



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Mārtiņš Kalējs

**OPTIMĀLI SIRDS VĀRSTUĻU
STRUKTŪRKOMPONENTU
MEHĀNISKIE PARAMETRI
UN ATBILSTOŠA
AIZVIETOTĀJMATERIĀLA
IZVĒLE**

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – medicīniskā biomehānika, sirds ķirurģija

Darba zinātniskais vadītājs:
Dr. med. asociētais profesors **Pēteris Stradiņš**

Rīga, 2014

ANOTĀCIJA

Ievads

Pēc aptuvenām aplēsēm vidēji 2,5% no vispārējās populācijas slimo ar sirds vārstuļu kaitēm. Ja bojāto vārstuli nav iespējams ķirurģiski salabot, tas ir jāprotezē. Sirds vārstuļu protēzes var iedalīt divās lielās grupās: kuras pilnībā vai daļēji ir izgatavotas izmantojot bioloģiskos materiālus – bioprotēzes un tādas kuras izgatavotas no polimēriem, metāla, keramikas – mehāniskās protēzes. Katru gadu kopā pasaulē tiek implantēts vairāk nekā 275 000 sirds vārstuļu protēžu, no kurām vairāk kā puse ir bioprotēzes. Bioprotēžu pielietojumam ir tendence pieaugt. Visbiežāk izmantotās bioprotēzes ir izgatavotas no ķīmiski apstrādātām cūkas aortas vārstuļu lapiņām vai no liellopu perikarda iestiprināta fiksējošā karkasā. Šāda tipa bioprotēzes ir pazīstamas jau kopš 1970-tajiem gadiem un tiek lietotas klīniskajā praksē jau ilgstoši ar apmierinošiem rezultātiem. Diemžēl visu bioprotēžu lielākais trūkums ir to ierobežotā ilgmūžība – 10 gadus pēc implantācijas 50–60% bioprotēžu skar pakāpeniska struktūras degradācija, kam pamatā ir kalcificējoša un nekalcificējoša audu deģenerācija, izraisot protēzes disfunkciju.

Lai izmantotu bioprotēžu izgatavošanai, bioloģiskie audi tiek apstrādāti – fiksēti ar glutāraldehīdu. Šāda apstrāde iznīcina olbaltumvielu antigēno struktūru, kā arī veido šķērssaites kolagēna molekulu ietvaros un starp kolagēna šķiedrām. Apstrāde ar glutāraldehīdu izmaina arī bioloģisko audu mehāniskās īpašības, padarot tos stingrākus, mehāniski izturīgākus un mazāk deformējamus. Sekojoši izmainās arī sprieguma sadalījums tajos, kas, savukārt, var kalpot kā papildus veicinošs faktors mehāniskam bojājumam un kalcinozei.

Vēl vairāk sprieguma sadalījumu vārstuļa lapiņās ietekmē to fiksējošā aparāta rigiditāte. Rīgīds fiksējošais karkass palielina mehānisko slodzi vārstuļa lapiņām, īpaši komisūru reģionam, ar kuru lapiņas ir pie tā fiksētas.

Pētījuma mērķis

Balstoties uz natīva cūkas aortas vārstuļa un bioprotēžu biomehānisko īpašību pētījumiem, noteikt optimālus aortas vārstuļa protēzes lapiņu un to fiksējošo karkasu mehāniskos parametrus jaunu bioprotēžu izgatavošanai.

Pētījuma papildus mērķis

Piemeklēt optimālu polimēru nanošķiedru materiālu, kuru izmantot kā matrici sirds aortas vārstuļa protēžu lapiņu iegūšanai audu inženierijas ceļā, kura mehāniskās īpašības visvairāk atbilst natīvajām aortas vārstuļa lapiņām.

Pētījums tematiski sadalīts trīs daļās:

- I. Aortas vārstuļa un bioprotēžu lapiņu mehānisko īpašību pētījumi;
- II. Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehānisko īpašību pētījumi;
- III. Polimēru nanošķiedru materiāla izmantošanas iespēju izvērtēšana vārstuļu lapiņu audu inženierijas mērķiem.

