu deformacije pojavljuje se na rubovima uzorka odakle lagano prodire kroz čitavo tkivo dovodeći, kako je ranije opisano, prvo do pucanja intime, a onda i ostatka uzorka. Promatrajući rezultate korelacije digitalne slike uočeno je kako ova skupina uzoraka iskazuje manje deformacije na mjestu samog prihvata odnosno na mjestu sužavanja uzorka, za razliku od rezultata svježih uzoraka za pohranu od mjesec dana (Slika 55.).

Metodom korelacije digitalne slike i kod uzoraka nakon devet mjeseci pohrane uočen je širi spektar deformacija nego kod svježeg tkiva što se može uočiti na dijagramu danom na Slika 72. Također, i ovdje se pokazalo kako svježi uzorci mogu poprimiti veće deformacije prije samog pucanja nego uzorci odmrznuti nakon devet mjeseci pohrane.



Slika 72. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane

Slika 72. prikazuje kretanje polja pomaka prilikom eksperimentalnog ispitivanja svježih i uzoraka odmrznutih nakon devet mjeseci. Linija koja prati srednju vrijednost polja deformacije u određenoj slici jasno ukazuje na nelinearno ponašanje polja deformacije odnosno mehaničkog odziva tkiva aorte u statičkom vlačnom testu.

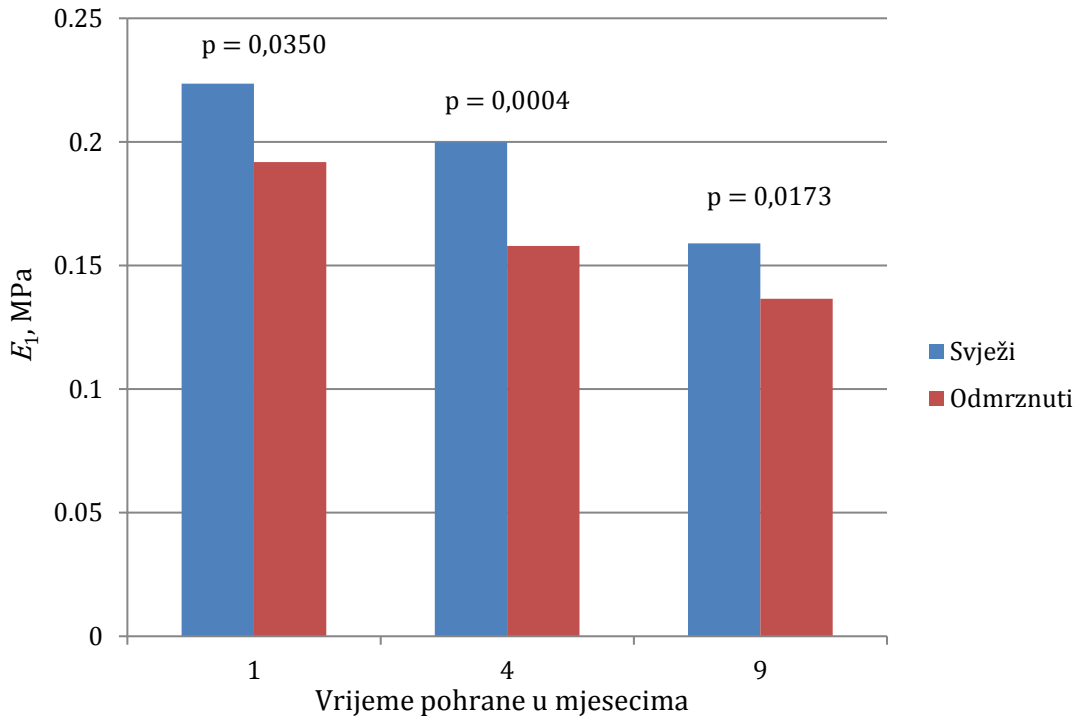
Uzorci odmrznuti nakon 9 mjeseci pokazali su u Kolmogorov-Smirnovom testu statistički značajnu razliku rezultata u odnosu na svježe uzorke aorte ($p = 4.6685e\text{-}06$).

➢ Rasprava

U provedenom istraživanju uzdužni uzorci torakalne svinjske aorte podvrgnuti su jednoosnom statičkom vlačnom testu pri čemu su s upravljačke jedinice kidalice prikupljeni podaci o deformaciji i naprezanju, dok je optičkom metodom korelacije digitalne slike dobiveno polje pomaka po čitavoj mjernoj površini uzoraka.

Iz podataka s kidalice određeni su modul elastičnosti u prvom (E_1) te u drugom linearnom području (E_2) mehaničkog odziva tkiva aorte, dok je u trenutku pucanja uzorka zabilježen podatak o vlačnoj čvrstoći uzorka (R_m). Navedeni rezultati ovdje su sumarno dani za ove tri skupine svježih i odmrznutih uzoraka.

Rezultati modula elastičnosti E_1 u uzdužnom smjeru aorte ukazuju na smanjenje krutosti nakon odmrzavanja što se vidi kao jasan trend na Slika 73. Ovo je potvrđeno i statističkom obradom dobivenih rezultata te su na istoj slici dani i rezultati statističke značajnosti (p) dobiveni t-testom. Pad krutosti nakon mjesec dana pohrane iznosi gotovo 15%, dok je nešto izraženiji nakon četiri mjeseca (27%). Nakon devet mjeseci pohrane modul elastičnosti E_1 u uzdužnom smjeru aorte manji je za oko 16%.

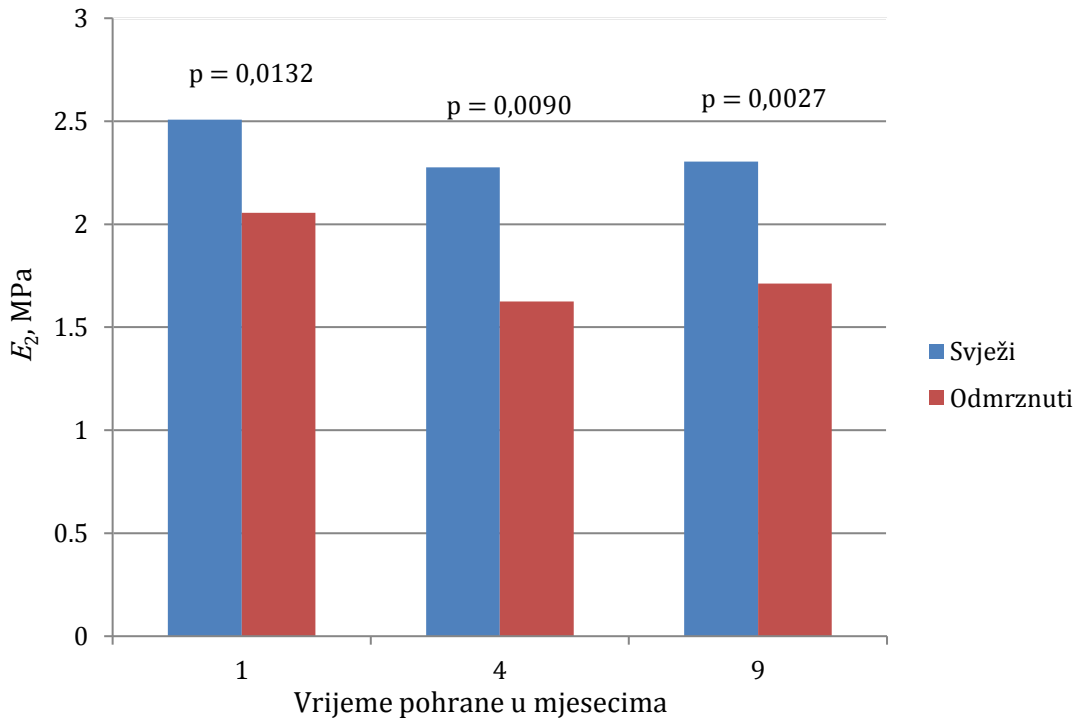


Slika 73. Vrijednosti modula elastičnosti E_1 za uzdužni smjer aorte za sve skupine uzoraka

Za sve uzorke potvrđen je statistički značajan pad modula E_1 ($p < 0,05$) nakon odmrzavanja.

Pad krutosti nakon odmrzavanja uzoraka vidljiv je i kod rezultata za modul elastičnosti E_2 (Slika 74.) koji ukazuje na krutost aorte pri velikim deformacijama, odnosno nakon uključenja kolagenskih vlakana u proces deformiranja.

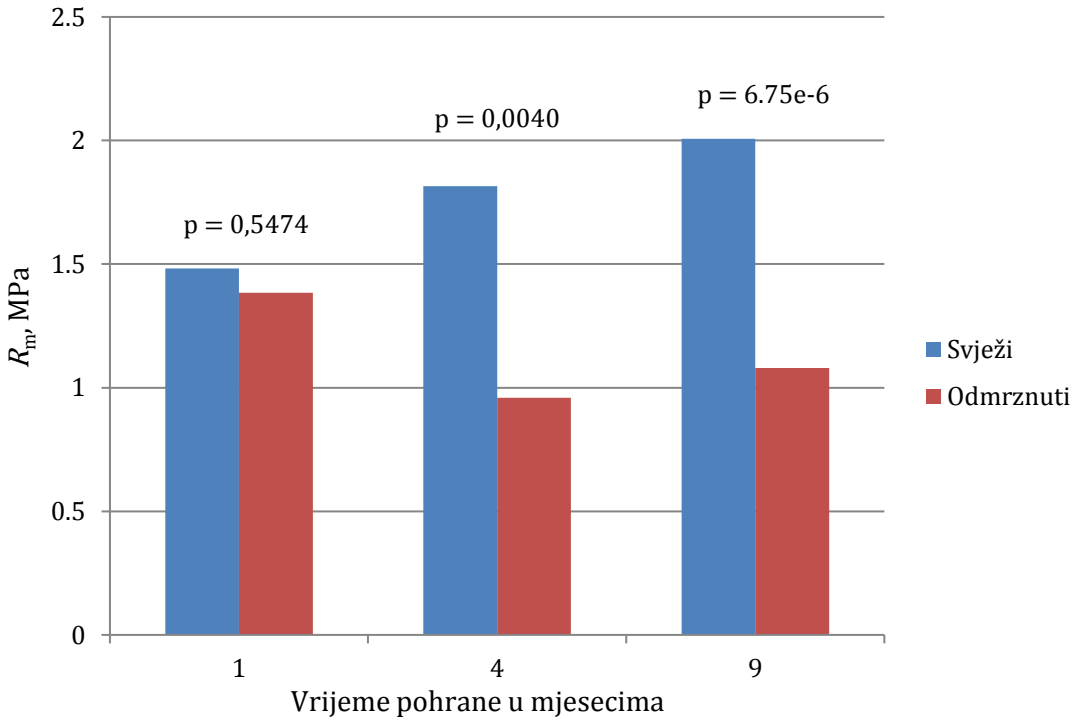
Promatrajući rezultate E_2 na Slika 74. može se uočiti kako je modul pri velikim deformacijama veći kod uzoraka odmrznutih nakon devet mjeseci nego kod skupine uzoraka pohranjene na četiri mjeseca. Ovdje treba imati na umu kako su te skupine aorti uzete od različitih životinja što može dovesti do malih odstupanja u eksperimentalnim rezultatima, dok su statističkim metodama uspoređivani samo uzorci unutar iste skupine. Također, bez daljnjih ispitivanja ne može se opovrgnuti ni mogućnost određenih posljedica krioprezervacije koje mogu dovesti do povećanja krutosti E_2 u uzdužnom smjeru nakon četvrtog mjeseca pohrane. Unatoč tome, eksperimentalno je dobiveno smanjenje modula elastičnosti E_2, a statističkim metodama je potvrđena značajnost za sve skupine odmrznutih uzoraka. Dakle, do statistički značajnih promjena, odnosno smanjenja krutosti aorte, dolazi već nakon prvog mjeseca pohrane (22%).



Slika 74. Vrijednosti modula elastičnosti E_2 za uzdužni smjer aorte za sve skupine uzoraka

Pad vrijednosti modula E_2 nakon četiri mjeseca pohrane iznosi čak 40%, dok je kod uzoraka odmrznutih nakon devet mjeseci ovaj pad nešto manji, oko 35%. Svi rezultati pokazali su se statistički značajnima pri čemu se p vrijednost za pojedine skupine uzoraka može vidjeti na Slika 74.

Određivanje vlačne čvrstoće R_m, uzoraka aorte, zahtjevan je proces iz više razloga. Iako se svega nekoliko uzoraka izvuklo prije kraja testa te za njih nisu dobiveni iznosi R_m, prilikom opterećenja uzoraka može doći do popuštanja na jednom ili više mjesta prije konačnog pucanja uzorka što kompromitira identificiranje ove veličine. Naime, u trenutku prvog popuštanja dolazi do smanjenja poprečne površine uzorka kojeg nije moguće zabilježiti. Također, samo mjernjenje poprečne površine uzorka zahtjeva preciznu mjernu opremu budući da već prilikom naslanjanja pomičnog mjerila na uzorak dolazi do deformiranja tkiva te prividnog smanjenja mjerene dimenzije (širina i debljina). Sve ovo dovodi do rasipanja rezultata vlačne čvrstoće te otežanog određivanja njene promjene pod utjecajem vremena pohrane uzorka. Slika 74. prikazuje utjecaj vremena pohrane uzoraka na vlačnu čvrstoću za sve skupine uzoraka.



Slika 75. Vrijednosti vlačne čvrstoće R_m za uzdužni smjer aorte za sve skupine uzoraka

Iako je u eksperimentalnim ispitivanjima uočen pad vlačne čvrstoće u uzdužnom smjeru uzoraka već nakon mjesec dana pohrane (7%), ova promjena nije statistički značajna.

Značajan pad vlačne čvrstoće, za otprilike 50%, uočen je kod uzoraka odmrznutih nakon četiri odnosno devet mjeseci te bi trebalo provesti dodatna ispitivanja nakon 2 i 3 mjeseca pohrane kako bi odredili točno vrijeme pohrane nakon kojeg se vlačna čvrstoća značajno smanji.

Metodom korelacije digitalne slike u provedenom istraživanju dobiveno je polje deformacije na površini uzorka u statičkom vlačnom testu. Rezultati jasno ukazuju na anizotropnost mehaničkog odziva tkiva aorte što dovodi u pitanje vjerodostojnost izotropnih materijalnih modela kakvi su najčešće u upotrebi. Također upotrebom ove optičke metode identificirano je nelinearno ponašanje tkiva aorte prilikom jednoosnog testa u smislu ponašanja polja deformacije u svim slikama ispitivanja uzorka. Svježi uzorci snimani ARAMIS sustavom dostizali su veće deformacije prije konačnog pucanja uzorka na što ukazuju i rezultati dobiveni s kidalice. Svježi uzorci poprimali su širi spektar deformacija u određenoj slici, odnosno pri određenom naprezanju, što bi moglo značiti i veću potencijalnu energiju deformacije kod svježih uzoraka, no za ovaj zaključak bilo bi potrebno povezati podatke ARAMIS sustava i upravljačke jedinice kidalice.

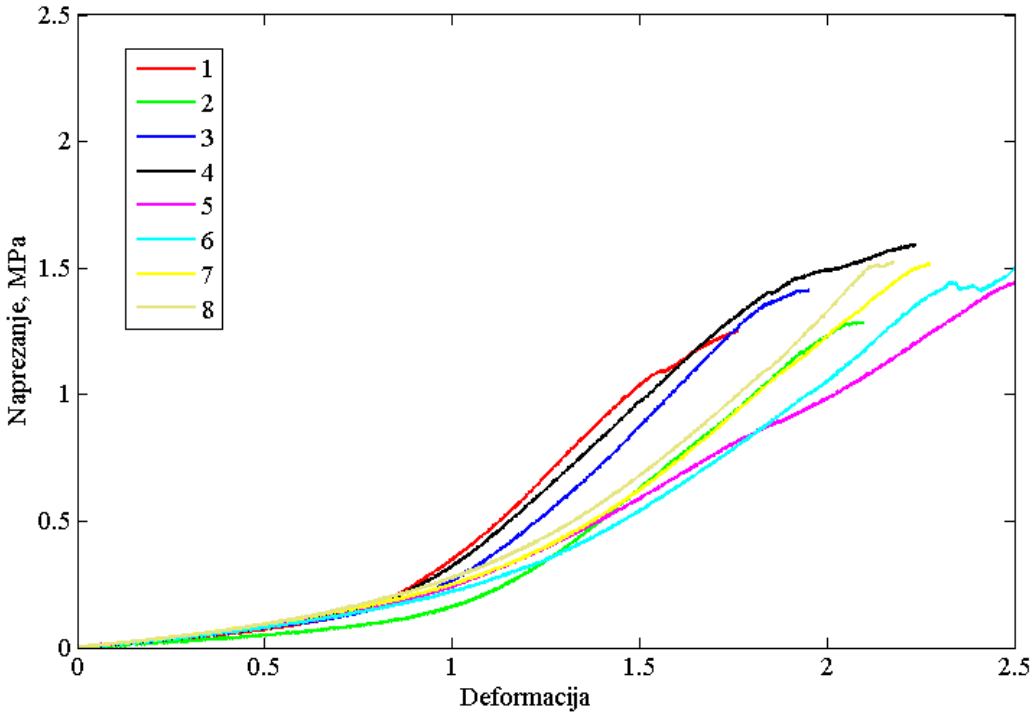
Zbog tehničke ograničenosti sustava ARAMIS, odnosno upravljačke jedinice kidalice, rezultate korelacije digitalne slike (polje deformacije u određenoj slici) nije bilo moguće direktno povezati s naprezanjem na kidalici te su ovi rezultati prikladniji za upotrebu u okviru metode konačnih elemenata gdje mogu poslužiti kao rubni uvjet na površini tkiva aorte. Kako sustav ARAMIS nudi pohranu geometrije uzorka u *stl formatu, moguće je ovo iskoristiti za izradu materijalnog modela aorte unutar nekog od FEM programskih paketa poput Abaqusa.

7.1.2. Poprečni uzorci

- **Jedan mjesec pohrane**

Ukupno je ispitano 8 svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od mjesec dana. Svi uzroci uspješno su završili testove pucanjem tkiva, te nije zabilježeno proklizavanje uzoraka ili namještanje čeljusti kidalice. Dva uzorka oštećena su prilikom pripreme te oni nisu bili podvrgnuti eksperimentalnom ispitivanju.

Na Slika 76. prikazani su eksperimentalni rezultati statičkog vlačnog ispitivanja svježih uzoraka aorte čiji su odgovarajući parovi pohranjeni u tekući dušik na mjesec dana. Iz rezultata je vidljivo da poprečni uzorci dostižu veće vrijednosti deformacije od uzdužnih uzoraka, a od ispitanih šest uzoraka je postiglo više od 2% inženjerske deformacije (2, 4, 5, 6, 7 i 8) što nije bio slučaj kod nijednog uzdužnog uzorka. Tablica 11. sadrži rezultate eksperimentalnih ispitivanja za sve uzorke i to za module elastičnosti E_1 i E_2 te vlačnu čvrstoću R_m.



Slika 76. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od mjesec dana

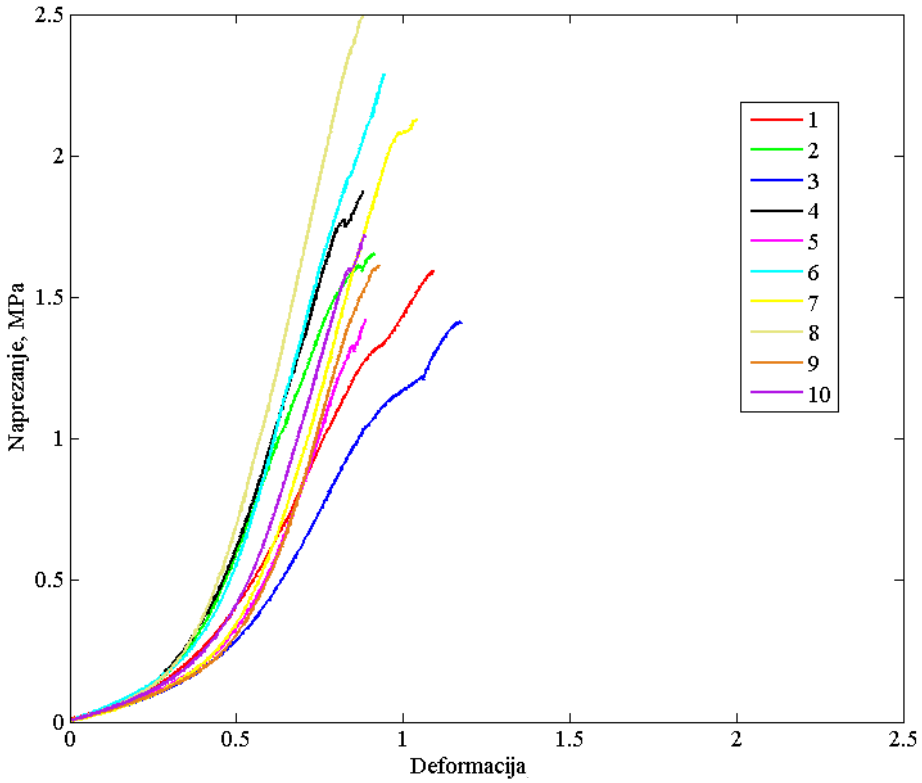
Tablica 11. Rezultati ispitivanja svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od mjesec dana

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.159868	1.457676	1.253116
2	0.095534	1.206886	1.28619
3	0.163622	1.44905	1.410127
4	0.173817	1.372766	1.591997
5	0.162828	0.825399	1.453187
6	0.148733	1.153896	1.501133
7	0.194605	1.228798	1.516006
8	0.198983	1.365079	1.522592
9	-	-	-
10	-	-	-
M	0.162249	1.257444	1.441794
St. dev.	0.032008	0.207864	0.118961

Pri ispitivanju odmrznutih uzoraka, svi eksperimenti završili su pucanjem uzoraka te je dobiven iznos vlačne čvrstoće i modula elastičnosti za 10 uzoraka.

Na Slika 77. prikazan je dijagram *deformacija-naprezanje* za poprečne uzorke odmrznute nakon mjesec dana. Iz rezultata je vidljiv porast nagiba krivulja *deformacija-naprezanje* u odnosu na svježe uzorake što za posljedicu ima povećanje modula elastičnosti E_1 i E_2 koji su zajedno s rezultatima vlačne čvrstoće dani u Tablica 12.

Ovaj porast krutosti u poprečnom smjeru nakon odmrzavanja uočen je i kod ostalih skupina poprečnih uzoraka čiji su rezultati dani u nastavku ovog poglavlja. Statističkim metodama danim u nastavku, utvrđena je statistička signifikantnost ovih rezultata.

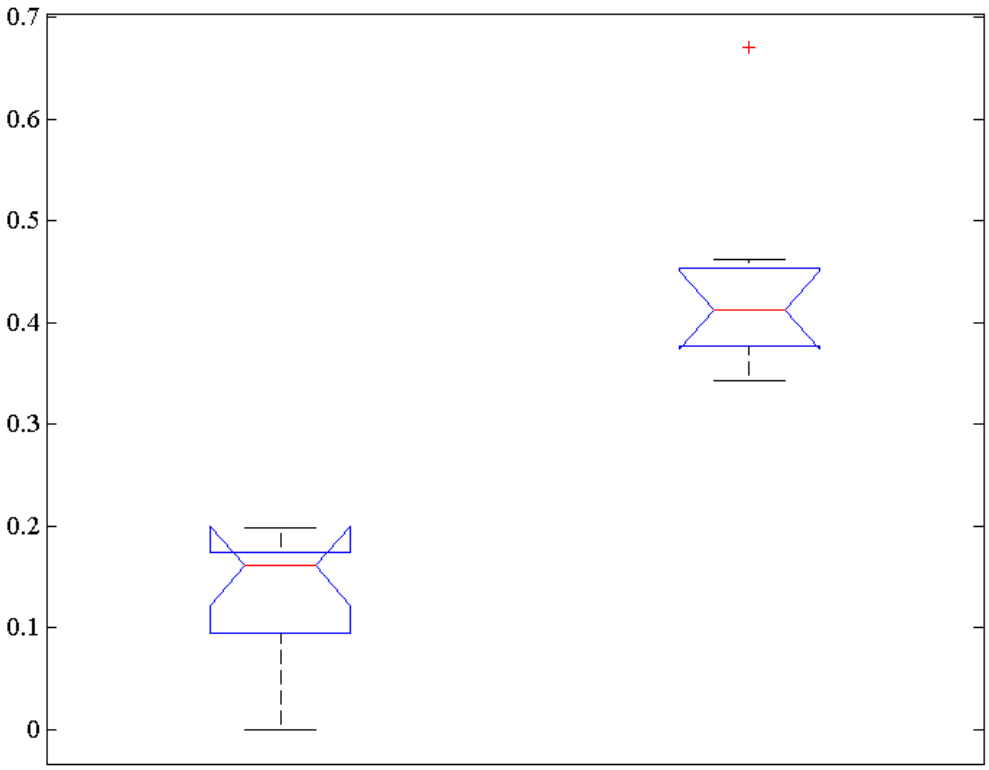


Slika 77. Dijagram *deformacija-naprezanje* poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon mjesec dana pohrane

Tablica 12. Rezultati ispitivanja poprečnih uzoraka odmrznutih nakon mjesec dana pohrane

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.389309	2.336904	1.596805
2	0.462453	3.094356	1.652723
3	0.376844	2.143973	1.413725
4	0.453836	3.806652	1.8748
5	0.375745	3.321355	1.423893
6	0.670583	4.270475	2.290123
7	0.343212	4.261923	2.129121
8	0.435372	4.858844	2.615614
9	0.37962	3.790229	1.613798
10	0.452818	3.97522	1.723965
M	0.433979	3.585993	1.833457
St. dev.	0.092729	0.865309	0.394724

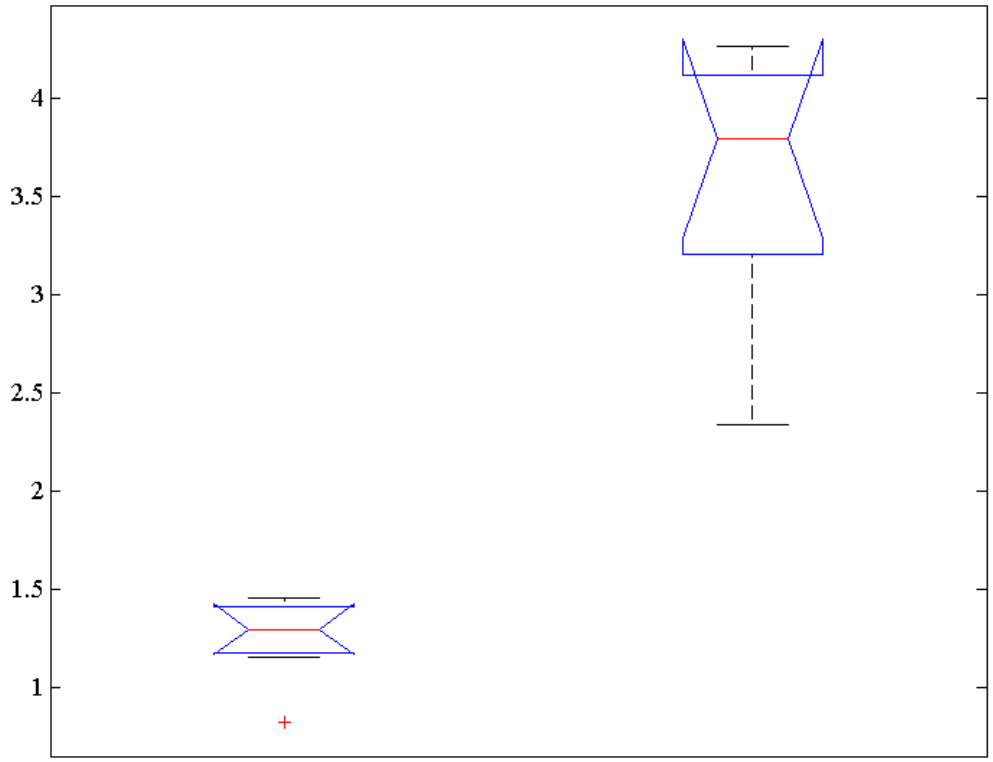
T-testom je utvrđeno kako je modul elastičnosti E_1 kod odmrznutih aorti (0,4339 MPa) veći od modula E_1 svježih aorti (0,1622 MPa), a razlika je statistički značajna (p = 6,7432e-07) (Slika 78.). Ovi rezultati potvrđeni su analizom varijance (p = 2,02454e-07) te Tuky testom [-0,3830, -0,2254].



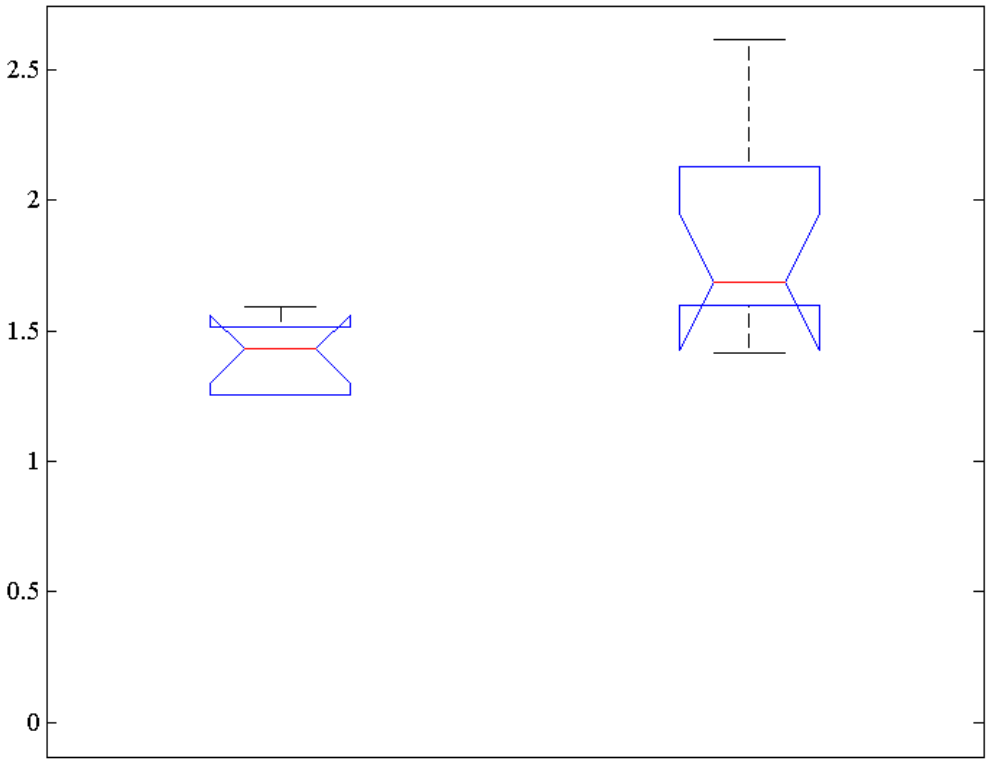
Slika 78. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno)

Modul elastičnosti E_2 odmrznutih aorti (3,5859 MPa) veći je od modula E_2 kod svježih uzoraka (1,2574 MPa) što je t-testom pokazano statistički značajnom razlikom (p = 1,5019e-06), također potvrđenom ANOVA-om (p = 1,4986e-07) (Slika 79.) te Tuky testom [-2,8733, -1,8260].

T-test pokazao je da je vlačna čvrstoća odmrznutih uzoraka (1,8335 MPa) statistički značajno (0,0159 MPa) veća od vlačne čvrstoće svježih uzoraka (1,4418 MPa) što je potvrđeno analizom varijance (p = 0,0088) (Slika 80.) te Tuky testom [-1,1666, -0,1935].

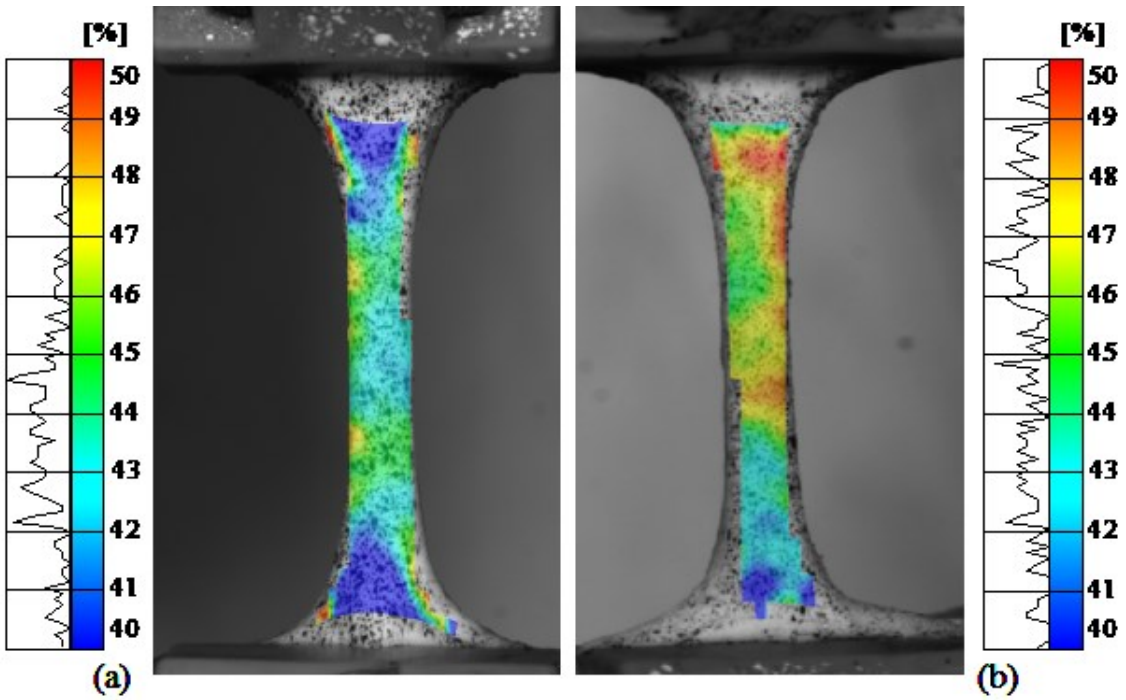


Slika 79. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno)



Slika 80. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane (desno)

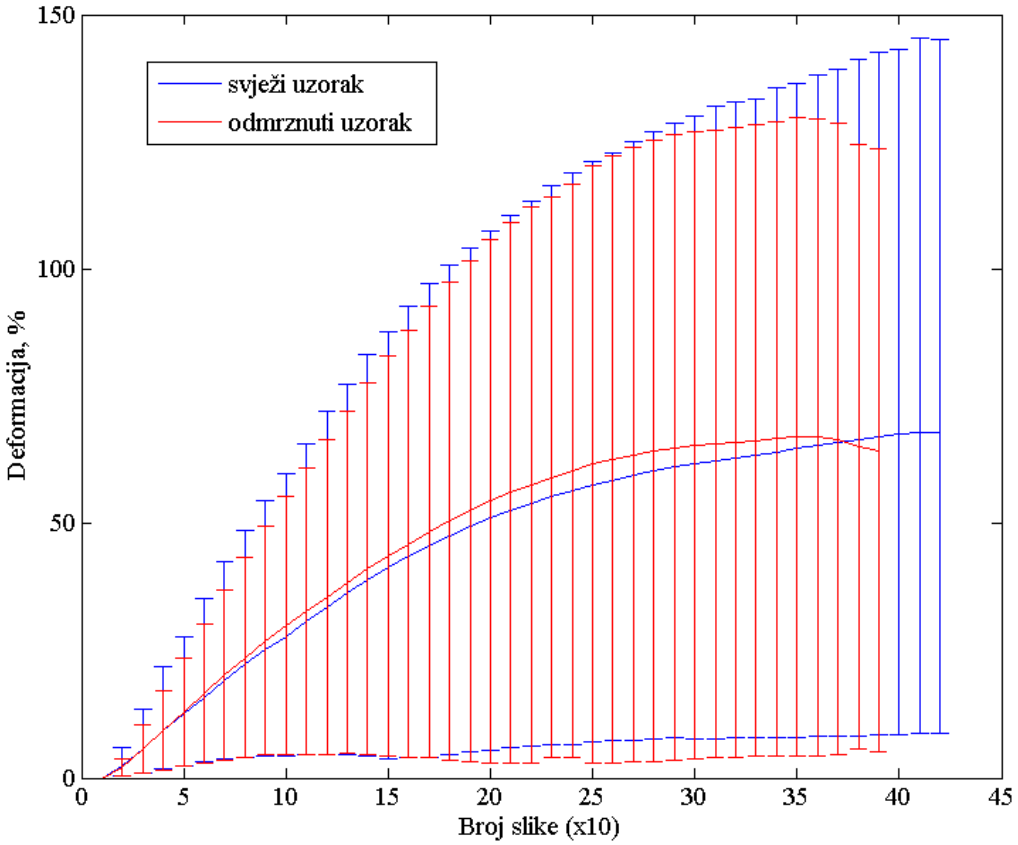
Rezultati korelacije digitalne slike (Slika 81.) dali su polje deformacija poprečnih uzoraka koje se, kao i kod uzdužnih uzoraka, ponaša izrazito heterogeno te ukazuje na anizotropnost mehaničkih svojstava tkiva aorte. Također, uočeni su porasti deformacija uz rub uzorka kao posljedica presijecanja pojedinih vlakana prilikom pripreme uzorka kalupom za izrezivanje odnosno kirurškim skalpelom.



Slika 81. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon mjesec dana (b)

Promatranjem kretanja polja deformacije (Slika 82.) tijekom eksperimentalnog ispitivanja može se uočiti nelinearnost ovog ponašanja kao što je već opisano kod uzdužnih uzoraka.

Prilikom statističke obrade neparemetarskom analizom varijance nije utvrđena statistički značajna razlika ($p = 0{,}4728$) polja deformacije svježih i uzoraka odmrznutih nakon mjesec dana pohrane. Unatoč tome, svježi uzorci i dalje iskazuju nešto veći raspon deformacija od odmrznutih uzoraka kao i veću maksimalnu deformaciju prije pucanja uzorka. Prosječna vrijednost polja pomaka nešto je veća kod odmrznutih uzoraka što je vidljivo i na slici Slika 82.

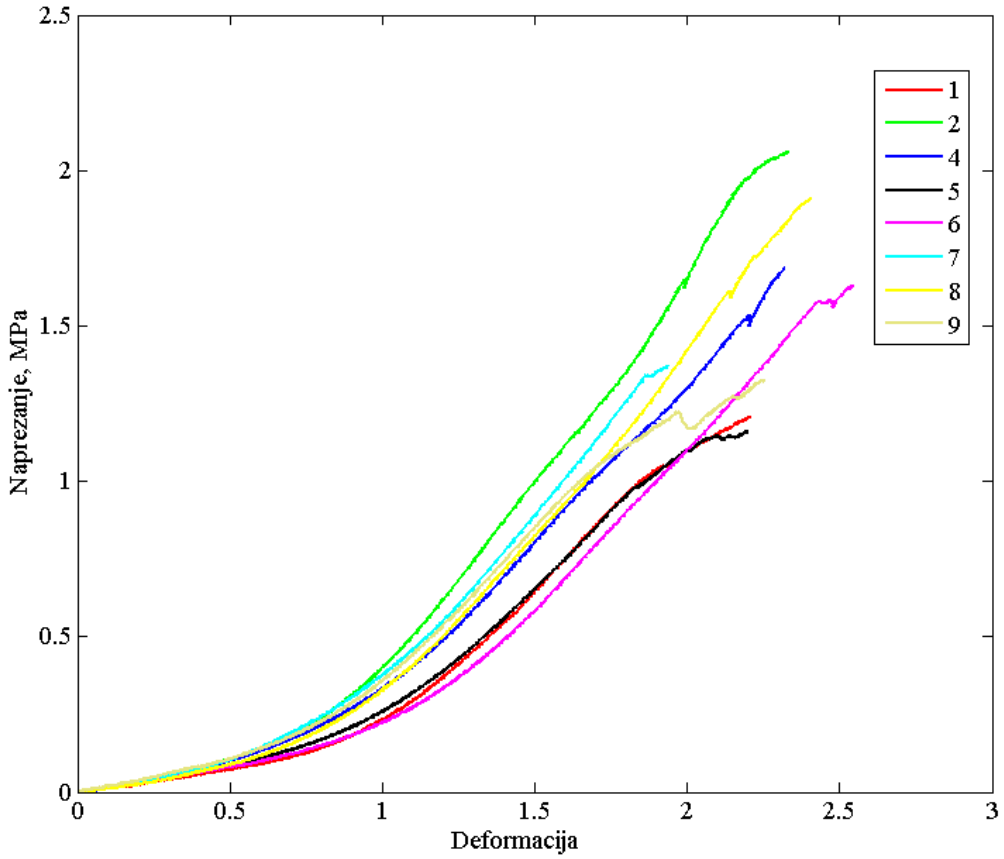


Slika 82. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i uzorke odmrznute nakon mjesec dana

➢ Četiri mjeseca pohrane

Kod ispitivanja svježih poprečnih uzoraka za pohranu od četiri mjeseca, dva uzorka (3 i 10) su oštećena prilikom izrezivanja kalupom iz ostatka tkiva te su uzorci pukli pri stavljanju u prihvat. Uzorak 2 namještao se u čeljusti kod deformacija iznad 1% te za ovaj uzorak nije određen modul elastičnosti E_2, dok je kod uzorka 8 došlo do pomicanja čeljusti pri malim deformacijama, pa za ovaj uzorak nije određen modul elastičnosti E_1. Unatoč proklizavanju kod uzoraka 2 i 8, svi testovi završili tu pucanjem uzorka te su dobivene vrijednosti vlačne čvrstoće za sve ispitane uzorke.

Slika 83. prikazuje eksperimentalno dobivene krivulje *deformacija-naprezanje* za svježe poprečne uzorke čiji su odgovarajući parovi pohranjeni na četiri mjeseca. I ovdje se da primjetiti veći iznos deformacije (> 2%) koji dostižu poprečni uzorci prije pucanja. Rezultati ovih uzoraka za module E_1 i E_2 te vlačnu čvrstoću R_m, dani su u Tablica 13. zajedno s prosječnim vrijednostima i standardnom devijacijom.



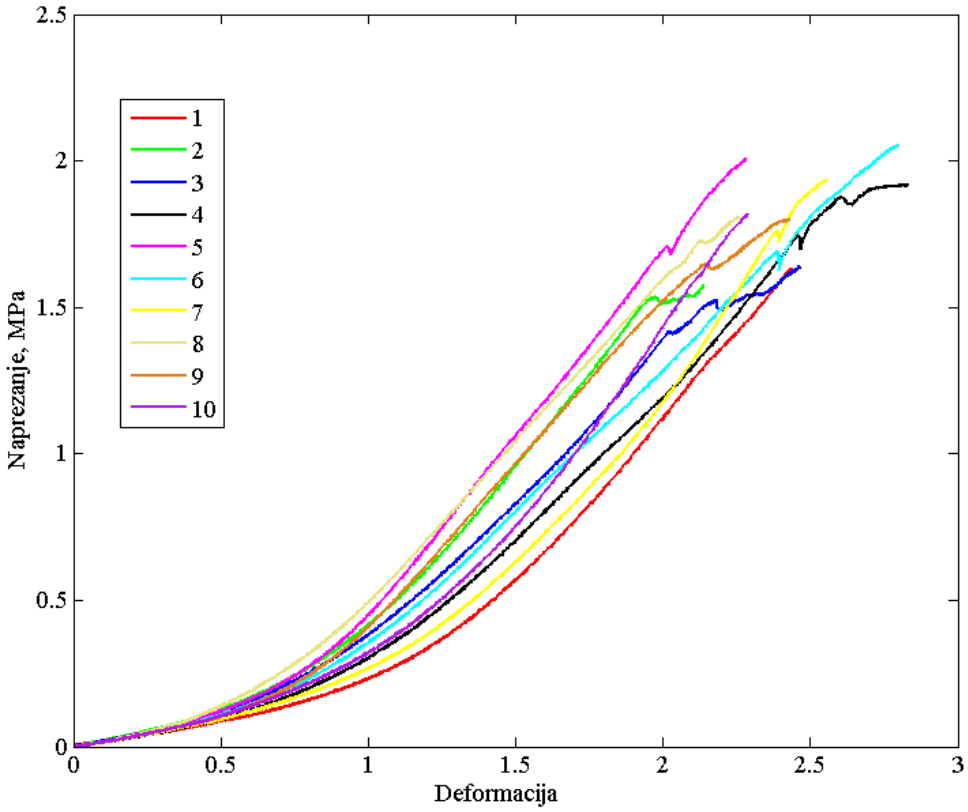
Slika 83. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od četiri mjeseca

Tablica 13. Rezultati ispitivanja svježih-poprečnih uzoraka aorte za pohranu od četiri mjeseca

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	0.147282	0.997687	1.208499
2	0.209051	-	2.059915
3	-	-	-
4	0.187688	1.054619	1.684632
5	0.185527	0.949793	1.158924
6	0.168148	1.056235	1.628399
7	0.180380	1.187554	1.373796
8	-	1.252535	1.90949
9	0.178641	1.038847	1.32585
10	-	-	-
M	0.179531	1.076753	1.543688
St. dev.	0.018908	0.106375	0.330380

Rezultati eksperimentalnih ispitivanja poprečnih uzoraka odmrznutih nakon četiri mjeseca pohrane dani su u obliku krivulja *deformacija-naprezanje* na Slika 84. dok su rezultati za module elastičnosti i vlačnu čvrstoću dani u Tablica 14.

Prilikom ispitivanja odmrznutih uzoraka došlo je do namještanja uzoraka 1 i 7 pri malim deformacijama te uzoraka 6 i 8 pri deformacijama iznad 1%. Uzorak 4 proklizavao je prilikom cijelog testa, no ipak je test završio pucanjem. Zbog navedenog, uzorcima 1, 4 i 7 nije određen modul E_1, dok za uzorke 4, 6 i 8 nije određen modul elastičnosti E_2. Svim uzorcima određena je vlačna čvrstoća.



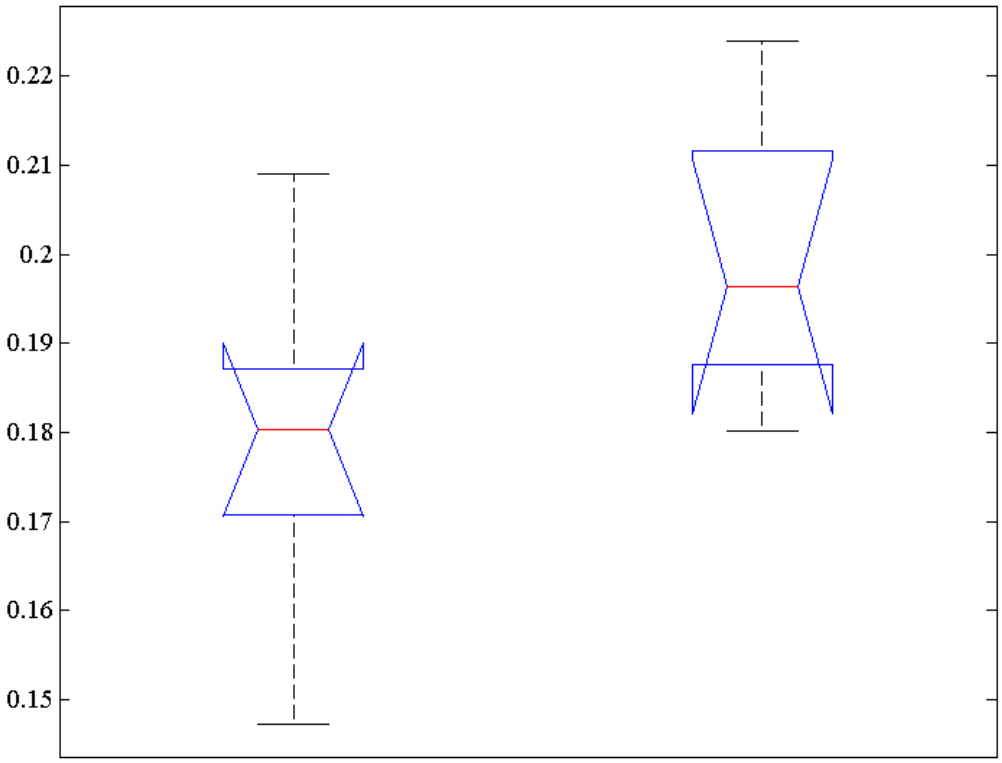
Slika 84. Dijagram *deformacija-naprezanje* poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon četiri mjeseca pohrane

Tablica 14. Rezultati ispitivanja poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon četiri mjeseca

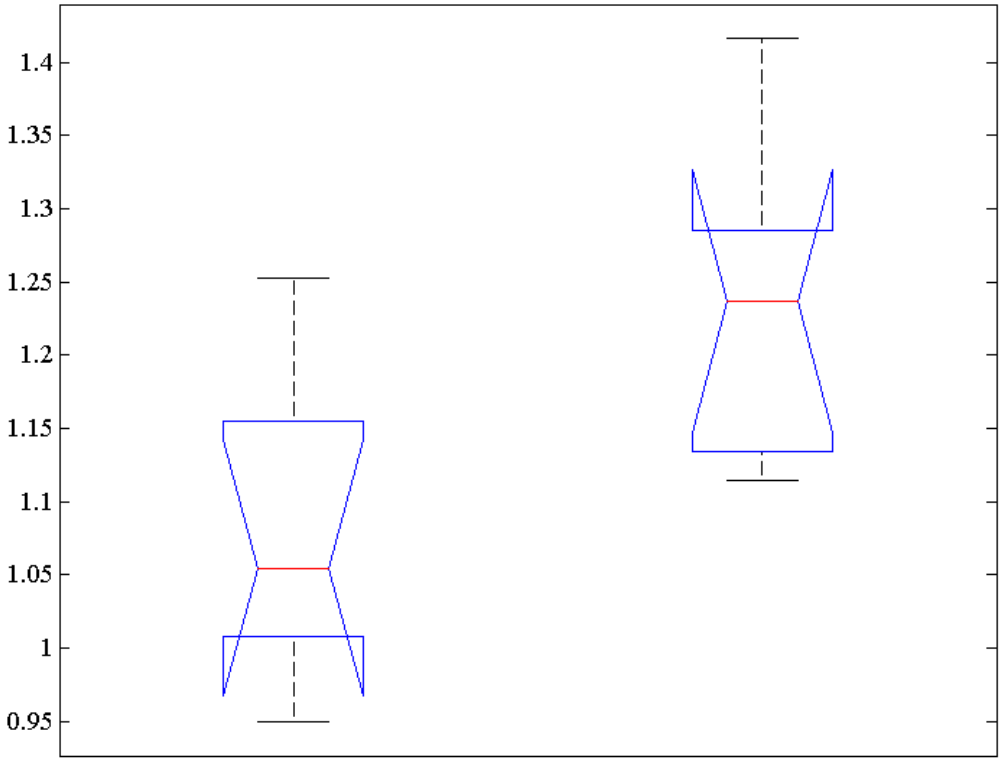
Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	-	1.158895	1.635198
2	0.223932	1.253558	1.577337
3	0.207492	1.125386	1.640156
4	-	-	1.921246
5	0.196346	1.236547	2.003895
6	0.213032	-	2.053541
7	-	1.295911	1.93449
8	0.191776	-	1.807153
9	0.186235	1.114157	1.798867
10	0.180172	1.416385	1.817068
M	0.199855	1.228691	1.818895
St. dev.	0.015611	0.107307	0.162517

Promatrajući rezultate modula elastičnosti E_1, t-testom dobivena je statistički značajna razlika (p = 0,0487) između modula E_1 odmrznutih uzoraka (0,1999 MPa) i svježih uzoraka (0,1795 MPa) (Slika 85.). Statistička značajnost potvrđena je analizom varijance (p = 0,0487) te Tuky testom [-0,0405, -0,0001]. Modul elastičnosti E_2 odmrznutih aorti (1,2287 MPa) nešto je veći od istog modula kod svježih uzoraka (1,0768 MPa). T-testom utvrđena je statistička signifikantnost ovih rezultatat (p = 0,0208) što je provjereno analizom varijance (p = 0,0208) (Slika 86.) te Tuky testom [-0,2764, -0,0275].

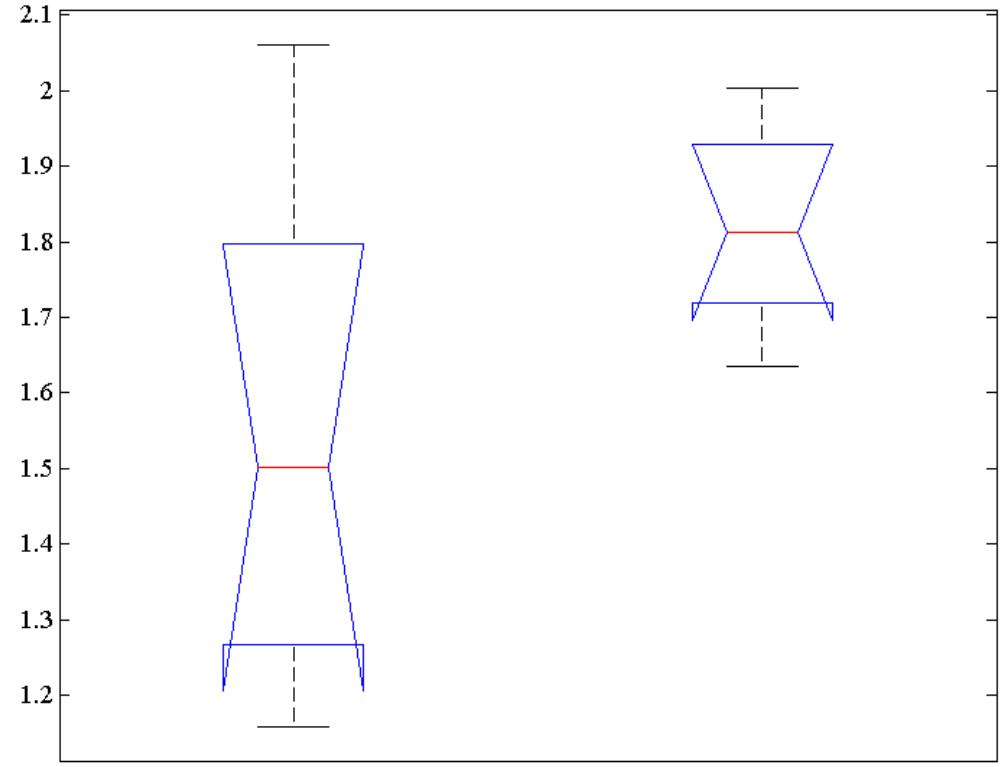
Vlačna čvrstoća odmrznutih uzoraka (1,8189 MPa) veća je od one kod svježih uzoraka (1,5437 MPa). Statistička signifikantnost ovih rezultata određena je t-testom (p = 0,0340), analizom varijance (p = 0,0458) (Slika 87.) te Tuky testom [-0,5462, -0,0059] dodatno je potvrđena statistička značajnost razlike rezultata vlačne čvrstoće.



Slika 85. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno)

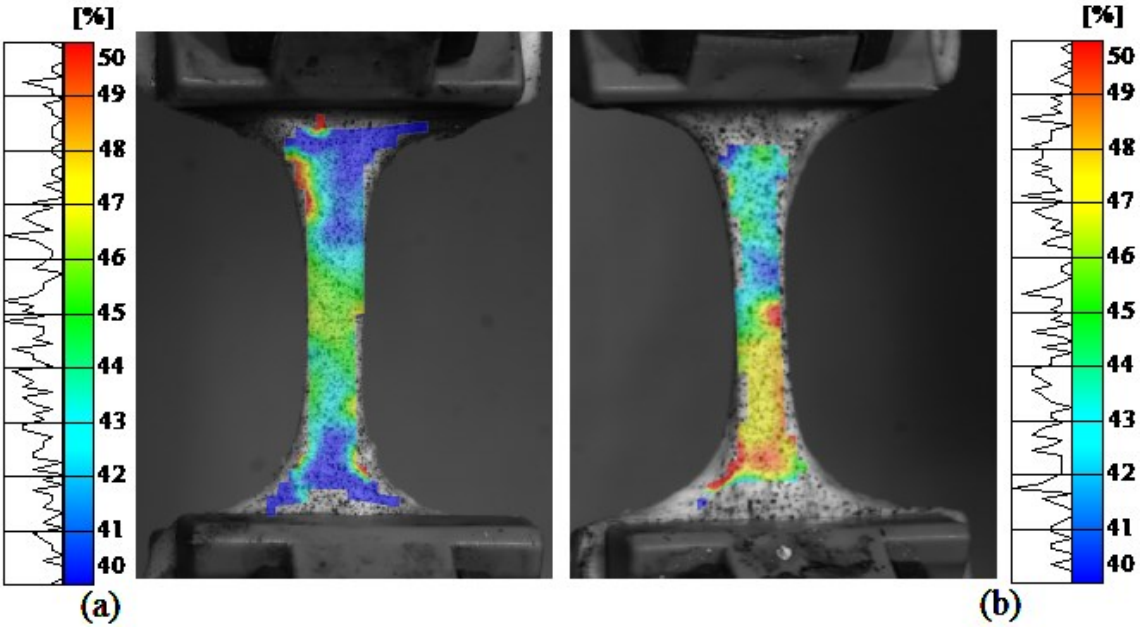


Slika 86. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno)



Slika 87. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane (desno)

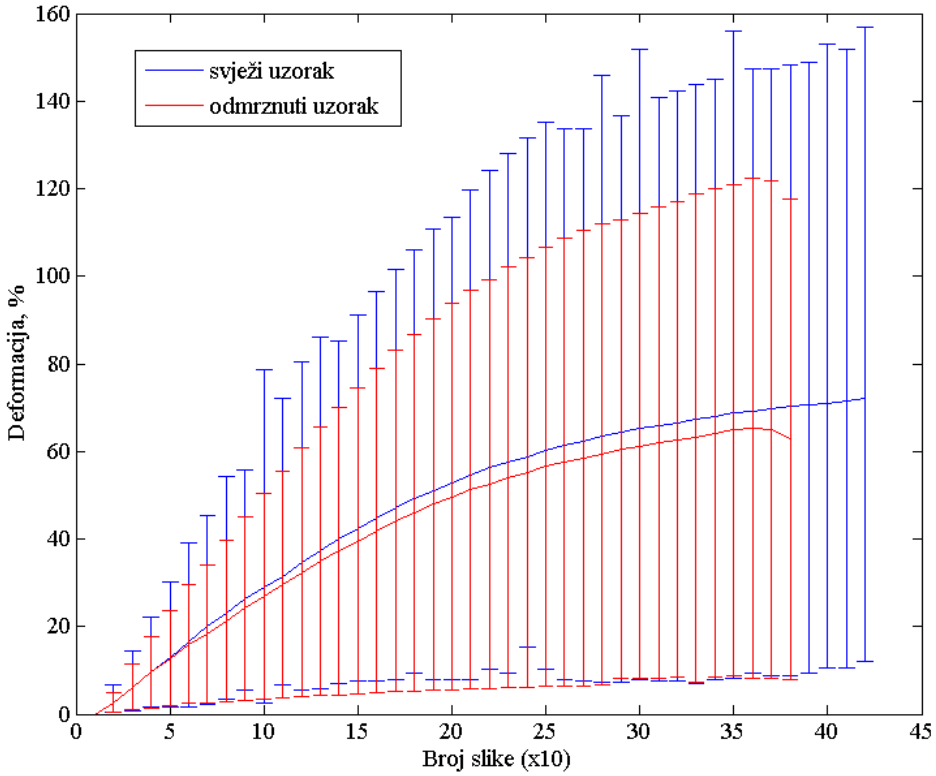
Rezultati korelacije digitalne slike i ovdje su dali polje pomaka odnosno deformacija uzorka koje je, kako je vidljivo na Slika 88., izrazito heterogeno te upućuje na anizotropno mehaničko ponašanje tkiva aorte u jednoosnom vlačnom testu.



Slika 88. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon četiri mjeseca (b)

Kao i kod ostalih uzoraka, kao posljedica obrade uzoraka na Slika 88. vidljiv je porast deformacije na rubovima uzoraka, kod svježeg uzorka blizu gornjeg i donjeg prihvata dok je kod odmrznutog uzorka uočen skok u deformaciji i u središnjem djelu na mjestu gdje je naknadno nastupilo pucanje uzorka.

Rezultati polja pomaka dani u obliku dijagrama na Slika 89. i ovdje ukazuju na nelinearni mehanički odziv tkiva aorte na narinuto vlačno opterećenje pri čemu svježi uzorci i ovdje poprimaju veći raspon vrijednosti deformacije od odmrznutih uzoraka.



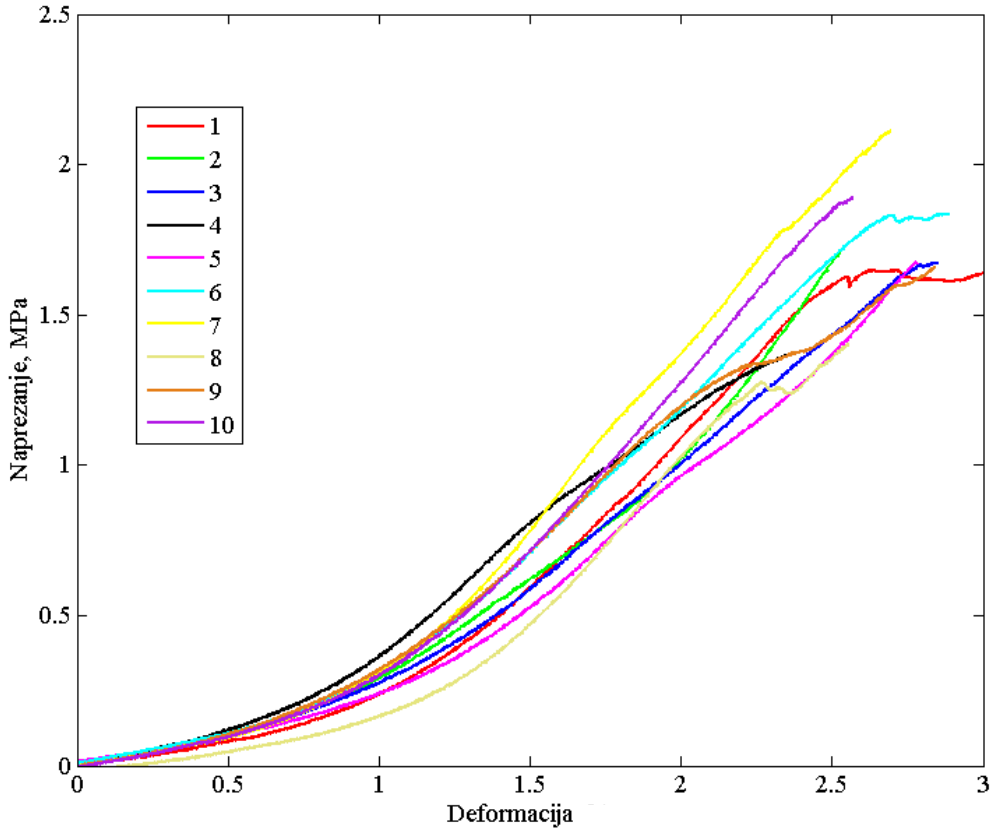
Slika 89. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane

Nakon četiri mjeseca pohrane, neparametarskom analizom varijance utvrđena je snažna statistička značajnost ($p = 7{,}6859e\text{-}06$) rezultata polja deformacija za svježe i odmrznute uzorke u poprečnom smjeru što ukazuje na promjene u mehaničkom odzivu uzoraka prije i nakon odmrzavanja.

➢ Devet mjeseci pohrane

Ispitivanje svježih uzoraka provedeno je s 10 vlačnih testova od kojih je 7 završilo pucanjem uzorka. Dva uzorka (1 i 8) namještali su se u prihvatu pri malim deformacijama te im nije određen modul elastičnosti E_1. Pri većim deformacijama došlo je do namještanja uzoraka 4 i 9 te za njih nije uspješno određen modul E_2. Uzorci 6, 7 i 10 izvukli su se prije kraja testa te za njih nije određena vlačna čvrstoća.

Rezultati eksperimentalnog ispitivanja svježih uzoraka čiji su odgovarajući parovi pohranjeni na devet mjeseci prikazani su na Slika 90. u obliku dijagrama *deformacija-naprezanje*. U ovoj skupini svi uzorci su prilikom ispitivanja postigli deformacije veće od 2% što je znatno više negoli za uzdužne uzorke od kojih je samo nekoliko imalo slične vrijednosti deformacije prije pucanja.



Slika 90. Dijagram *deformacija-naprezanje* svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od devet mjeseci

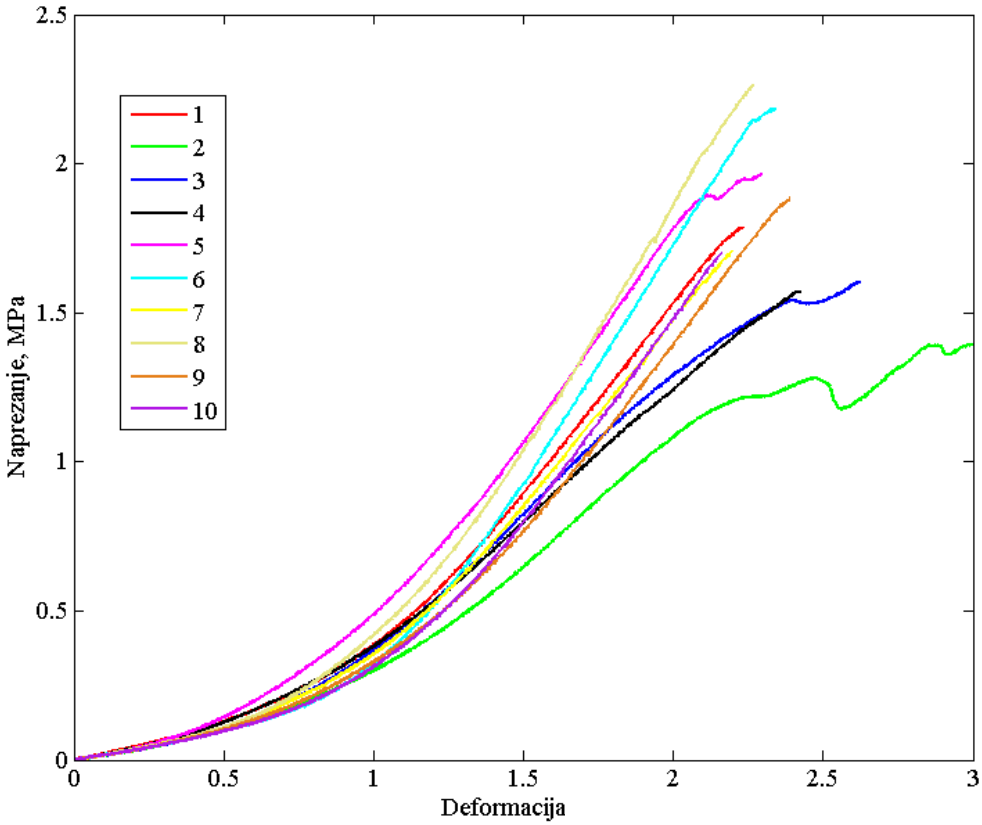
Iz provedenih ispitivanja određene su vrijednosti modula elastičnosti E_1 i E_2 te vlačne čvrstoće R_m koje su zajedno s prosječnim vrijednostima i standardnom devijacijom dane u Tablica 15.

Tablica 15. Rezultati ispitivanja svježih poprečnih uzoraka aorte za pohranu od devet mjeseci

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	-	1.035633	1.65949
2	0.199918	1.048285	1.705737
3	0.196898	0.844415	1.675992
4	0.256210	-	1.370184
5	0.181958	0.822808	1.675992
6	0.193118	0.981874	-
7	0.208476	1.148662	-
8	-	1.117241	1.401629
9	0.230441	-	1.656161
10	0.219818	1.116515	-
M	0.210855	1.014429	1.592169
St. dev.	0.023877	0.123802	0.142103

Ukupno je ispitano 10 odmrznutih poprečnih uzoraka. Pri malim deformacijama uzorci 1 i 5 su proklizavali i namještali se u prihvatu te za njih nije određen modul E_1. Pri velikim deformacijama (iznad 1%) proklizavali su uzorci 2 i 4, a uzorci 2, 3 i 4 nisu završili pucanjem tkiva već su se prije toga izvukli iz prihvata.

Slika 91. prikazuje vezu *deformacija-naprezanje* za poprečne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane dobivene jednoosnim statičkim vlačnim testom. Rezultati modula elastičnosti i vlačne čvrstoće dani su u Tablica 16. te su zajedno s rezultatima svježih uzoraka podvrgnuti statističkoj analizi kako bi se utvrdila signifikantnost razlike ovih rezultata.

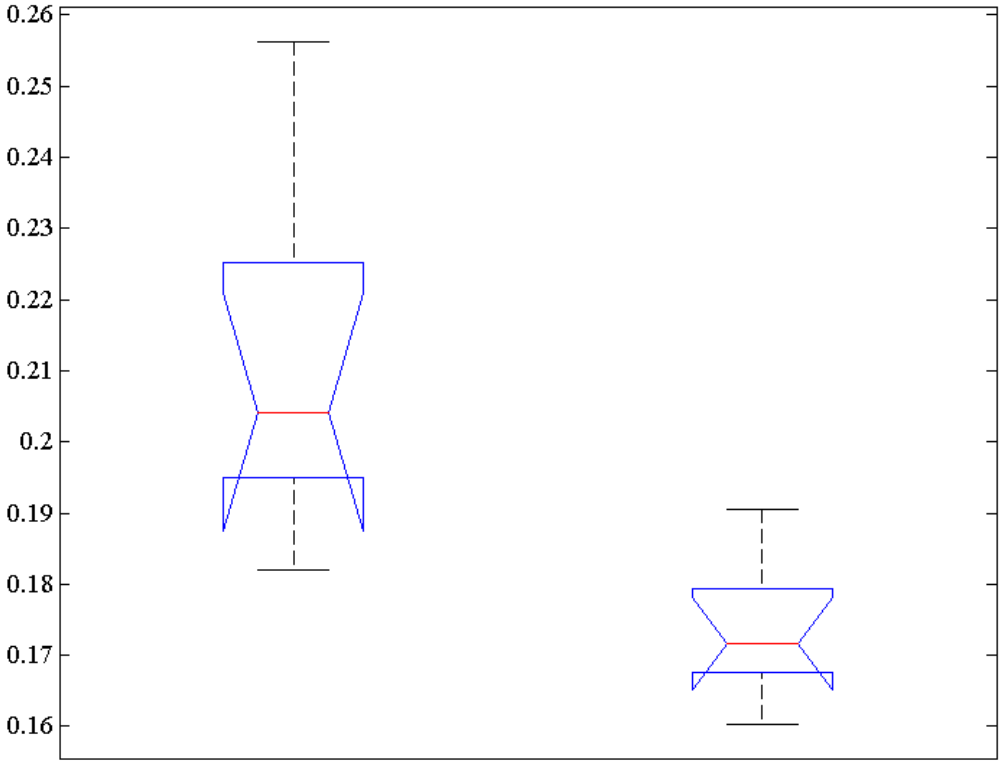


Slika 91. Dijagram *deformacija-naprezanje* poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon devet mjeseci pohrane

Tablica 16. Rezultati ispitivanja poprečnih uzoraka aorte odmrznutih nakon devet mjeseci

Uzorak	E_1 (MPa)	E_2 (MPa)	R_m (MPa)
1	-	1.250516	1.785765
2	0.160324	-	-
3	0.173068	0.90627	-
4	0.19045	-	-
5	-	1.439158	1.966006
6	0.183605	1.586251	2.187606
7	0.170137	1.235182	1.708074
8	0.175138	1.645139	2.265297
9	0.168868	1.284391	1.883357
10	0.166503	1.371405	1.701487
M	0.173512	1.339789	1.928227
St. dev.	0.009618	0.231386	0.225281

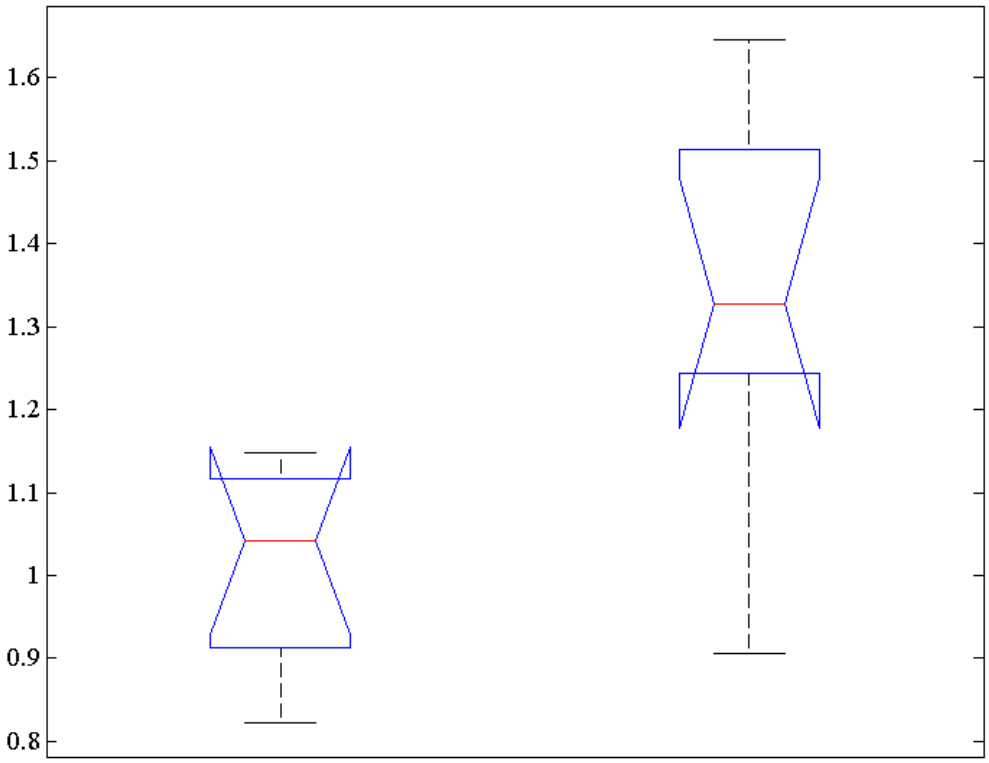
Modul elastičnosti E_1 odmrznutih aorti (0,1735 MPa) nešto je manji nego kod svježih uzoraka (0,2109 MPa). T-testom (p = 0,0011), analizom varijance (p = 0,0011) i Tukey testom [0,0178, 0,0569] potvrđena je statistička značajnost te razlike (Slika 92.).



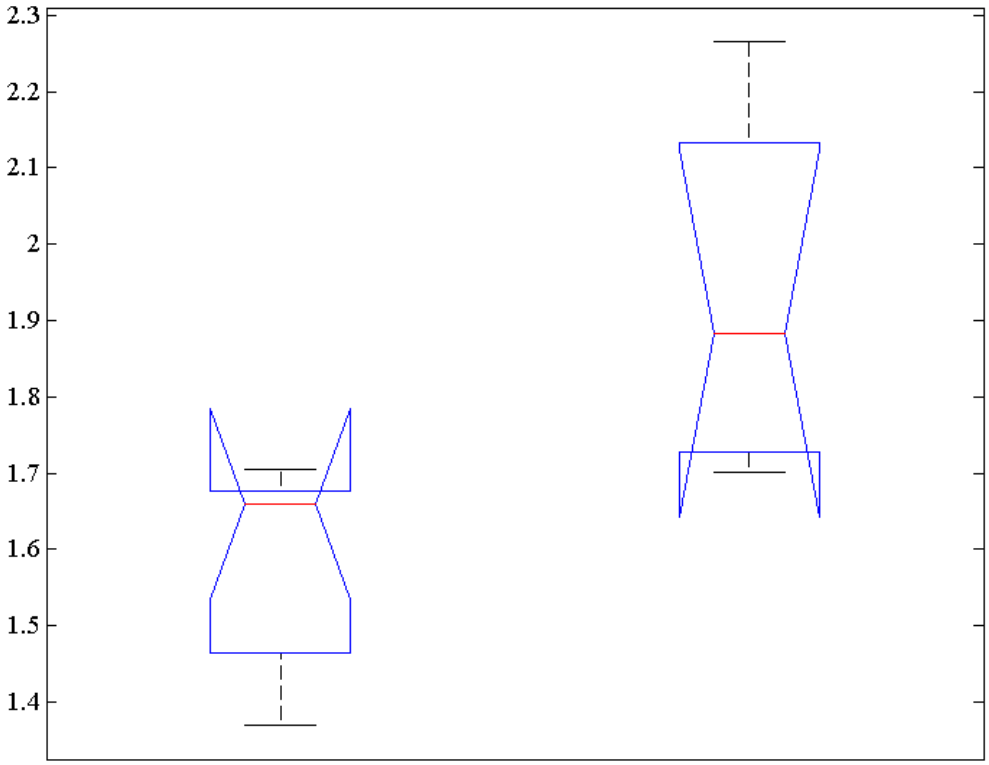
Slika 92. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_1 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno)

Za razliku od modula E_1, modul elastičnosti E_2 odmrznutih žila (1,3398 MPa) veći je nego kod svježih uzoraka (1,0144 MPa). T-testom dobivena je statistička signifikantnost ovih rezultata (p = 0,0035), potvrđena analizom varijance (p = 0,0035) te Tuky testom [-0,5244, -0,1264] (Slika 93.).

Vlačna čvrstoća odmrznutih uzoraka aorte (1,9282 MPa) veća je nego kod svježih uzoraka (1,5922 MPa). T-test dao je statističku signifikantnost rezultata (p = 0,0059) koju je potvrdila analiza varijance (p = 0,0059) te Tuky test [-0,5554, -0,1167] (Slika 94.).

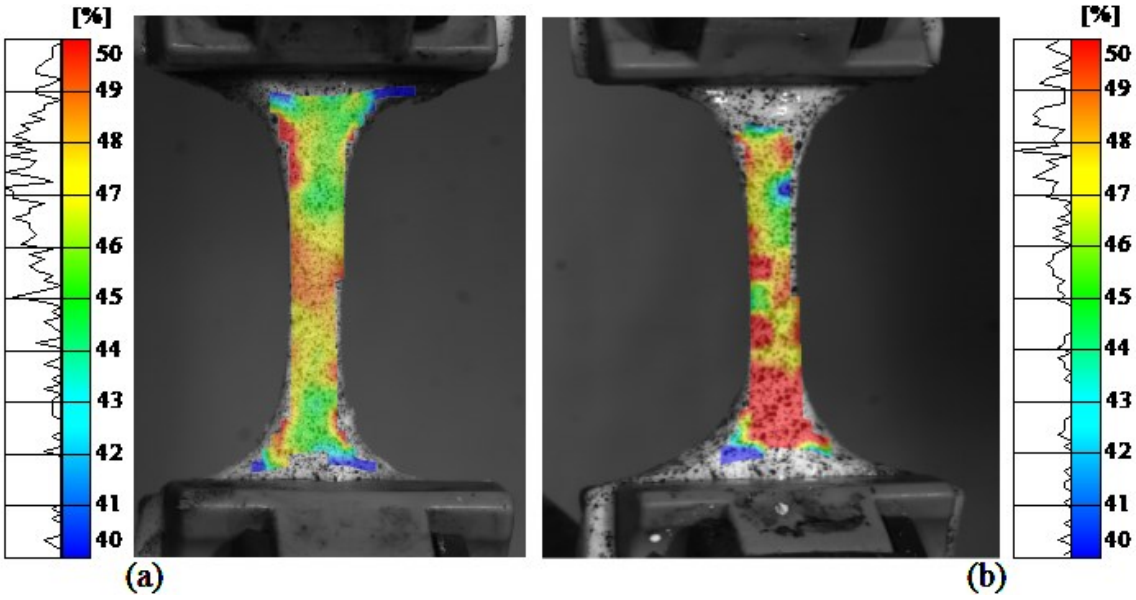


Slika 93. Rezultati analize varijance modula elastičnosti E_2 za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno)



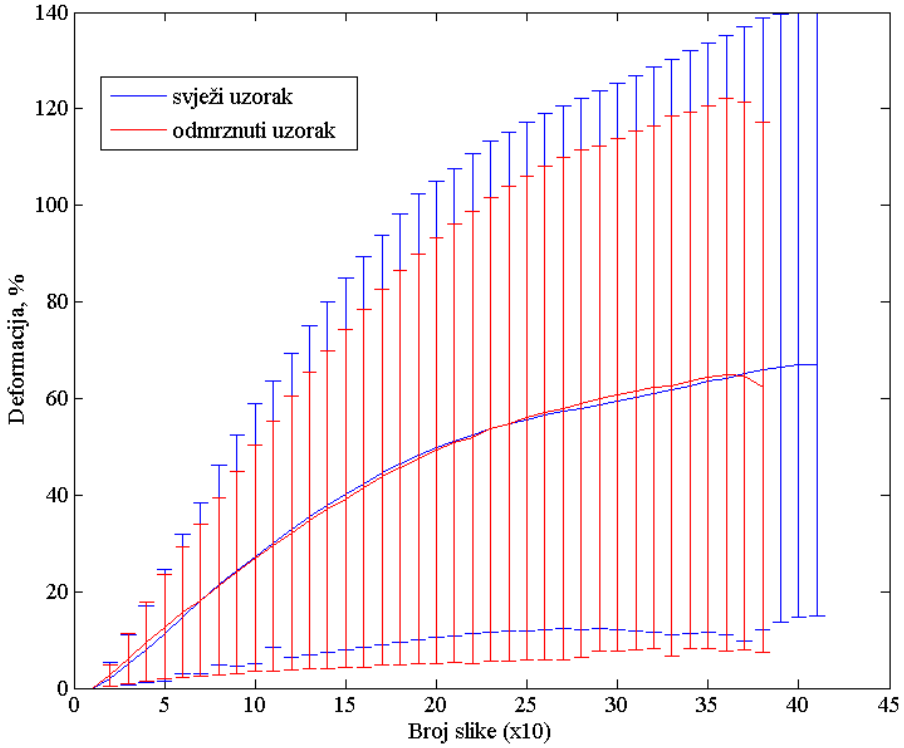
Slika 94. Rezultati analize varijance vlačne čvrstoće R_m za poprečne svježe (lijevo) i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane (desno)

Na Slika 95. prikazani su rezultati eksperimentalnog ispitivanja prikupljeni ARAMIS mjernim sustavom odnosno metodom korelacije digitalne slike za jedan svježi i jedan uzorak odmrznut nakon devet mjeseci pohrane. Rezultati ukazuju na heterogenost polja deformacije prilikom jednoosnog statičkog vlačnog testa što je jasan znak anizotropnosti mehaničkih svojstava tkiva aorte. Veće deformacije pojavljuju se na rubovima uzoraka kao posljedica prekinutih vlakana, a na Slika 95. mogu se vidjeti ti djelovi obojani crvenom bojom koja označava područja u kojima deformacija prelazi 50% prema von Misesu.



Slika 95. Rezultati korelacije digitalne slike za ispitivanje svježeg (a) i uzorka odmrznutog nakon devet mjeseci (b)

Promjena vrijednosti deformacije u svakoj slici tijekom eksperimentalnog ispitivanja uzoraka aorte dana je u obliku dijagrama na Slika 96. Iz dijagrama je vidljiva nelinearnost promjene deformacije dobivene metodom korelacije digitalne slike tijekom statičkog vlačnog testa za svježe i uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane. Na istom dijagramu uočljivo je kako su svježi uzorci dostigli veću konačnu deformaciju, prije pucanja, što potvrđuju i rezultati eksperimentalnih ispitivanja dobiveni s upravljačke jedinice kidalice, a prikazani dijagramima na slikama Slika 90. i Slika 91.



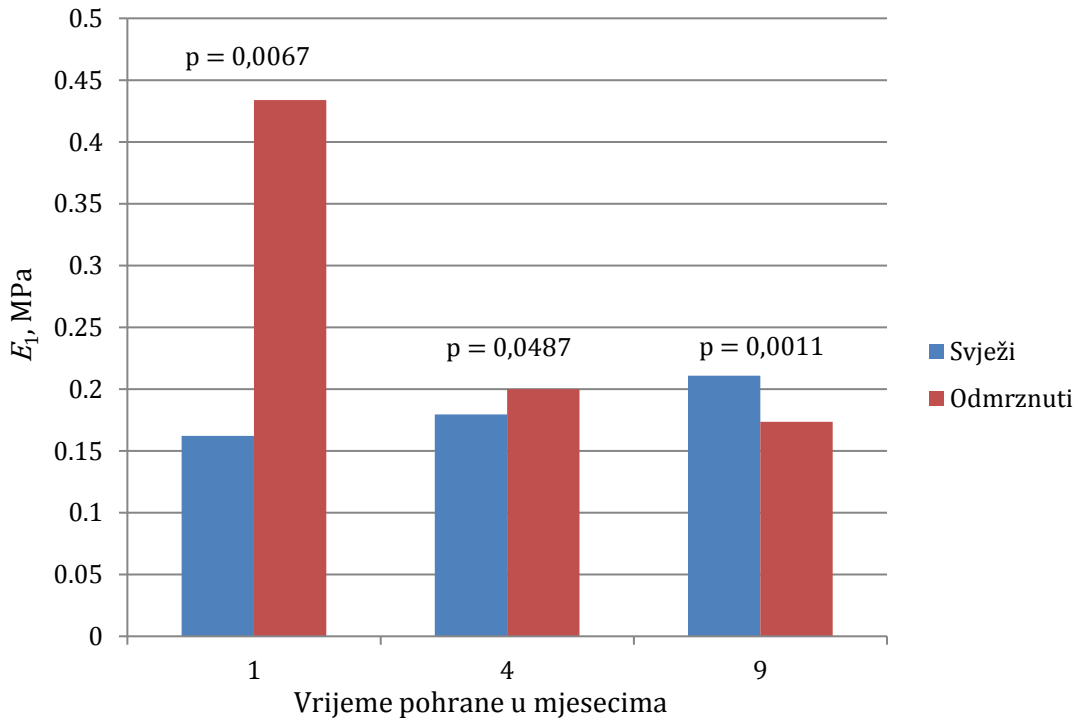
Slika 96. Vrijednosti polja deformacije dobivene DIC metodom za svježe i odmrznute uzorke

Statističkom obradom rezultata polja pomaka nije utvrđena statistički signifikantna razlika ($p = 0.2090$) u vrijednosti polja pomaka svježih i odmrznutih uzoraka aorte u poprečnom smjeru. Unatoč tome, jasan trend većeg raspona deformacija koje poprimaju svježi uzorci vidljiv je i kod ove skupine uzoraka (Slika 96.).

➢ Rasprava

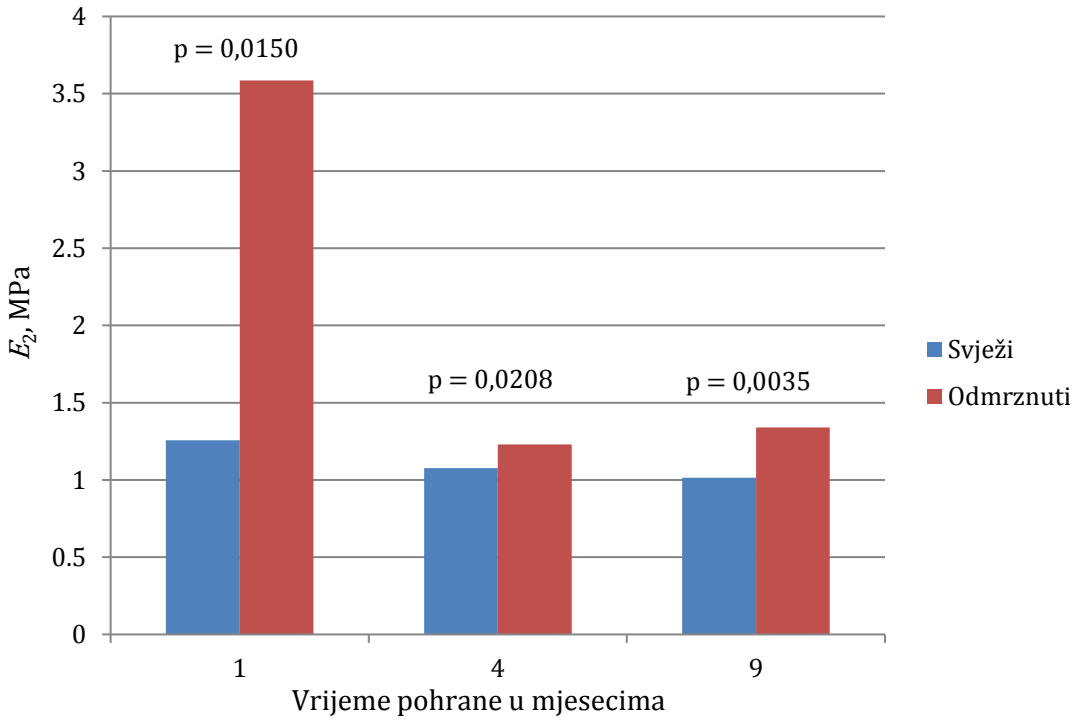
U eksperimentalnom ispitivanju uzdužnih uzoraka aorte uočen je porast krutosti odnosno modula elastičnosti pri malim (E_1) i velikim deformacijama (E_2) kao i porast vlačne čvrstoće (R_m) nakon odmrzavanja uzoraka. Optičkim mjernim sustavom dobiveno je polje deformacija na površini uzorka tijekom jednoosnog vlačnog testa.

Na Slika 97. prikazani su rezultati modula elastičnosti (E_1) u početnom linearnom djelu mehaničkog odziva tkiva aorte. Za svaku skupinu uzoraka dana je p vrijednost koja u slučaju $p < 0{,}05$ ukazuje na statistički značajnu razliku između rezultata svježih i odmrznutih uzoraka. Rezultati pokazuju kako kod poprečnih uzoraka krutost raste nakon odmrzavanja pri čemu je ovaj efekt najizraženiji nakon prvog mjeseca pohrane kada je modul elastičnosti E_1 više od dvostruko veći od onoga kod svježih uzoraka. Nakon četiri mjeseca pohrane krutost je još uvijek nešto veća kod odmrznutih uzoraka, za otprilike 11%, a nakon devet mjeseci pohrane eksperimentalni rezultati otkrivaju kako je modul elastičnosti nakon odmrzavanja pao za oko 18%.



Slika 97. Vrijednosti modula elastičnosti E_1 u poprečnom smjeru aorte za sve skupine uzoraka

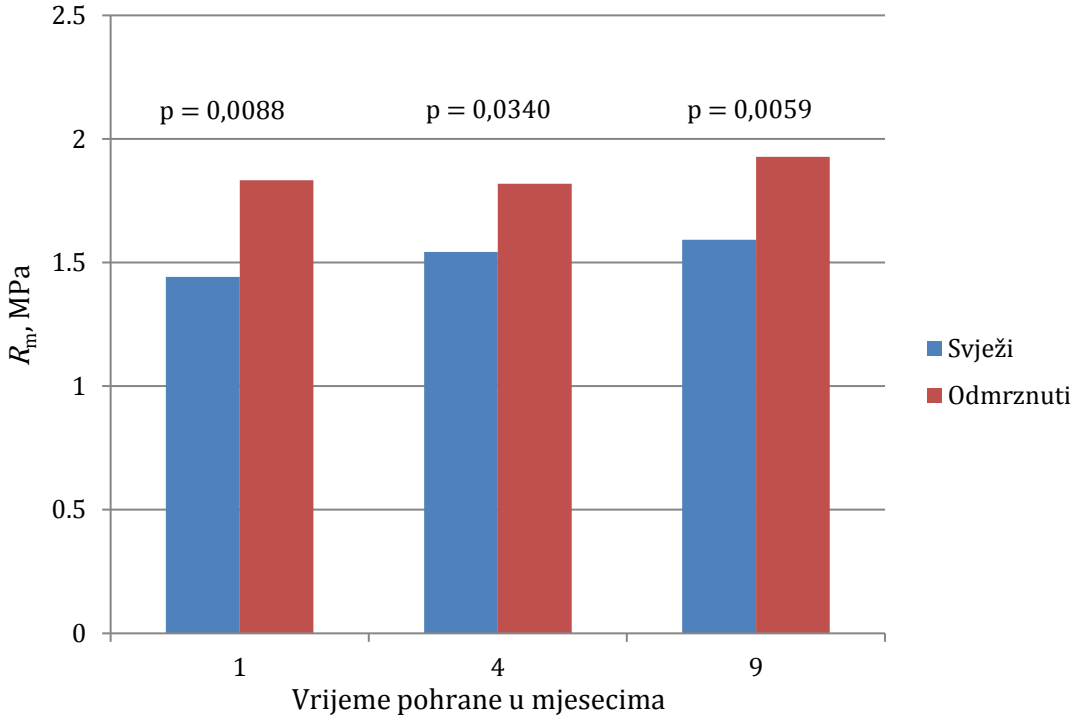
Kod odmrznutih poprečnih uzoraka uočen je porast modula elastičnosti pri velikim deformacijama (E_2). Slika 98. prikazuje rezultate modula elastičnosti E_2 dobivene jednoosnim vlačnim testom na poprečnim uzorcima aorte. Slično kao i kod modula E_1, najveći porast krutosti uočen je nakon mjesec dana pohrane, za gotovo tri puta. Nakon četiri mjeseca pohrane eksperimentima je potvrđen ovaj porast krutosti nakon odrzavanja, iako svega nešto manji od 13%. Porast krutosti izraženiji je nakon devet mjeseci pri čemu je modul E_2 kod odmrznutih uzoraka veći za gotovo 25%. Provedbom statističkih testova utvrđena je značajnost ovih rezultata, a na Slika 98. dana je p vrijednost za sve skupine uzoraka iz koje je vidljivo kako je opisani porast krutosti u poprečnom smjeru statistički značajan ($p < 0,05$).



Slika 98. Vrijednosti modula elastičnosti E_2 za poprečni smjer aorte za sve skupine uzoraka

Razlika u mehaničkom odzivu tkiva aorte u dva okomita smjera nakon odmrzavanja uočena je u rezultatima vlačne čvrstoće R_m. Naime, uzorci u poprečnom smjeru pucali su nakon odmrzavanja pri višim silama od onih kod svježih uzoraka, dok je suprotno tome kod uzdužnih uzoraka uočen pad vlačne čvrstoće nakon pohrane. Rezultati vlačne čvrstoće u poprečnom smjeru aorte dani su na Slika 99. gdje su za svaku skupinu prikazane i p vrijednosti kojima je određena statistička značajnost rezultata. Nakon mjesec dana zamrzavanja vlačna čvrstoća porasla je za 27% dok se, slično modulima

elastičnosti, ova razlika nešto smanjila nakon četiri mjeseca kada su uzorci pucali pri gotovo 18% većem naprezanju. Uzorci odmrznuti nakon devet mjeseci pohrane pucali su pri naprezanjima većima za 21% od onih kod svježih uzoraka.



Slika 99. Vrijednosti vlačne čvrstoće R_m za poprečni smjer aorte za sve skupine uzoraka

Snimanjem jednoosnog vlačnog testa optičkim sustavom ARAMIS potvrđeno je kako se metodom korelacije digitalne slike može dobiti polje deformacije na površini poprečnih uzoraka aorte. Promjena polja deformacije tijekom jednoosnog vlačnog testa ukazuje na nelinearni mehanički odziv tkiva aorte.

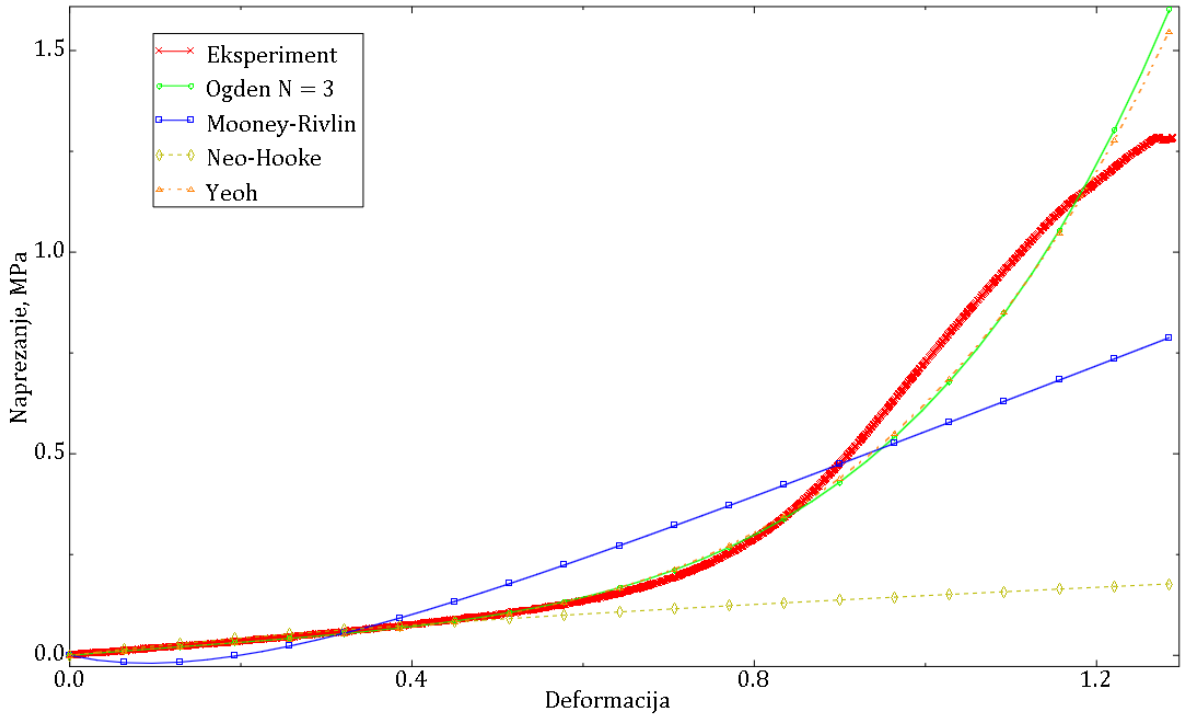
Iz rezultata prikazanih u ovom poglavlju uočljiva je anizotropnost mehaničkih svojstava tkiva aorte vidljiva na vrijednostima polja deformacije u određenoj slici. Kako se ovom metodom može zapisati iznimno heterogeno polje deformacije, u budućim istraživanjima može se koristiti kao ulazni podatak prilikom numeričkih modeliranja. Također, ARAMIS sustav dopušta i pohranu geometrije aorte u *stl formatu pogodnom za FEM programske pakete poput Abaqusa te se na ovaj način može napraviti rekonstrukcija geometrije tkiva uzorka u tri dimenzije. Ovo je svakako prednost pred upotrebom klasičnih izotropnih materijalnih modela korištenih u literaturi.

7.2. Identifikacija parametara materijalnih modela

Numerički modeli koji se koriste za opisivanje mehaničkog ponašanja aorte opisani su u poglavlju 4. U ovom poglavlju dani su parametri koji opisuju ove modele, dobiveni iz eksperimentalnih rezultata predstavljenih u obliku inženjerske deformacije i inženjerskog naprezanja na idućim slikama označenih samo kao deformacija i naprezanje.

7.2.1. Uzdužni uzorci

Slika 100. prikazuje konstitutivne modele opisane u poglavlju 4 pridružene eksperimentalnim rezultatima za svježe uzorke aorti u uzdužnom smjeru.



Slika 100. Konstitutivni modeli za svježe uzdužne uzorke aorte

Ovdje su Neo-Hooke (R = 0,8570) i Mooney-Rivlin (R = 0,9429) modeli pokazali lošiju korelaciju s eksperimentalnim rezultatima i nisu uspjeli zadovoljiti Druckerov kriterij stabilnosti. Ogden (R = 0,9872) i Yeoh (R = 0,9900) model iskazali su sličnu i veom

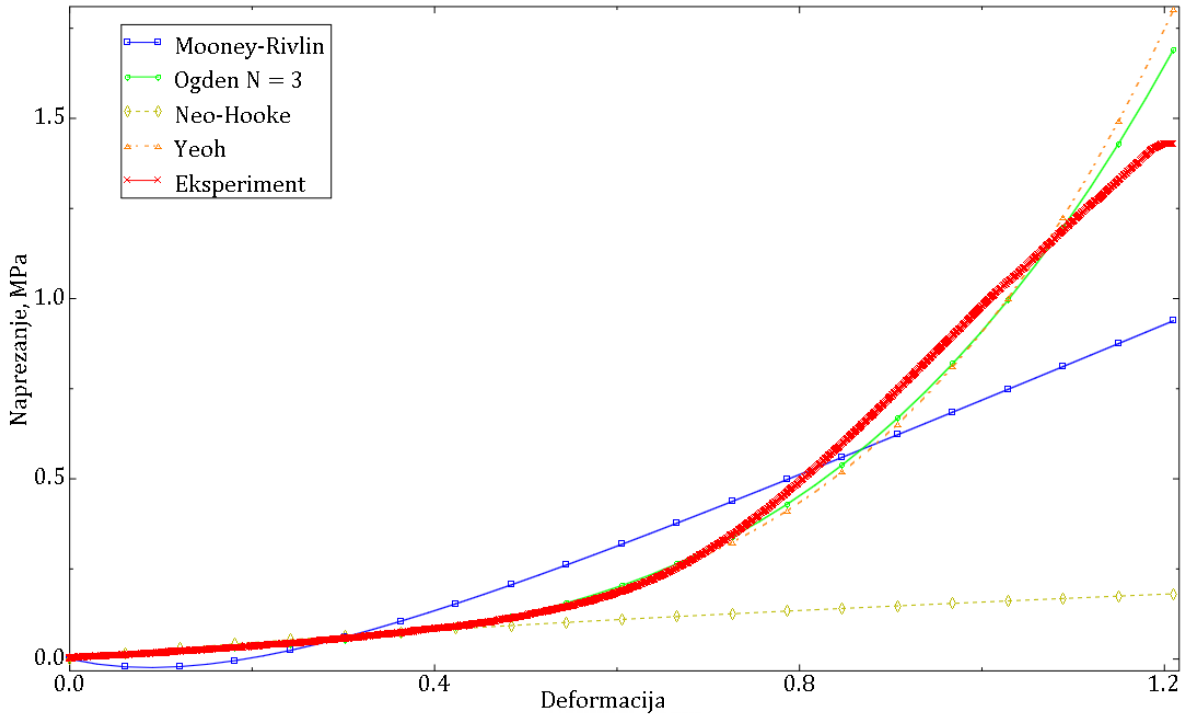
dobru korelaciju pri čemu je Yeoh model jedini uspio zadovoljiti kriterij stabilnosti za sve uzorke. Srednje vrijednosti (M) te standardna devijacija koeficijenata ovih modela dani su u Tablica 17.

Tablica 17. Koeficijenti materijalnih modela za uzdužne svježe uzorke aorte

	n-Hooke	Mooney-Rivlin		Yeoh		
	C_{10}	C_{10}	C_{01}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
M	0.044414	0.578237	-0.68303	0.0281399	0.0287161	0.01344512
S.D.	0.010168	0.149029	0.174746	0.0078711	0.0176523	0.01029614
Ogden						
	μ_1	μ_2	μ_3	α_1	α_2	α_3
M	-24.23114	12.153883	12.139260	2.446206	4.141811	1.958232
S.D.	25.448609	12.547796	12.921439	3.294433	1.469739	3.372299

Sličan trend uočen je i kod ostalih rezultata. Naime, Neo-Hookeov (R = 0,8593) i Mooney-Rivlinov model ne mogu dobro opisati mehaničko ponašanje u velikom rasponu deformacija pri čemu Mooney-Rivlin model (R = 0,9612) ne ispunjava kriterij stabilnosti, dok je Neo-Hookeov model dobar pri opisu ponašanja u prvom linearnom dijelu mehaničkog odziva.

Rezultati za uzdužne uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane ukazuju kako Ogdenov model (R = 0,9944) nešto slabije ispunjava kriterij stabilnosti od Yeoh modela (R = 0,9902) iako podjednako dobro koreliraju s rezultatima eksperimenta (Slika 101.) pri čemu je Yeoh model stabilan za sve ispitane uzorke. Koeficijenti ovih modela dani su u Tablica 18.

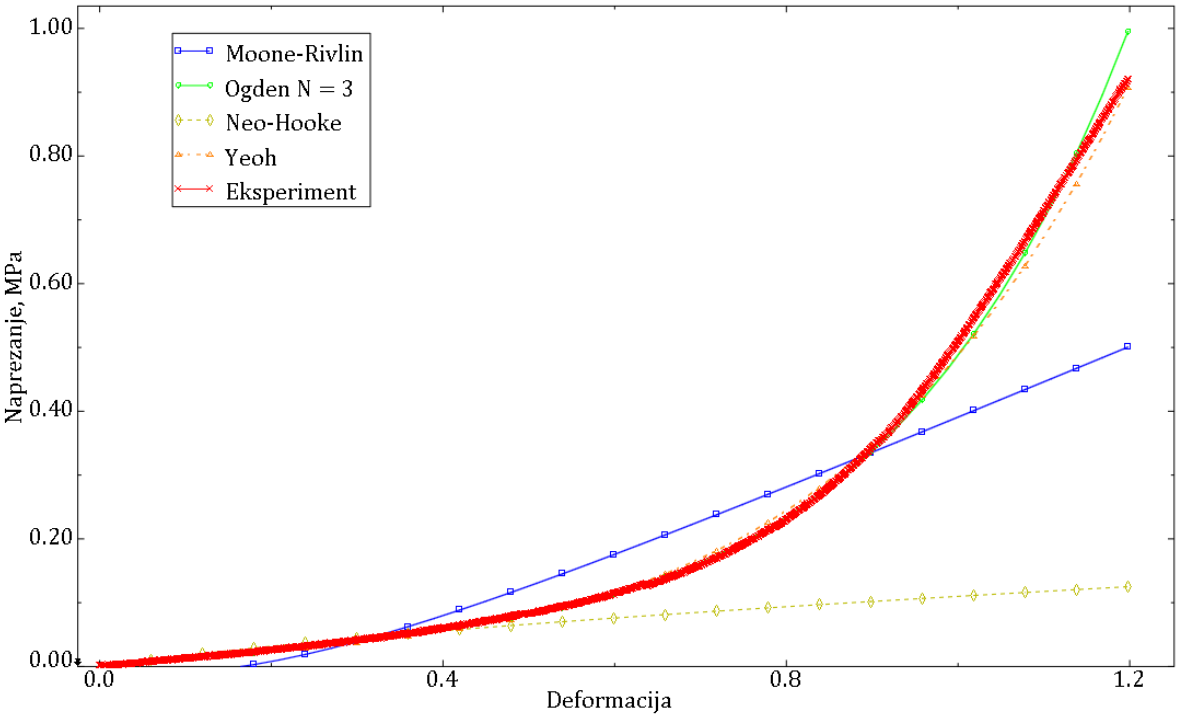


Slika 101. Konstitutivni modeli za uzdužne uzorke odmrznute nakon mjesec dana pohrane

Tablica 18. Koeficijenti materijalnih modela za uzdužne uzorke odmrznute nakon mjesec dana

	n-Hooke	Mooney-Rivlin		Yeoh		
	C_{10}	C_{10}	C_{01}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
M	0.03858	0.462455	-0.55565	0.0253171	0.01638788	0.00935995
S.D.	0.005577	0.123281	0.154242	0.0034738	0.00866012	0.00288365
Ogden						
	μ_1	μ_2	μ_3	α_1	α_2	α_3
M	-12.479715	6.2492884	6.2872060	3.7548844	4.3406267	2.572339
S.D.	12.975428	6.465705	6.5148578	0.7444501	0.9873879	1.087363

Uzorci odmrznuti nakon 4 mjeseca pokazali su dobru korelaciju s Yeoh (R = 0,9992) i Ogden (R = 0,9989) materijalnim modelom, pri čemu su oba modela stabilna u cijelom rasponu deformacija. Neo-Hookeov (R = 0,8298) model dobro opisuje mehanički odziv pri malim deformacijama (< 0,5) dok pri većim deformacijama znatno odstupa od eksperimentalnih podataka (Slika 102.). Mooney-Rivlinov (R = 0,9334) model nestabilan je za sve uzorke te loše opisuje mehaničko ponašanje aorte. Koeficijenti ovih modela kao i njihove srednje vrijednosti i standardne devijacije dani su u Tablica 19.



Slika 102. Konstitutivni modeli za uzdužne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane

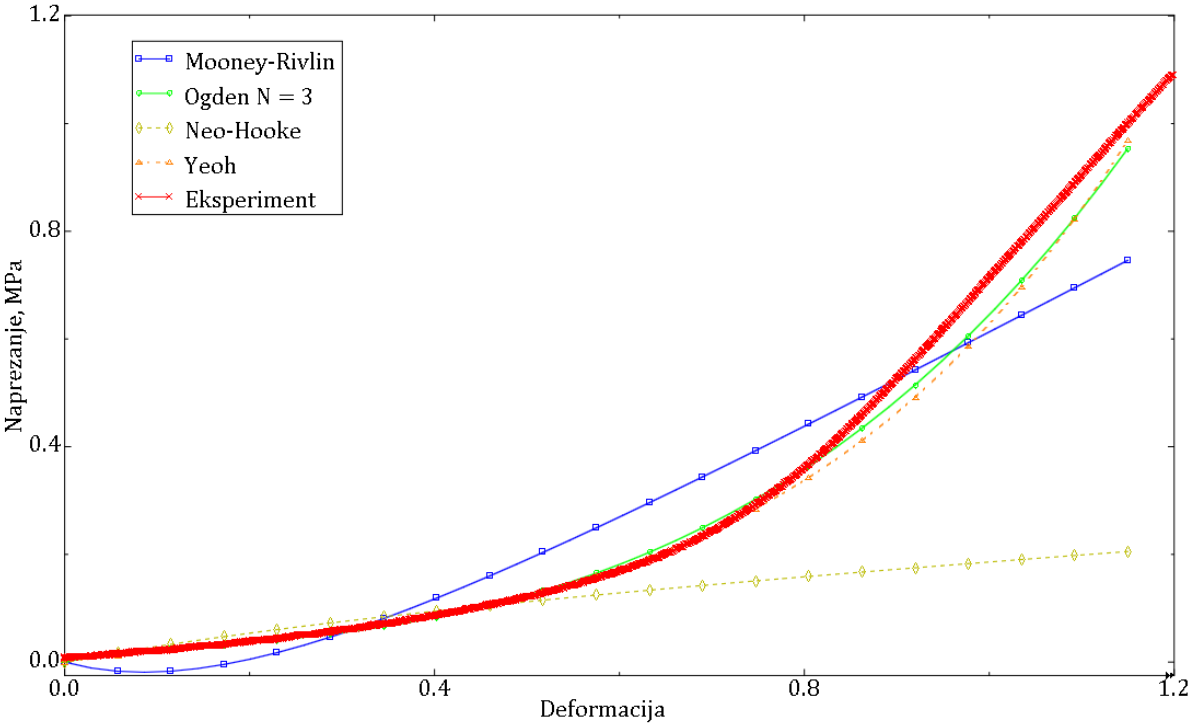
Tablica 19. Koeficijenti materijalnih modela za uzdužne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca

	n-Hooke	Mooney-Rivlin		Yeoh		
	C_{10}	C_{10}	C_{01}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
M	0.034919	0.327069	-0.38736	0.0248448	0.00704606	0.0063314
S.D.	0.012311	0.112934	0.156325	0.0108791	0.01006317	0.00473226
Ogden						
	μ_1	μ_2	μ_3	α_1	α_2	α_3
M	-1.4628609	0.7938792	0.7457492	5.5324257	7.1779057	-5.96807
S.D.	3.1601069	1.5476463	1.6123477	2.9602079	2.0096998	7.997552

Kod uzdužnih uzoraka odmrznutih nakon devet mjeseci Yeoh model pokazao se stabilnim za sve uzorke te jako dobro opisuje mehanički odziv aorte u velikom rasponu deformacija. Ogdenov model (R = 0,9929) odlično korelira s eksperimentom (Slika 103.), kao i Yeohov model (R = 0,9892) dok se prvi pokazao nešto nestabilnijim zbog velikog broja koeficijenata koje treba prilagoditi eksperimentalnim rezultatima.

Mooney-Rivlin model (R = 0,9683) i ovdje se pokazao neadekvatnim za opis mehaničkog ponašanja tkiva aorte kako zbog loše korelacije, tako i zbog nezadovoljavanja kriterija stabilnosti za sve uzorke, slična svojstva je pokazao i Neo-

Hookeov model (R = 0,8932) (Slika 103.). Koeficijenti ovih modela za uzdužne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane dani su u Tablica 20.



Slika 103. Konstitutivni modeli za uzdužne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane

Tablica 20. Koeficijenti materijalnih modela za uzdužne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci

	n-Hooke	Mooney-Rivlin		Yeoh		
	C_{10}	C_{10}	C_{01}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
M	0.039563	0.342059	-0.40017	0.0275667	0.00766333	0.00636524
S.D.	0.011658	0.129464	0.173144	0.0079191	0.00724245	0.00281554
Ogden						
	μ_1	μ_2	μ_3	α_1	α_2	α_3
M	-8.2635488	4.1230549	4.2216402	2.6753577	5.8013628	-4.8285
S.D.	13.712067	6.6340813	7.1019475	4.1174342	3.4299626	5.68208

Neo-Hookeov model može dobro opisati mehanički odziv tkiva aorte pri niskim deformacijama, najčešće do 0,5% deformacije. Pri većim deformacijama ovaj model zbog svoje linearne veze s prvom invarijantom deformacije nije u stanju opisati povećanje krutosti koju unose vlakna kolagena u tom području mehaničkog odziva.

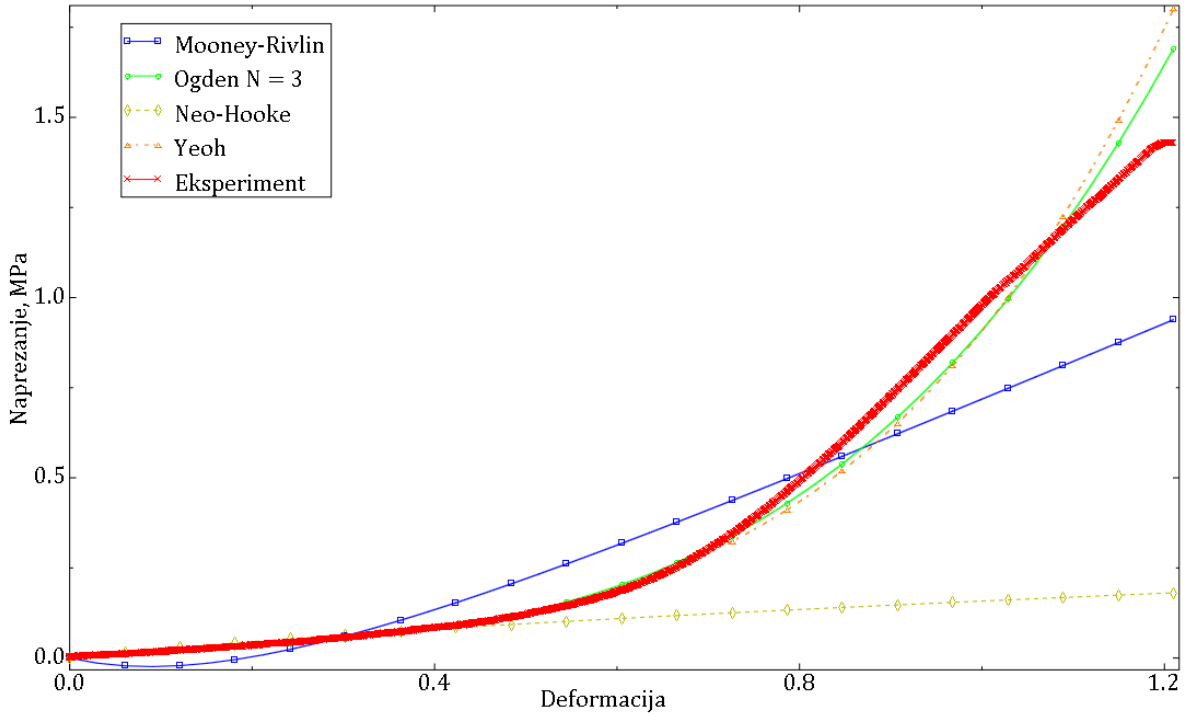
Mooney-Rivlinov model pokazao je najlošiju korelaciju s eksperimentalnim rezultatima, te nije ispunio kriterij stabilnosti za niti jedan uzorak zbog čega je neadekvatan za opis mehaničkog ponašanja u cijelom rasponu deformacija.

Yeohov model pokazao se najstabilnijim za opis mehaničkog ponašanja svih vrsta uzoraka. Sva tri koeficijenta ovog modela iskazuju mnogo manje odstupanje od prosječne vrijednosti koeficijenata Ogdenovog modela kod kojega zbog velikog broja koeficijenata (6) dolazi do značajnih oscilacija u njihovim vrijednostima.

Ogdenov model dobro opisuje mehaničko ponašanje tkiva aorte, no uz nešto manje stabilnosti od Yeohovog modela. Također, veliki broj koeficijenata ovog modela dovodi do toga da i pri malim promjenama odnosa *deformacija-naprezanje* dolazi do velikih promjena u vrijednostima koeficijenata.

7.2.2. Poprečni uzorci

Kao i kod uzdužnih uzoraka, ponašanje svježih poprečnih uzoraka aorte (Slika 104.) najbolje opisuju Yeohov (R = 0,9976) i Ogdenov model (R = 0,9981), pri čemu prvi ispunjava kriterij stabilnosti za sve uzorke što nije slučaj kod Ogdenovog modela koji je podložan velikim promjenama vrijednosti koeficijenata što je vidljivo iz odnosa njihove srednje vrijednosti te standardne devijacije prikazane u Tablica 21. zajedno s koeficijentima ostalih modela za svježe poprečne uzorke aorte.



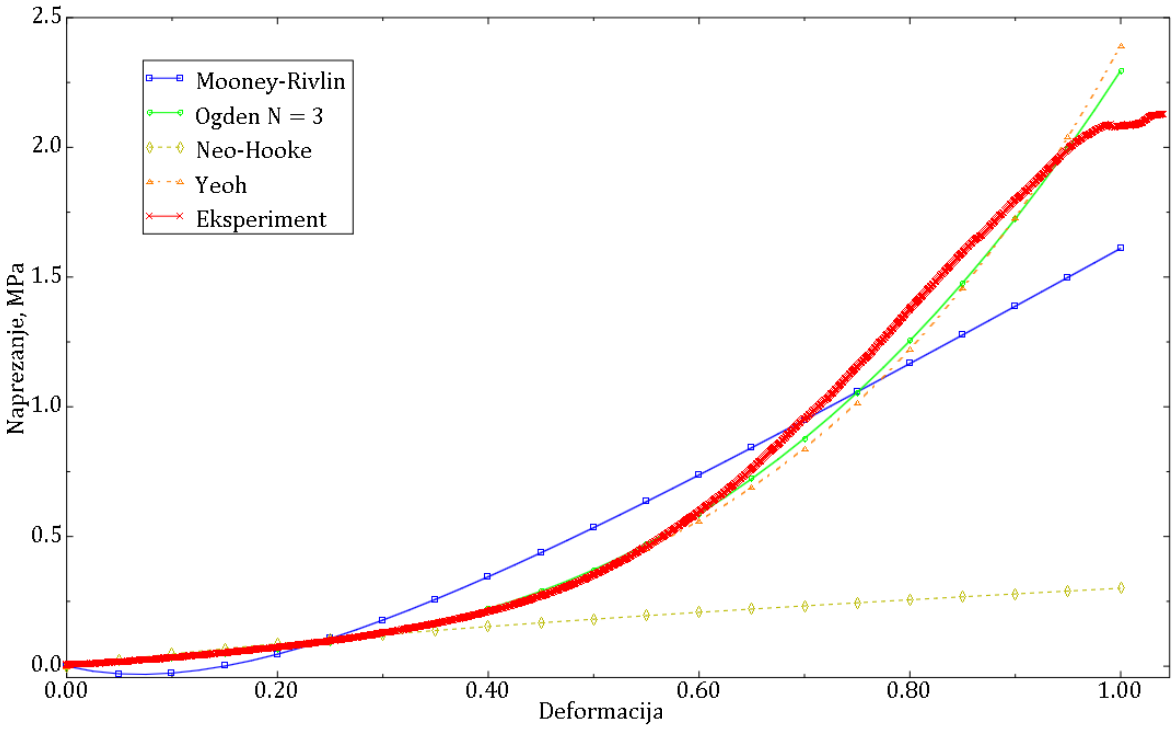
Slika 104. Konstitutivni modeli za svježe poprečne uzorke aorte

Tablica 21. Koeficijenti materijalnih modela za poprečne svježe uzorke aorte

	n-Hooke	Mooney-Rivlin		Yeoh		
	C_{10}	C_{10}	C_{01}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
M	0.039186	0.291501	-0.36749	0.0231795	0.0113387	0.0006034
S.D.	0.009018	0.041614	0.052171	0.0053502	0.0032275	0.00066596
Ogden						
	μ_1	μ_2	μ_3	α_1	α_2	α_3
M	-3.558968	1.895149	1.7151379	2.213183	2.79958	0.77291
S.D.	5.251571	2.6103578	2.6460092	2.316865	2.043052	4.156088

Neo-Hookeov (R = 0,8977) te Mooney-Rivlinov (R = 0,9701) model i ovdje nisu pokazali dobru korelaciju s eksperimentom (Slika 104.). Neo-Hooke model je stabilan pri niskim deformacijama dok Mooney-Rivlin ne ispujava uvjet stabilnosti za niti jedan uzorak.

Ogdenov model dobro korelira s eksperimentalnim rezultatima poprečnih uzoraka odmrznutih nakon mjesec dana pohrane (R = 0,9943) kao i Yeohov model (R = 0.9898), dok su Mooney-Rivlin (R = 0,9794) i Neo-Hooke modeli (R = 0,8828) koji najlošije opisuju mehanički odziv tkiva aorte (Slika 105.).



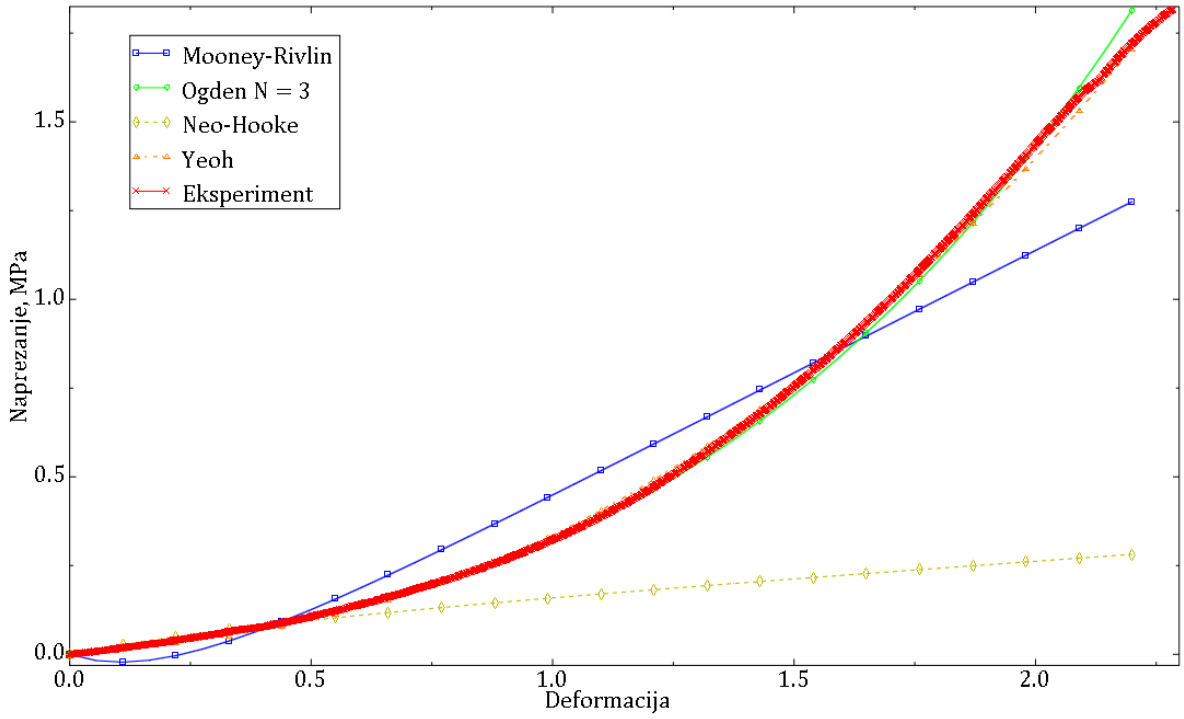
Slika 105. Konstitutivni modeli za poprečne uzorke odmrznute nakon mjesec dana

Koeficijenti materijalnih modela za poprečne uzorke odmrznute nakon mjesec dana prikazani su u Tablica 22. Promatrajući standardne devijacije ovih modela jasno se vidi kako je Yeohov model manje podložan neočekivanim promjenama vrijednosti koeficijenata za razliku od Ogdenovog modela. Naime, u Ogdenovom modelu standardna devijacija koeficijenata reda je veličine prosječne vrijednosti koeficijenta što ukazuje na veliki raspon unutar kojega se može očekivati vrijednost pojedinog koeficijenta. Ovo posebno vrijedi za koeficijent α_3 kojemu je standardna devijacija nerijetko i nekoliko puta veća od prosječne vrijednosti koeficijenta.

Tablica 22. Koeficijenti materijalnih modela za poprečne uzorke odmrznute nakon mjesec dana

	n-Hooke	Mooney-Rivlin		Yeoh		
	C_{10}	C_{10}	C_{01}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
M	0.106047	1.068665	-1.1927	0.0657575	0.10522686	0.0215362
S.D.	0.013705	0.286674	0.326756	0.0078902	0.05350303	0.02106367
Ogden						
	μ_1	μ_2	μ_3	α_1	α_2	α_3
M	-41.667252	20.736449	21.116746	1.7914377	2.6421520	-1.91946
S.D.	37.808151	18.564401	19.262309	2.2947870	2.2057963	4.878567

Poprečni uzorci odmrznuti nakon četiri mjeseca pokazali su najbolju korelaciju s Yeoh (R = 0,9997) i Ogdenovim (R = 0,9987) konstitutivnim modelima dok Mooney-Rivlin (R = 0,9747) nije stabilan te ne opisuje dobro mehaničko ponašanje tkiva aorte. Neo-Hookeov model (R = 0,9062) nešto je stabilniji no ne može obuhvatiti čitav raspon deformacija kroz koje prolazi tkivo aorte u jednoosnom vlačnom testu te se kao i Mooney-Rivlinov model ne preporuča za opisivanje mehaničkog odziva tkiva aorte (Slika 106.).



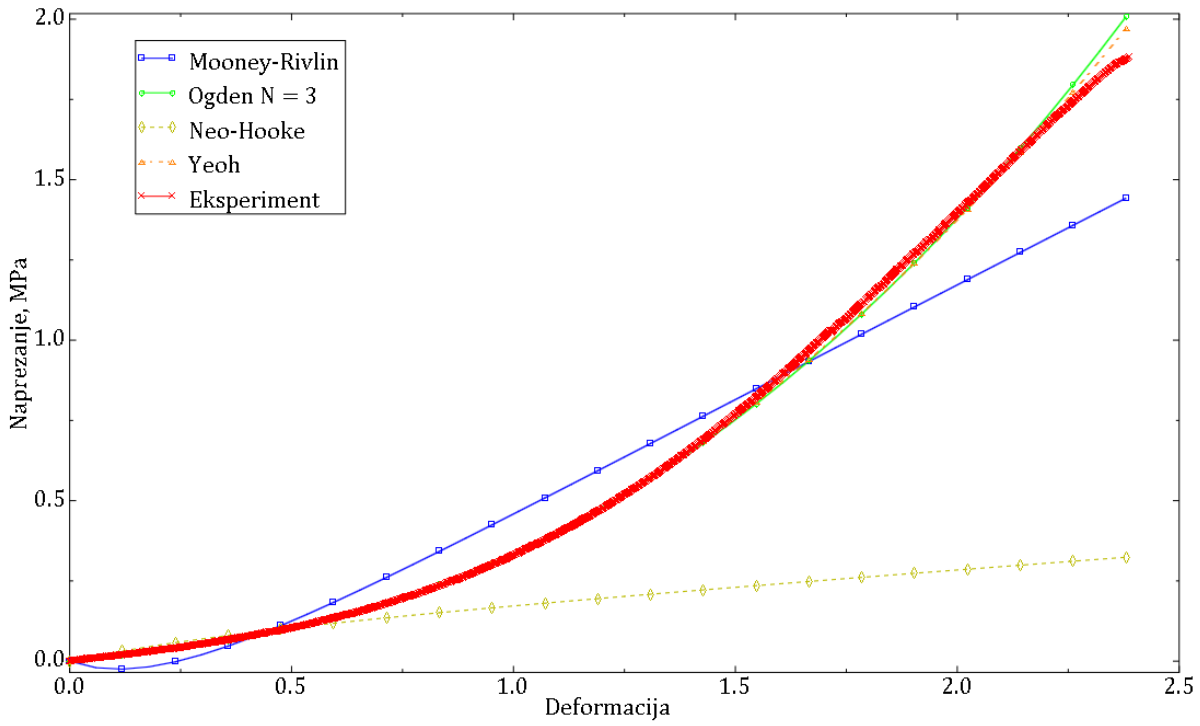
Slika 106. Konstitutivni modeli za poprečne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca pohrane

Koeficijenti Yeohovog modela iskazuju mnogo manji raspon vrijednosti koje mogu poprimiti što je vidljivo iz standardne devijacije koja je za koeficijenta C_{10} i C_{20} u pravilu manja za red veličine od prosječne vrijednosti koeficijenata. Koeficijent C_{30} može poprimiti nešto veći raspon vrijednosti te mu je standardna devijacija reda veličine prosječne vrijednosti koeficijenta (Tablica 23.).

Tablica 23. Koeficijenti materijalnih modela za poprečne uzorke odmrznute nakon četiri mjeseca

	n-Hooke	Mooney-Rivlin		Yeoh		
	C_{10}	C_{10}	C_{01}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
M	0.050117	0.357521	-0.439900	0.0269300	0.0215426	-0.0005625
S.D.	0.006869	0.045645	0.049651	0.0048793	0.00771879	0.00054821
Ogden						
	μ_1	μ_2	μ_3	α_1	α_2	α_3
M	-13.094700	7.0542475	6.0831120	1.0826564	3.2207475	-3.31284
S.D.	15.068019	7.4769156	7.6162200	3.5809909	1.7210262	5.926746

Poprečni uzorci odmrznuti nakon devet mjeseci pohrane potvrđuju generalni trend kod kojeg su nabolje korelirali Yeoh (R = 0,9995) i Ogden (R = 0,9992) konstitutivni modeli.



Slika 107. Konstitutivni modeli za poprečne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci pohrane

Mooney-Rivlin (R = 0,9799) te Neo-Hooke modeli (R = 0,9178) potvrdili su lošiji opis mehaničkog odziva tkiva aorte (Slika 107.). Koeficijenti materijalnih modela za poprečne uzorke aorte odmrznute nakon devet mjeseci pohrane dani su u Tablica 24.

Tablica 24. Koeficijenti materijalnih modela za poprečne uzorke odmrznute nakon devet mjeseci

	n-Hooke	Mooney-Rivlin		Yeoh		
	C_{10}	C_{10}	C_{01}	C_{10}	C_{20}	C_{30}
M	0.053056	0.361764	-0.44355	0.0291587	0.0205742	-0.0003575
S.D.	0.005837	0.054835	0.073909	0.0040716	0.00537898	0.00054587
Ogden						
	μ_1	μ_2	μ_3	α_1	α_2	α_3
M	-17.684756	9.3032383	8.4387742	2.2066503	2.5882443	-0.46108
S.D.	23.444489	11.824958	11.628260	1.3402622	1.2872923	4.792648

➢ Rasprava

Neo-Hookeov model, prema očekivanjima, nije uspio zadovoljavajuće korelirati s rezultatima eksperimentalnih ispitivanja svinjske torakalne aorte te je koeficijent korelacije ovog modela $R < 0{,}9$ za sve skupine uzoraka osim poprečnih uzoraka odmrznutih nakon četiri ($R = 0{,}9062$) odnosno devet mjeseci ($R = 0{,}9178$). Posljedica je to linearne veze ovog modela s prvom invarijantom deformacije. Zbog svoje linearnosti može dobro opisati prvi linearni dio mehaničkog odziva aorte, do uključenja kolagenskih vlakana u proces opterećenja no to mogu opisati i ostali modeli pri čemu Yeoh i Ogden modeli mogu opisati čitav raspon deformacije prilikom opterećenja uzorka aorte uz značajno bolju korelaciju s eksperimentalnim rezultatima.

U ovom istraživanju Mooney-Rivlinov model pokazao se neadekvatnim za opis mehaničkog ponašanja tkiva aorte unatoč visokom iznosu koeficijenta korelacije $R > 0{,}95$ osim kod svježih uzdužnih ($R = 0{,}9429$) i uzdužnih uzoraka odmrznutih nakon četiri mjeseca ($R = 0{,}9334$). Naime, ovaj model nije se pokazao stabilnim budući da dovodi do smanjenja deformacija prilikom povećanja naprezanja te nije ispunio Druckerov kriterij stabilnosti za gotovo sve uzorke unutar svih ispitnih skupina.

Ogdenov materijalni model pokazao je iznimno dobru korelaciju s eksperimentalnim rezultatima ($R > 0{,}99$) osim za svježe uzdužne uzorke ($R = 0{,}9872$). Međutim, model nije stabilan za sve uzorke te prilikom malih promjena u odnosu *deformacija-naprezanje* dolazi do značajnih promjena iznosa koeficijenata budući da ih ovaj model sadrži čak šest što je najviše od svih promatranih modela. Na ovo ukazuje iznos standardne devijacije koja je za koeficijente ovog modela reda veličine prosječnog iznosa odgovarajućeg koeficijenta, dok je kod nekih koeficijenata poput α_3 kod poprečnih uzoraka (osim onih odmrznutih nakon četiri mjeseca) i do nekoliko puta veća od prosječnog iznosa. Posljedica velikog broja koeficijenata je zato dobra korelacija s eksperimentom koja često zna biti nauštrb zadovoljavanja Druckerovog kriterija stabilnosti u određenom rasponu deformacije. Stoga, ovaj model ne pruža kvalitetan opis eksperimentalnih rezultata i ne preporučuje se za opisivanje mehaničkog ponašanja tkiva torakalne aorte, a ako se već koristi valja pažljivo interpretirati iznose koeficijenata ovog modela.

Na temelju rezultata prikazanih u ovom poglavlju Yeohov materijalni model pokazao se najboljim izborom za opis mehaničkog odziva tkiva aorte i to iz nekoliko razloga. Prije svega, ovaj model pokazao se stabilnim ispunivši Druckerov kriterij stabilnosti za sve skupine uzoraka. Yeohov model je, uz Ogdenov, pokazao najbolju korelaciju s eksperimentalnih rezultatima ($R > 0,99$) za sve skupine uzoraka. Neznatno lošiju korelaciju ovaj model postigao je s uzdužnim uzorcima odmrznutima nakon devet ($R = 0,9892$), odnosno poprečnim uzorcima odmrznutima nakon jednog mjeseca pohrane ($R = 0,9898$). Dodatna prednost ovoga modela su svega tri koeficijenta koje treba identificirati: C_{10}, C_{20} te C_{30}, dok je čitav model definiran kao funkcija prve invarijante deformacije. Koeficijent C_{10} određuje linearni, dok su preostala dva koeficijenta zadužena za opis nelinearnog dijela mehaničkog ponašanja tkiva aorte.

Eksperimentalnim ispitivanjem utvrđeno je kako koeficijent C_{10} za uzdužne uzorke iznosi 0,0281399 te opada nakon mjesec (0,0253171) odnosno četiri mjeseca pohrane (0,0248448) dok nagli skok doživljava nakon devet mjeseci pohrane (0,0275667), iako još uvijek manjeg iznosa od onog kod svježih uzoraka. Ovo se može interpretirati kao smanjenje krutosti tkiva aorte u uzdužnom smjeru nakon pohrane uzoraka, što je u skladu s opaženim eksperimentalnim rezultatima modula elastičnosti u prvom linearnom dijelu mehaničkog odziva (E_1), opisanim u prethodnom poglavlju. Iznos koeficijenata C_{20} i C_{30} smanjuje se kod odmrznutih uzoraka te ostaje otprilike isti nakon 4 mjeseca pohrane što odgovara eksperimentalnim rezultatima koji ukazuju na smanjenje modula elastičnosti pri velikim deformacijama (E_2).

U poprečnom smjeru, iznos koeficijenta C_{10} povećao se od 0,0231795 za svježe uzorke do 0,0657575 kod uzoraka odmrznutih nakon mjesec dana pohrane, dok je za uzorke pohranjene na četiri odnosno devet mjeseci 0,0269300 odnosno 0,0291587. Iako je ovo suprotno očekivanjima budući da eksperimentalni rezultati ukazuju na pad krutosti (E_1) nakon odmrzavanja poprečnih uzoraka. Identično ponašanje opaženo je kod koeficijenta C_{20} dok je koeficijent C_{30} približno jednak nuli kod svih skupina uzoraka.

Zaključno, Yeohov model može poslužiti za opis mehaničkog ponašanja tkiva aorte u jednoosno vlačnom testu, pri čemu se u uzdužnom smjeru povećanje koeficijenata modela može povezati s povećanjem modula elastičnosti aorte i obrnuto. U poprečnom smjeru, unatoč dobroj korelaciji, koeficijenti ovog modela ne prate pad krutosti odmrznutih uzoraka, kakav je zabilježen eksperimentalno, stoga u ovom smjeru valja

pripaziti s fizikalnom interpretacijom koeficijenata. Ovdje valja napomenuti kako je Yeoh, poput ranije opisanih, fenomenološki model što znači da ne opisuje nužno fizikalnu pozadinu promatranog ispitivanja te i ovdje valja pripaziti na interpretaciju dobivenih koeficijenata. Također, linearni modeli poput ovdje opisanih nisu u stanju opisati puno polje deformacija heterogenih struktura kao što je tkivo aorte. Prednost bi trebalo dati metodama koje mogu opisati složeno polje deformacije poput metode korelacije digitalne slike koja u sklopu s FEM modelom može dati kompletniji opis mehaničkog ponašanja tkiva aorte.

8. Zaključak

U provedenom istraživanju eksperimentalno su ispitana mehanička svojstva svježih i odmrznutih uzoraka aorti. Mehanička svojstva ispitivana su na uzdužnim i poprečnim uzorcima tkiva torakalnih svinjskih aorti. Rezultati jednoosnog statičkog vlačnog testa ukazuju na statistički značajne promjene mehaničkih svojstava tkiva aorte nakon pohrane i odmrzavanja iz kriogene faze, čime je potvrđena hipoteza kako krioprezervacija utječe na mehanička svojstva aorti.

Uzorci tkiva aorte ispitani su u jednoosnom statičkom vlačnom testu na temelju kojeg je dobiven odnos *deformacija-naprezanje* za tkivo aorte. Iz ovog odnosa određeni su moduli elastičnosti E_1 i E_2 te vlačna čvrstoća R_m. Modul elastičnosti E_1 definiran je za male deformacije kod kojih tkivo aorte iskazuje linearno ponašanje, a opterećenje najvećim dijelom preuzimaju vlakna elastina. Ovaj modul određuje krutost žile tako što povećanjem iznosa modula E_1 raste i krutost žile. Porastom naprezanja, kolagenska vlakna ispravljaju se u smjeru opterećenja te se uključuju u proces deformiranja pa je u ovom rasponu deformacije mehaničko ponašanje aorte izrazito nelinearno. Daljnjim porastom naprezanja dolazi se do drugog linearnog djela mehaničkog odziva koji se opisuje modulom elastičnosti E_2, odnosno nagibom krivulje *deformacija-naprezanje* u tom području. Također, porastom iznosa ovog modula raste i krutost žile u tom rasponu deformacije.

Eksperimentalni rezultati uzoraka u uzdužnom smjeru aorte pokazali su kako se krutost u ovom smjeru tkiva smanjuje već nakon mjesec dana odmrzavanja, pri čemu se krutost pri malim deformacijama (E_1) smanji za 15% dok se krutost dana modulom E_2 smanji za 22%. Smanjenje krutosti potvrđeno je i kod skupina uzoraka pohranjenih na četiri odnosno devet mjeseci, pri čemu je zabilježen nešto manji pad krutosti nakon devetog mjeseca pohrane.

Odmrznuti uzorci u poprečnom smjeru pucali su pri nižim naprezanjima za sve ispitane skupine. Dok kod uzdužnih uzoraka pohranjenih na mjesec dana ovaj pad vlačne čvrstoće nije statistički značajan, uzorci odmrznuti nakon četiri odnosno devet mjeseci pucali su pri gotovo 50% manjem naprezanju, što je potvrđeno statističkom obradom rezultata.

U poprečnom smjeru tkiva aorte, nakon mjesec dana pohrane uočen je značajan porast krutosti žile pri malim (E_1) i velikim deformacijama (E_2) i to za više od dva, odnosno tri puta. Nakon četiri mjeseca pohrane uočen je nešto manji porast krutost u poprečnom smjeru aorte i to u cijelom rasponu deformacija tako da je modul E_1 porastao za 11%, a E_2 za 13%. Uzorci pohranjeni na devet mjeseci nakon odmrzavanja pokazali su pad krutosti pri malim deformacijama za 18%, dok je suprotno tome, pri velikim deformacijama krutost porasla za gotovo 25%.

Sukladno porastu krutosti, odmrznuti poprečni uzorci pucali su pri većem naprezanju te su nakon mjesec dana pohrane ispitani uzorci pokazali porast vlačne čvrstoće za 27%. Ovaj porast vlačne čvrstoće nešto je manji nakon četiri (18%) odnosno devet mjeseci pohrane (21%).

Statističkom obradom rezultata utvrđeno je kako su sve promjene mehaničkih svojstava statistički značajke, dok to jedino nije potvrđeno za pad vlačne čvrstoće u uzdužnom smjeru nakon mjesec dana pohrane. Potvrda je to kako prilikom pohrane tkiva aorte u krioprezerviranom stanju dolazi do određenih promjena koje utječu na mehanička svojstva u uzdužnom i poprečnom smjeru već nakon mjesec dana pohrane. Ostaje još utvrditi značajnost ovih rezultata u kliničkoj primjeni.

Upotrebom optičkog mjernog sustava ARAMIS, metodom korelacije digitalne slike, dobiveno je polje pomaka odnosno deformacije na površini tkiva aorte u jednoosnom vlačnom testu. Optičkim mjerenjem ustanovljeno je anizotropno mehaničko ponašanje tkiva aorte vidljivo iz polja deformacije u određenoj slici prikupljenoj prilikom izvođenja vlačnog testa. Promatranjem rezultata svih slika uzetih tijekom eksperimentalnog ispitivanja, DIC metodom ustanovljeno je nelinearno ponašanje polja deformacije u uzdužnom i poprečnom smjeru aorte. Također, rezultati optičkog mjerenja pokazuju kako svježi uzorci poprimaju širi raspon deformacije od odmrznutih uzoraka prilikom vlačnog testa, bez obzira na trajanje pohrane što bi moglo sugerirati veću energiju deformacije koju posjeduje svježe tkivo aorte. DIC metodom ustanovljeno je i kako svježi uzorci dostižu veće deformacije prije pucanja što je u skladu s eksperimentalnim rezultatima dobivenim s upravljačke jedinice kidalice. Ovime je potvrđena hipoteza po kojoj se DIC metodom može dobiti bolji uvid u mehanička svojstva tkiva aorti. Prilikom obrade rezultata DIC mjerenja, na slikama ispitivanja uzorka uočeno je kako najprije dolazi do pucanja sloja intime, a tek onda ostalih slojeva aorte.

Nedostatak korištenog optičkog mjernog sustava je nemogućnost povezivanja s upravljačkom jedinicom kidalice što onemogućava direktno povezivanje deformacije u određenoj slici s naprezanjem na kidalici. Usprkos tome rezultati optičkog mjerenja dobra su podloga za buduća ispitivanja, poglavito u okviru metode konačnih elemenata i drugih numeričkih metoda kojima bi se moglo modelirati mehaničko ponašanje mekih tkiva pa tako i tkiva aorte.

Usporedbom četiri materijalna modela najčešće korištena u ispitivanjima mehaničkih svojstava mekih tkiva; Mooney-Rivlin, Neo-Hooke, Ogden i Yeoh, ustanovljeno je kako je posljednji najpogodniji za opis mehaničkog odziva tkiva aorte u svježem i odmrznutom stanju. Neo-Hookeov model zbog linearnosti nije u stanju opisati mehaničko ponašanje aorte u čitavom rasponu deformacija, dok je Mooney-Rivlinov model, uz nešto manju korelaciju, izrazito nestabilan za sve skupine uzoraka. Ogden model pokazao je najbolju korelaciju s eksperimentalnim rezultatima, ponajviše zahvaljujući čak šest koeficijenata koji povezuju energiju deformiranja s prvom invarijantom deformacije. Međutim, zbog velikog broja koeficijenata ovog modela, snaga korelacije ovog modela s eksperimentalnim rezultatima često je nauštrb ispunjavanja Druckerovog kriterija odnosno kriterija stabilnosti modela, te ovaj model ako se već koristi valja pažljivo interpretirati.

Yeoh materijalni model najbolje opisuje mehaničko ponašanje tkiva aorte ispitanog u ovom istraživanju. Osim veoma dobre korelacije s eksperimentalnim rezultatima, ovaj model pokazao se stabilnim za sve skupine ispitanih uzoraka. Prednost ovog modela svakako su i samo tri koeficijenta koji su i ovdje funkcija prve invarijante deformacije. Unatoč tome, svi opisani modeli su izotropni te bi se svakako kod budućeg razvoja materijalnih modela tkiva aorte prednost trebala dati metodama poput korelacije digitalne slike kojima je moguće opisati puno polje pomaka odnosno deformacije na površini uzorka čime bi se dobio potpuniji prikaz mehaničkog ponašanja aorte.

➢ Znanstveni doprinos

- Eksperimentalnim ispitivanjima dokazano je kako tkivo aorte prolazi kroz određene promjene prilikom pohrane u krioprezerviranom stanju koje utječu na ishod mehaničkih testiranja. Tako su uzdužni uzorci pokazali smanjenje, a poprečni uzorci povećanje krutosti nakon jednog, četiri te devet mjeseci pohrane.
- U ovom istraživanju pokazano je kako se metodom korelacije digitalne slike može dobiti polje pomaka i deformacije na površini uzorka tkiva aorte u jednoosnom vlačnom testu. Ovom metodom može se dobiti puno više informacija o pomaku čitavog uzorka tijekom ispitivanja za razliku od mjerenja pomaka samo jedne točke uzorka kako je to uobičajeno bez korištenja DIC metode. Polje deformacije na površini ispitnih uzoraka jasno ukazuje na anizotropnost mehaničkih svojstava kao i na nelinearnost mehaničkog ponašanja tkiva aorte čime se dobiva bolji uvid u mehanički odziv aorte.
- Promatrajući četiri najčešće korištena materijalna modela u literaturi, Yeohov model pokazao se najpogodnijim za opis mehaničkog ponašanja svinjske aorte zbog dobre korelacije, stabilnosti modela te svega tri koeficijenta koje treba identificirati. Kako su promatrani materijalni modeli izotropni, valjalo bi u budućim istraživanjima ulogu modeliranja mehaničkog ponašanja aorte prepustiti DIC metodi kojom se mogu odrediti složene deformacije na površini njezina tkiva.

➢ Buduća istraživanja

Eksperimentalni rezultati pokazuju kako dolazi do statistički značajnih promjena u mehaničkim svojstvima uslijed pohrane tkiva aorte krioprezervacijom te bi u budućim istraživanjima trebalo odrediti klinički značaj ovih rezultata. Točnije, potrebno je odrediti utjecaj ovih promjena u mehaničkim svojstvima na razvoj patoloških promjena koje mogu utjecati na dugotrajnu uspješnost kardiovaskularnog presatka.

Nedostatak korištenog optičkog mjernog sustava je nemogućnost povezivanja sa signalom s kidalice te bi u budućim istraživanjima trebalo premostiti ovaj tehnički nedostatak. U slučaju povezivanja ova dva signala dobio bi se potpuni uvid u mehaničko ponašanje tkiva aorte u smislu odnosa *deformacija-naprezanje*. Optičkim mjernim sustavom ARAMIS sniman je uzorak aorte prilikom izvođenja jednoosnog vlačnog testa pri čemu sustav omogućuje pohranu geometrije uzorka u *.stl formatu prikladnom za učitavanje u nekom od FEM programskih paketa poput Abaqusa. Na ovaj način može se dobiti numerički model rekonstrukcijom tkiva aorte u tri dimenzije na koji se onda u obliku rubnih uvjeta može nanijeti polje deformacije dobiveno u eksperimentu. Implementacijom DIC rezultata u neki od FEM programa dobio bi se kvalitetniji materijalni model mehaničkog ponašanja tkiva aorte od trenutno postojećih izotropnih materijalnih modela, pa i nekih anizotropnih modela temeljenih na linearnoj vezi deformacije i naprezanja. Na tim modelima također bi se mogla definirati i složenija opterećenja od jednoosnog vlačnog opterećenja, što nudi mogućnost zadavanja opterećenja *in vivo*, što bi bilo od velike koristi u proučavanju promjena mehaničkih svojstava zbog različitih patoloških utjecaja.

LITERATURA

[1] Haruguchi H, Teraoka S. Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. Journal of Artificial Organs 2003;6:227–35. doi:10.1007/s10047-003-0232-x.
[2] Tai NR, Salacinski HJ, Edwards A, Hamilton G, Seifalian AM. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. British Journal of Surgery 2000;87:1516–24. doi:10.1046/j.1365-2168.2000.01566.x.
[3] Sarkar S, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. The Mechanical Properties of Infrainguinal Vascular Bypass Grafts: Their Role in Influencing Patency. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2006;31:627–36. doi:10.1016/j.ejvs.2006.01.006.
[4] Dart AM, Lacombe F, Yeoh JK, Cameron JD, Jennings GL, Laufer E, et al. Aortic distensibility in patients with isolated hypercholesterolaemia, coronary artery disease, or cardiac transplant. The Lancet 1991;338:270–3. doi:10.1016/0140-6736(91)90415-L.
[5] Aspinall R. Aging of the Organs and Systems. Springer Science & Business Media; 2013.
[6] Heintz B, Gillessen T, Walkenhorst F, Dahl J vom, Dörr R, Krebs W, et al. Evaluation of segmental elastic properties of the aorta in normotensive and medically treated hypertensive patients by intravascular ultrasound. Journal of Hypertension 1993;11.
[7] Wagenseil JE, Mecham RP. Elastin in Large Artery Stiffness and Hypertension. Journal of Cardiovascular Translational Research 2012;5:264–73. doi:10.1007/s12265-012-9349-8.
[8] Salomaa V, Riley W, Kark JD, Nardo C, Folsom AR. Non–Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Fasting Glucose and Insulin Concentrations Are Associated With Arterial Stiffness Indexes. Circulation 1995;91:1432. doi:10.1161/01.CIR.91.5.1432.
[9] Prenner SB, Chirinos JA. Arterial stiffness in diabetes mellitus. Atherosclerosis 2015;238:370–9. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.023.
[10] Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, et al. Aortic Stiffness Is an Independent Predictor of Primary Coronary Events in Hypertensive Patients. Hypertension 2002;39:10. doi:10.1161/hy0102.099031.
[11] Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano A-I, Gautier I, Laloux B, et al. Aortic Stiffness Is an Independent Predictor of Fatal Stroke in Essential Hypertension. Stroke 2003;34:1203. doi:10.1161/01.STR.0000065428.03209.64.
[12] Pereira T, Maldonado J, Pereira L, Conde J. Aortic stiffness is an independent predictor of stroke in hypertensive patients. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 2013;100:437–43. doi:10.5935/abc.20130079.
[13] Fahner PJ, Idu MM, van Gulik TM, Legemate DA. Systematic review of preservation methods and clinical outcome of infrainguinal vascular allografts. Journal of Vascular Surgery 2006;44:518–24. doi:10.1016/j.jvs.2006.05.037.
[14] Lally et. al. Elastic Behavior of Porcine Coronary Artery Tissue under Uniaxial and Equibiaxial Tension. Annals of Biomedical Engineering 2004;32:1355–64.

[15] Delgadillo JOV, Delorme S, Thibault F, DiRaddo R, Hatzikiriakos SG. Large Deformation Characterization of Porcine Thoracic Aortas: Inverse Modeling Fitting of Uniaxial and Biaxial Tests. Journal of Biomedical Science and Engineering 2015;08:717. doi:10.4236/jbise.2015.810069.
[16] Arroyave G. AI, Lima RG, Martins PALS, Ramião N, Jorge RMN. Methodology for Mechanical Characterization of Soft Biological Tissues: Arteries. Procedia Engineering 2015;110:74–81. doi:10.1016/j.proeng.2015.07.012.
[17] Jay D. Humphrey. Cardiovascular Solid Mechanics. New York: Springer; 2002.
[18] Kassab GS. Biomechanics of the cardiovascular system: the aorta as an illustratory example. J R Soc Interface 2006;3:719. doi:10.1098/rsif.2006.0138.
[19] HC. Hughes. Swine in cardiovascular research. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 1986;36:348–50.
[20] Hughes GC, Post MJ, Simons M, Annex BH. Translational Physiology: Porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. J Appl Physiol 2003;94:1689. doi:10.1152/japplphysiol.00465.2002.
[21] Fung YC, Fronek K, Patitucci P. Pseudoelasticity of arteries and the choice of its mathematical expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1979;237:H620.
[22] Fung YC. Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues. Springer New York; 2013.
[23] Chuong CJ, Fung YC. On Residual Stresses in Arteries. Journal of Biomechanical Engineering 1986;108:189–92. doi:10.1115/1.3138600.
[24] Humphrey JD. Review Paper: Continuum biomechanics of soft biological tissues. Proceedings of the Royal Society of London Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 2003;459:3. doi:10.1098/rspa.2002.1060.
[25] Holzapfel et. al. A New Constitutive Framework for Arterial Wall Mechanics and a Comparative Study of Material Models. Journal of Elasticity 2000;66:1–48. doi:10.1023/A:1010835316564.
[26] Humphrey JD. Mechanics of the arterial wall: review and directions. Crit Rev Biomed Eng 1995;23:1–162.
[27] Humphrey JD. An Evaluation of Pseudoelastic Descriptors Used in Arterial Mechanics. Journal of Biomechanical Engineering 1999;121:259–62. doi:10.1115/1.2835113.
[28] Humphrey JD, O'Rourke SL. An Introduction to Biomechanics. 2nd ed. New York: Springer-Verlag; 2015.
[29] Wang Y, Zeinali-Davarani S, Zhang Y. Arterial mechanics considering the structural and mechanical contributions of ECM constituents. Journal of Biomechanics 2016;49:2358–65. doi:10.1016/j.jbiomech.2016.02.027.
[30] Ogden RW. Nonlinear Continuum Mechanics and Modeling the Elasticity of Soft Biological Tissues with a Focus on Artery Walls. Biomechanics: Trends in Modeling and Simulation, Springer, Cham; 2017, p. 83–156. doi:10.1007/978-3-319-41475-1_3.
[31] Rivlin RS. Large Elastic Deformations of Isotropic Materials. IV. Further Developments of the General Theory. Philos Trans R Soc Lond A 1948;241:379. doi:10.1098/rsta.1948.0024.
[32] Martins PALS, Natal Jorge RM, Ferreira AJM. A Comparative Study of Several Material Models for Prediction of Hyperelastic Properties: Application to Silicone-Rubber and Soft Tissues. Strain 2006;42:135–47. doi:10.1111/j.1475-1305.2006.00257.x.

[33] Ito H, Yamakoshi K, Shimazu H, Togawa T. Measurement of aortic compliance from the transthoracic admittance plethysmogram in the living dog. Medical and Biological Engineering and Computing 1977;15:618–26. doi:10.1007/BF02457919.
[34] Carew TE, Vaishnav RN, Patel DJ. Compressibility of the Arterial Wall. Circ Res 1968;23:61. doi:10.1161/01.RES.23.1.61.
[35] Lanir Y, Fung YC. Two-dimensional mechanical properties of rabbit skin—I. Experimental system. Journal of Biomechanics 1974;7:29–34. doi:10.1016/0021-9290(74)90067-0.
[36] Hayashi K. Experimental Approaches on Measuring the Mechanical Properties and Constitutive Laws of Arterial Walls. Journal of Biomechanical Engineering 1993;115:481–8. doi:10.1115/1.2895528.
[37] Karimi A, Navidbakhsh M, Alizadeh M, Shojaei A. A comparative study on the mechanical properties of the umbilical vein and umbilical artery under uniaxial loading. Artery Research 2014;8:51–6. doi:10.1016/j.artres.2014.02.001.
[38] Avanzini A, Battini D, Bagozzi L, Bisleri G. Biomechanical Evaluation of Ascending Aortic Aneurysms. BioMed Research International 2014:9. doi:10.1155/2014/820385.
[39] Khanafer K, Schlicht MS, Berguer R. How Should We Measure and Report Elasticity in Aortic Tissue? European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2013;45:332–9. doi:10.1016/j.ejvs.2012.12.015.
[40] Sacks MS, Sun W. Multiaxial Mechanical Behavior of Biological Materials. Annu Rev Biomed Eng 2003;5:251–84. doi:10.1146/annurev.bioeng.5.011303.120714.
[41] Marco Palanca, Gianluca Tozzi, Luca Cristofolini. The use of digital image correlation in the biomechanical area: a review. International Biomechanics 2016;3:1–21. doi:10.1080/23335432.2015.1117395.
[42] Sutton M, Wolters W, Peters W, Ranson W, McNeill S. Determination of displacements using an improved digital correlation method. Image and Vision Computing 1983;1:133–9. doi:10.1016/0262-8856(83)90064-1.
[43] Schreier H, Orteu J-J, Sutton MA. Image Correlation for Shape, Motion and Deformation Measurements. Boston, MA: Springer US; 2009. doi:10.1007/978-0-387-78747-3.
[44] Mazur P. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. Science 1970;168:939. doi:10.1126/science.168.3934.939.
[45] Polge C. Low-Temperature Storage of Mammalian Spermatozoa. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1957;147:498. doi:10.1098/rspb.1957.0068.
[46] Hemmasizadeh A, Darvish K, Autieri M. Characterization of Changes to the Mechanical Properties of Arteries due to Cold Storage Using Nanoindentation Tests. Annals of Biomedical Engineering 2012;40:1434–42. doi:10.1007/s10439-011-0506-z.
[47] Venkatasubramanian RT, Grassl ED, Barocas VH, Lafontaine D, Bischof JC. Effects of Freezing and Cryopreservation on the Mechanical Properties of Arteries. Annals of Biomedical Engineering 2006;34:823–32. doi:10.1007/s10439-005-9044-x.
[48] Theodoridis K, Müller J, Ramm R, Findeisen K, Andrée B, Korossis S, et al. Effects of combined cryopreservation and decellularization on the biomechanical, structural and biochemical properties of porcine pulmonary heart valves. Acta Biomaterialia 2016;43:71–7. doi:10.1016/j.actbio.2016.07.013.
[49] Adham M, Gournier J-P, Favre J-P, De La Roche E, Ducerf C, Baulieux J, et al. Mechanical Characteristics of Fresh and Frozen Human Descending Thoracic Aorta. Journal of Surgical Research 1996;64:32–4. doi:10.1006/jsre.1996.0302.

[50] Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
[51] Ravlić S, Brozović D, Kovačec A, editors. Hrvatska enciklopedija. Leksikografski zavod Miroslav Krleža; n.d.
[52] Clemente C. Gray's Anatomy of the Human Body. 30 Revised & enlarged edition. Philadelphia: Lea & Febiger; 1985.
[53] Sehgel NL, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Hong Z, Hunter WC, et al. Increased vascular smooth muscle cell stiffness: a novel mechanism for aortic stiffness in hypertension. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 2013;305:H1281–7. doi:10.1152/ajpheart.00232.2013.
[54] Frank O. The basic shape of the arterial pulse. First treatise: Mathematical analysis. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 1990;22:255–77. doi:10.1016/0022-2828(90)91460-O.
[55] Krüger T, Grigoraviciute A, Veseli K, Schibilsky D, Wendel HP, Schneider W, et al. Elastic properties of the young aorta: ex vivo perfusion experiments in a porcine model†. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 2015;48:221–7. doi:10.1093/ejcts/ezu438.
[56] Krüger T, Veseli K, Lausberg H, Vöhringer L, Schneider W, Schlensak C. Regional and directional compliance of the healthy aorta: an ex vivo study in a porcine model(). Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery 2016;23:104–11. doi:10.1093/icvts/ivw053.
[57] Schriefl AJ, Zeindlinger G, Pierce DM, Regitnig P, Holzapfel GA. Determination of the layer-specific distributed collagen fibre orientations in human thoracic and abdominal aortas and common iliac arteries. J R Soc Interface 2012;9:1275. doi:10.1098/rsif.2011.0727.
[58] Leloup AJA, Van Hove CE, Heykers A, Schrijvers DM, De Meyer GRY, Fransen P. Elastic and Muscular Arteries Differ in Structure, Basal NO Production and Voltage-Gated Ca(2+)-Channels. Frontiers in Physiology 2015;6:375. doi:10.3389/fphys.2015.00375.
[59] Gasser TC, Ogden RW, Holzapfel GA. Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. J R Soc Interface 2006;3:15. doi:10.1098/rsif.2005.0073.
[60] Schulze-Bauer CAJ, Mörth C, Holzapfel GA. Passive Biaxial Mechanical Response of Aged Human Iliac Arteries. Journal of Biomechanical Engineering 2003;125:395–406. doi:10.1115/1.1574331.
[61] Kohn JC, Lampi MC, Reinhart-King CA. Age-related vascular stiffening: causes and consequences. Frontiers in Genetics 2015;6:112. doi:10.3389/fgene.2015.00112.
[62] Wheeler JB, Mukherjee R, Stroud RE, Jones JA, Ikonomidis JS. Relation of Murine Thoracic Aortic Structural and Cellular Changes With Aging to Passive and Active Mechanical Properties. Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease 2015;4:e001744. doi:10.1161/JAHA.114.001744.
[63] Todd ME, Gowen B. Arterial wall and smooth muscle cell development in young Wistar rats and the effects of surgical denervation. Circ Res 1991;69:438. doi:10.1161/01.RES.69.2.438.
[64] Clark JM, Glagov S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. Arterioscler Thromb Vasc Bio 1985;5:19. doi:10.1161/01.ATV.5.1.19.
[65] Schulze-Bauer CAJ, Regitnig P, Holzapfel GA. Mechanics of the human femoral adventitia including the high-pressure response. American Journal of Physiology-

Heart and Circulatory Physiology 2002;282:H2427–40. doi:10.1152/ajpheart.00397.2001.
[66] Lavagnino M, Arnoczky SP, Frank K, Tian T. Collagen fibril diameter distribution does not reflect changes in the mechanical properties of in vitro stress-deprived tendons. Journal of Biomechanics 2005;38:69–75. doi:10.1016/j.jbiomech.2004.03.035.
[67] Shen ZL, Kahn H, Ballarini R, Eppell SJ. Viscoelastic Properties of Isolated Collagen Fibrils. Biophysical Journal 2011;100:3008–15. doi:10.1016/j.bpj.2011.04.052.
[68] Gautieri A, Vesentini S, Redaelli A, Ballarini R. Modeling and measuring visco-elastic properties: From collagen molecules to collagen fibrils. International Journal of Non-Linear Mechanics 2013;56:25–33. doi:10.1016/j.ijnonlinmec.2013.03.012.
[69] Lillie et. al. Mechanical properties of elastin along the thoracic aorta in the pig. Journal of Biomechanics 2007;40:2214–21. doi:doi:10.1016/j.jbiomech.2006.10.025.
[70] Sokolis DP, Boudoulas H, Karayannacos PE. Segmental differences of aortic function and composition: clinical implications. Hellenic J Cardiol 2008;49:145–54.
[71] Sokolis DP. Passive mechanical properties and structure of the aorta: segmental analysis. Acta Physiologica 2007;190:277–89. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01661.x.
[72] Kermani G, Hemmasizadeh A, Assari S, Autieri M, Darvish K. Investigation of inhomogeneous and anisotropic material behavior of porcine thoracic aorta using nano-indentation tests. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2017;69:50–6. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.12.022.
[73] P.Michael Conn. Sourcebook of Models for Biomedical Research. Humana Press; 2008.
[74] Swindle MM, Smith AC. Comparative anatomy and physiology of the pig. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 1998;25:11–21.
[75] M. M. Swindle, A. Makin, A. J. Herron, F. J. Clubb J, K. S. Frazier. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. Vet Pathol 2011;49:344–56. doi:10.1177/0300985811402846.
[76] Swindle MM, Smith AC. Swine in the Laboratory: Surgery, Anesthesia, Imaging, and Experimental Techniques. 3rd Edition. USA: CRC Press; 2016.
[77] Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. Journal of Anatomy 1998;193:105–19. doi:10.1046/j.1469-7580.1998.19310105.x.
[78] Lelovas PP, Kostomitsopoulos NG, Xanthos TT. A Comparative Anatomic and Physiologic Overview of the Porcine Heart. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS 2014;53:432–8.
[79] Gillette PC, Swindle MM, Thompson RP, Case CL. Transvenous cryoablation of the bundle of His. Pacing Clin Electrophysiol 1991;14:504–10.
[80] Smith AC, Knick B, Gillette PC, Swindle MM. A technique for conducting noninvasive cardiac electrophysiology studies in conscious swine. J Invest Surg 1997;10:25–9.
[81] Futami C, Tanuma K, Tanuma Y, Saito T. The arterial blood supply of the conducting system in normal human hearts. Surgical and Radiologic Anatomy 2003;25:42–9. doi:10.1007/s00276-002-0085-7.
[82] Xanthos T, Bassiakou E, Koudouna E, Tsirikos-Karapanos N, Lelovas P, Papadimitriou D, et al. Baseline hemodynamics in anesthetized landrace-large white swine: reference values for research in cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation models. J Am Assoc Lab Anim Sci 2007;46:21–5.

[83] Xanthos T, Lelovas P, Vlachos I, Tsirikos-Karapanos N, Kouskouni E, Perrea D, et al. Cardiopulmonary arrest and resuscitation in Landrace/Large White swine: a research model. Lab Anim 2007;41:353–62. doi:10.1258/002367707781282820.
[84] Thein E, Hammer C. Physiologic barriers to xenotransplantation. Current Opinion in Organ Transplantation 2004;9.
[85] Cooper DKC, Ye Y, Rolf LL, Zuhdi N. The Pig as Potential Organ Donor for Man. In: Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG, editors. Xenotransplantation: The Transplantation of Organs and Tissues Between Species, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1991, p. 481–500. doi:10.1007/978-3-642-97323-9_30.
[86] Cao Q, Tao L, Liu M, Yin M, Sun K. The effect of vacuum freeze-drying and radiation on allogeneic aorta grafts. Molecular Medicine Reports 2013;7:144–8.
[87] Grant RA. Content and distribution of aortic collagen, elastin and carbohydrate in different species. Journal of Atherosclerosis Research 1967;7:463–72. doi:10.1016/S0368-1319(67)80024-3.
[88] Sokolis DP, Boudoulas H, Kavantzas NG, Kostomitsopoulos N, Agapitos EV, Karayannacos PE. A Morphometric Study of the Structural Characteristics of the Aorta in Pigs Using an Image Analysis Method. Anatomia, Histologia, Embryologia 2002;31:21–30. doi:10.1046/j.1439-0264.2002.00356.x.
[89] Karimi A, Milewicz DM. Structure of the Elastin-Contractile Units in the Thoracic Aorta and How Genes That Cause Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections Disrupt This Structure. Canadian Journal of Cardiology 2016;32:26–34. doi:10.1016/j.cjca.2015.11.004.
[90] Tsamis A, Krawiec JT, Vorp DA. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. Journal of the Royal Society Interface 2013;10:20121004. doi:10.1098/rsif.2012.1004.
[91] Masateru Takigawa, Tsuyoshi Yoshimuta, Koichi Akutsu, Satoshi Takeshita, Naoyuki Yokoyama. Prevalence and Predictors of Coexistent Silent Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Patients With Abdominal Aortic Aneurysm Without Previous Symptomatic Cardiovascular Diseases. Angiology 2011;63:380–5. doi:10.1177/0003319711419359.
[92] Sekikawa A, Shin C, Curb JD, Barinas-Mitchell E, Masaki K, El-Saed A, et al. Aortic stiffness and calcification in men in a population-based international study. Atherosclerosis 2012;222:473–7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.027.
[93] Swindle MM, Smith AC, Laber-Laird K, Dungan L. Swine in Biomedical Research: Management and Models. ILAR Journal 1994;36:1–5. doi:10.1093/ilar.36.1.1.
[94] Cooper DKC. A brief history of cross-species organ transplantation. Proceedings (Baylor University Medical Center) 2012;25:49–57.
[95] Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG. Xenotransplantation: The Transplantation of Organs and Tissues Between Species. Berlin: Springer; 2012.
[96] Cooper DKC, Gollackner B, Sachs DH. Will the Pig Solve the Transplantation Backlog? Annu Rev Med 2002;53:133–47. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103900.
[97] Denner J. Xenotransplantation-Progress and Problems: A Review. Journal of Transplantation Technologies & Research 2014. doi:10.4172/2161-0991.1000133.
[98] Yoriyasu Suzuki, Alan C. Yeung, Fumiaki Ikeno. The Representative Porcine Model for Human Cardiovascular Disease. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011;2011. doi:10.1155/2011/195483.

[99] Niels Christian Ganderup, Warren Harvey, Jens Thing Mortensen, Wafa Harrouk. The Minipig as Nonrodent Species in Toxicology—Where Are We Now? Int J Toxicol 2012;31:507–28. doi:10.1177/1091581812462039.
[100] Fox KM, Wang L, Gandra SR, Quek RGW, Li L, Baser O. Clinical and economic burden associated with cardiovascular events among patients with hyperlipidemia: a retrospective cohort study. BMC Cardiovascular Disorders 2016;16:13. doi:10.1186/s12872-016-0190-x.
[101] Ohsfeldt RL, Gandhi SK, Fox KM, Bullano MF, Davidson M. Medical and cost burden of atherosclerosis among patients treated in routine clinical practice. Journal of Medical Economics 2010;13:500–7. doi:10.3111/13696998.2010.506348.
[102] Kralj V, Sekulić K, Šekerija M. Kardiovaskularne bolesti u Republici Hrvatskoj. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2013.
[103] Gijsen et. al. Mechanical properties of human atherosclerotic intima tissue. Journal of Biomechanics 2014;47:773–83. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.01.019.
[104] Teng et. al. Material properties of components in human carotid atherosclerotic plaques - A uniaxial extension study. Acta Biomaterialia 2014;10:5055–63. doi:doi:10.1016/j.actbio.2014.09.001.
[105] Walsh et. al. Uniaxial tensile testing approaches for characterisation of atherosclerotic plaques. Journal of Biomechanics 2014;47:793–804. doi:10.1016/j.jbiomech.2014.01.017.
[106] Bosch JL, Lester JS, McMahon PM, Beinfeld MT, Halpern EF, Kaufman JA, et al. Hospital Costs for Elective Endovascular and Surgical Repairs of Infrarenal Abdominal Aortic Aneurysms. Radiology 2001;220:492–7. doi:10.1148/radiology.220.2.r01au29492.
[107] Vande Geest JP, Sacks MS, Vorp DA. The effects of aneurysm on the biaxial mechanical behavior of human abdominal aorta. Journal of Biomechanics 2006;39:1324–34. doi:10.1016/j.jbiomech.2005.03.003.
[108] Riber SS, Ali M, Bergseth SH, Stubbe J, Stenger M, Behr-Rasmussen C, et al. Induction of autoimmune abdominal aortic aneurysm in pigs - A novel large animal model. Annals of Medicine and Surgery 2017;20:26–31. doi:10.1016/j.amsu.2017.06.017.
[109] Kloster BO, Lund L, Lindholt JS. Induction of continuous expanding infrarenal aortic aneurysms in a large porcine animal model. Annals of Medicine and Surgery 2015;4:30–5. doi:10.1016/j.amsu.2014.10.001.
[110] Lin P-Y, Wu Y-T, Lin G-C, Shih YH, Sampilvanjil A, Chen L-R, et al. Coarctation-induced degenerative abdominal aortic aneurysm in a porcine model. Journal of Vascular Surgery 2013;57:806-815.e1. doi:10.1016/j.jvs.2012.08.104.
[111] Suk P, Cundrle I, Hruda J, Vocilková L, Konecny Z, Vlasin M, et al. Porcine Model of Ruptured Abdominal Aortic Aneurysm Repair. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2012;43:698–704. doi:10.1016/j.ejvs.2012.02.020.
[112] Harlander-Locke MP, Harmon LK, Lawrence PF, Oderich GS, McCready RA, Morasch MD, et al. The use of cryopreserved aortoiliac allograft for aortic reconstruction in the United States. Journal of Vascular Surgery 2014;59:669-674.e1. doi:10.1016/j.jvs.2013.09.009.
[113] Heo S-H, Kim Y-W, Woo S-Y, Park Y-J, Kim D-K, Chung D-R. Recent Results of In Situ Abdominal Aortic Reconstruction with Cryopreserved Arterial Allograft.

European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2017;53:158–67. doi:10.1016/j.ejvs.2016.07.090.

[114] Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. Cardiovascular Research 1998;39:121–35. doi:10.1016/S0008-6363(98)00069-8.

[115] Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. The Lancet 2016;388:1545–602. doi:10.1016/S0140-6736(16)31678-6.

[116] Caro CG. The Mechanics of the Circulation. Cambridge University Press; 2012.

[117] Ioannou CV, Stergiopulos N, Katsamouris AN, Startchik I, Kalangos A, Licker MJ, et al. Hemodynamics induced after acute reduction of proximal thoracic aorta compliance. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2003;26:195–204. doi:10.1053/ejvs.2002.1917.

[118] Kidson IG. The effect of wall mechanical properties on patency of arterial grafts. Ann R Coll Surg Engl 1983;65:24–9.

[119] Taniguchi T, Nakamura T, Sawada T. Arterial stiffness, endothelial dysfunction and recurrent angina post-chemotherapy. QJM: An International Journal of Medicine 2015;108:653–5. doi:10.1093/qjmed/hcu184.

[120] Simon-Kupilik N, Schima H, Huber L, Moidl R, Wipplinger G, Losert U, et al. Prosthetic replacement of the aorta is a risk factor for aortic root aneurysm development. The Annals of Thoracic Surgery 2002;73:455–9. doi:10.1016/S0003-4975(01)03423-3.

[121] Ghista DN, Kabinejadian F. Coronary artery bypass grafting hemodynamics and anastomosis design: a biomedical engineering review. BioMedical Engineering OnLine 2013;12:129. doi:10.1186/1475-925X-12-129.

[122] Sonoda H, Urayama S-I, Takamizawa K, Nakayama Y, Uyama C, Yasui H, et al. Compliant design of artificial graft: compliance determination by new digital X-ray imaging system-based method. J Biomed Mater Res 2002;60:191–5.

[123] Sottiurai VS, Kollros P, Glagov S, Zarins CK, Mathews MB. Morphologic alteration of cultured arterial smooth muscle cells by cyclic stretching. J Surg Res 1983;35:490–7.

[124] Vyalov S, Langille BL, Gotlieb AI. Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo. Am J Pathol 1996;149:2107–18.

[125] Vardoulis O, Coppens E, Martin B, Reymond P, Tozzi P, Stergiopulos N. Impact of Aortic Grafts on Arterial Pressure: A Computational Fluid Dynamics Study. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2011;42:704–10. doi:10.1016/j.ejvs.2011.08.006.

[126] Yildiz A, Gur M, Yilmaz R, Demirbag R. The association of elasticity indexes of ascending aorta and the presence and the severity of coronary artery disease. Coron Artery Dis 2008;19:311–7. doi:10.1097/MCA.0b013e3283004290.

[127] Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. J Vasc Surg 1987;5:376–82.

[128] Masson I, Fialaire-Legendre A, Godin C, Boutouyrie P, Bierling P, Zidi M. Mechanical properties of arteries cryopreserved at −80°C and −150°C. Medical Engineering & Physics 2009;31:825–32. doi:10.1016/j.medengphy.2009.03.009.

[129] Pukacki F, Jankowski T, Gabriel M, Oszkinis G, Krasinski Z, Zapalski S. The Mechanical Properties of Fresh and Cryopreserved Arterial Homografts. European

Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2000;20:21–4. doi:10.1053/ejvs.2000.1120.

[130] J. Virues Delgadillo, S. Delorme, R. El-Ayoubi, R. DiRaddo, S. Hatzikiriakos. Effect of freezing on the passive mechanical properties of arterial samples. Journal of Biomedical Science and Engineering 2010;3:645–52.

[131] Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen S. Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. Biol Reprod 1998;59:395–400.

[132] Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochimica et Biophysica Acta 1953;10:414–26. doi:10.1016/0006-3002(53)90273-X.

[133] Bisdas T, Bredt M, Pichlmaier M, Aper T, Wilhelmi M, Bisdas S, et al. Eight-year experience with cryopreserved arterial homografts for the in situ reconstruction of abdominal aortic infections. Journal of Vascular Surgery 2010;52:323–30. doi:10.1016/j.jvs.2010.02.277.

[134] Jimenez Rios JL, Rabin Y. Thermal expansion of blood vessels in low cryogenic temperatures Part I: A new experimental device. Cryobiology 2006;52:269–83. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.12.005.

[135] Minga Lowampa E, Holemans C, Stiennon L, Van Damme H, Defraigne JO. Late Fate of Cryopreserved Arterial Allografts. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2016;52:696–702. doi:10.1016/j.ejvs.2016.08.005.

[136] Y.A. Goffin, D. Grandmougin, G. Wozniak, V. Keppenne, A. Nevelsteen, P. Vogt, et al. Banking and Distribution of Large Cryopreserved Arterial Homografts in Brussels: Assessment of 4 Years of Activity by the European Homograft Bank (EHB) with Reference to Implantation Results in Reconstruction of Infected Infrarenal Arterial Prostheses and Mycotic Aneurysms. Vascular Surgery 1998;32:19–32. doi:10.1177/153857449803200104.

[137] Langerak SE, Groenink M, van der Wall EE, Wassenaar C, Vanbavel E, Spaan JAE, et al. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. Transplant International 2001;14:248–55. doi:10.1111/j.1432-2277.2001.tb00053.x.

[138] G.A. Holzapfel, R.W. Ogden. Biomechanics of Soft Tissue in Cardiovascular Systems. Wien, Austria: Springer; 2003.

[139] Bell V, Mitchell WA, Sigurðsson S, Westenberg JJM, Gotal JD, Torjesen AA, et al. Longitudinal and Circumferential Strain of the Proximal Aorta. Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease 2014;3:e001536. doi:10.1161/JAHA.114.001536.

[140] Morrison TM, Choi G, Zarins CK, Taylor CA. Circumferential and Longitudinal Cyclic Strain of The Human Thoracic Aorta: Age-Related Changes. Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter 2009;49:1029–36. doi:10.1016/j.jvs.2008.11.056.

[141] Lillie MA, Shadwick RE, Gosline JM. Mechanical anisotropy of inflated elastic tissue from the pig aorta. Journal of Biomechanics 2010;43:2070–8. doi:10.1016/j.jbiomech.2010.04.014.

[142] Holzapfel GA, Sommer G, Auer M, Regitnig P, Ogden RW. Layer-Specific 3D Residual Deformations of Human Aortas with Non-Atherosclerotic Intimal Thickening. Annals of Biomedical Engineering 2007;35:530–45. doi:10.1007/s10439-006-9252-z.

[143] Kulkarni et. al. A transversely isotropic visco-hyperelastic constitutive model for soft tissues. Mathematics and Mechanics of Solids 2014:1–24. doi:10.1177/1081286514536921.
[144] Anssari-Benam A, Bucchi A, Screen HRC, Evans SL. A transverse isotropic viscoelastic constitutive model for aortic valve tissue. Royal Society Open Science 2017;4:160585. doi:10.1098/rsos.160585.
[145] Stella JA, Liao J, Sacks MS. Time-dependent biaxial mechanical behavior of the aortic heart valve leaflet. Journal of Biomechanics 2007;40:3169–77. doi:10.1016/j.jbiomech.2007.04.001.
[146] Holzapfel GA. Biomechanics of Soft Tissue. In: Lemaitre J, editor. Handbook of Material Behavior, London: Academic Press; 2001.
[147] Karšaj I. Numeričko modeliranje procesa deformiranja uz pretpostavku velikih deformacija. Doktorski rad. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu, 2006.
[148] Abaqus 6.14 Online Documentation 2014.
[149] Yeoh OH. Some Forms of the Strain Energy Function for Rubber. Rubber Chemistry and Technology 1993;66:754–71. doi:10.5254/1.3538343.
[150] Renaud C, Cros J-M, Feng Z-Q, Yang B. The Yeoh model applied to the modeling of large deformation contact/impact problems. International Journal of Impact Engineering 2009;36:659–66. doi:10.1016/j.ijimpeng.2008.09.008.
[151] Ogden RW. Non-linear Elastic Deformations. Courier Corporation; 1997.
[152] Holzapfel GA. Nonlinear Solid Mechanics: A Continuum Approach for Engineering. New York: John Wiley and Sons; 2000.
[153] Drucker DC. A definition of a stable inelastic material. ASME Journal of Applied Mechanics 1959;26:101–95.
[154] Hill R. A general theory of uniqueness and stability in elastic-plastic solids. Journal of the Mechanics and Physics of Solids 1958;6:236–49. doi:10.1016/0022-5096(58)90029-2.
[155] Stemper et. al. Mechanics of Fresh, Refrigerated, and Frozen Arterial Tissue. Journal of Surgical Research 2007;139:236–42. doi:doi:10.1016/j.jss.2006.09.001.
[156] Chow M-J, Zhang Y. Changes in the Mechanical and Biochemical Properties of Aortic Tissue due to Cold Storage. Journal of Surgical Research 2011;171:434–42. doi:10.1016/j.jss.2010.04.007.
[157] Pamuković F. Primjena optičkog sustava Aramis za određivanje stabilnosti vanjskog fiksatora. Diplomski rad. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
[158] Aramis User Information 2009.
[159] Hild F, Roux S. Digital Image Correlation: from Displacement Measurement to Identification of Elastic Properties – a Review. Strain 2006;42:69–80. doi:10.1111/j.1475-1305.2006.00258.x.
[160] Drvar N. Optički postupak digitalizacije oblika projiciranjem kodiranog svjetla. Doktorski rad. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu, 2007.
[161] Hassan GM, MacNish C, Dyskin A, Shufrin I. Digital Image Correlation with Dynamic Subset Selection. Optics and Lasers in Engineering 2016;84:1–9. doi:10.1016/j.optlaseng.2016.03.013.
[162] Pegg DE. Principles of Cryopreservation. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Humana Press; 2007, p. 39–57. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_3.
[163] Thompson M, Nemits M, Ehrhardt R. Rate-controlled Cryopreservation and Thawing of Mammalian Cells 2011.

[164] Barać Z, Mahnet Ž, Klišanić V, Lubina Malus N, Prpić V, Uzelac M, et al. Postupci i upute za označavanje, kontrolu proizvodnih svojstava i procjenu uzgojnih vrijednosti u svinjogojstvu. Križevci: Hrvatska poljoprivredna agencija; 2014.