Materiāls un metodes

Aortas vārstuļa un bioprotēžu lapiņu mehānisko īpašību pētījumi tika veikti ar vienass noslogojuma standarta *Zwick/Roell BDO-FB0.5TS*. Tika pārbaudītas mehāniskās īpašības 10 natīvu aortas vārstuļu lapiņām un 4 komerciāli pieejamām bioprotēzēm *Medtronic Hancock II*, *Medtronic Freestyle*, *Sorin Soprano* un *StJude Epic* pa 3 no katra modeļa. No šīm bioprotēzēm *Sorin Soprano* vienīgā bija ksenoperikardiāla, kamēr pārējās bija ksenoaortālas. Mehāniskās īpašības tika pārbaudītas radiālā un garenvirzienā.

Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehānisko īpašību pētījumi tika veikti ar 3 natīvām aortas saknēm un 6 bioprotēzēm: *St. Jude Epic*, *Medtronic Hancock II*, *Sorin Soprano*, *ATS 3F Enable*, *Medtronic Intact* un *Carpentier-Edwards Standard*. *Medtronic Intact* un *Carpentier-Edwards Standard* līdz pārbaudes brīdim tika uzglabātas neaiztiktas to oriģinālajā iepakojumā attiecīgi kopš 1988. un 1987. gada. Pārbaude tika veikta pie 3 dažādiem transvalvulārā spiediena gradientiem pseidostatiska spiediena sistēmā, izmantojot 3 sonomikrometriju zondes, kas tika fiksētas komisūru piestiprināšanas vietās. Tika izvērtēta radiālā deformācija – kā rādiusa izmaiņas pārejot no sirds cikla diastolei atbilstošā spiediena uz sistolei atbilstošu.

Polimēru nanošķiedru materiāla izmantošanas iespēju izvērtēšanai pēc pasūtījuma Čehijas kompānijā *Elmarco* ar elektroverpšanas metodi tika radīti 8 nanošķiedru materiāli no poliuretāna, polikaprolaktona, polilaktāta un želatīna dažādos laukuma blīvuma variantos. Šo materiālu mehāniskās īpašības pirms un pēc kultivācijas *in vitro* ar COS-7 šūnām tika salīdzinātas ar natīvajiem vārstuļu audiem un bioprotēžu materiāliem. Tika izvērtēta arī šo nanošķiedru materiālu biosaderība ar COS-7 šūnām,

nosakot dzīvo COS-7 šūnu proporciju ar akridīna oranžā un etīdija bromīda krāsošanas metodi pēc 6 nedēļu kultivēšanas.

Rezultāti

Visām pārbaudītajām bioprotēzēm piemīt natīvajiem vārstuļu audiem līdzīga nelineāra sprieguma – deformācijas attiecība un materiāla anizotropija. Epic un Hancock II bioprotēzes ir ievērojami mehāniski izturīgākas par natīvajiem audiem un ir salīdzinoši rigīdākas. Soprano bioprotēzei ir mazāk izteikta materiāla anizotropija, un šis vārstulis ir visrigīdākais. Elastības moduļa vērtības pārbaudītajām bioprotēzēm ir robežās no 9,0 līdz 29,5 MPa garenvirzienā un no 0,8 līdz 15,8 MPa radiāli, kas ievērojami atšķiras no natīvā vārstuļa, kura elastības vērtības ir attiecīgi 9,7 un 1,0 MPa.

Bioprotēžu fiksējošā karkasa deformējamība variē no 1,2% modernajām ksenoaortālajām un 3,0% ksenoperikardiālajām bioprotēzēm līdz pat 8,7% agrāk ražotajām bioprotēzēm. Natīvās aortas saknes deformējamība ir 7,1%.

No pārbaudītajiem nanošķiedru materiāliem radiālajam aortas vārstuļa lapiņu virzienam vislabāk pēc mehāniskajām īpašībām atbilda želatīns un garenvirzienam – poliuretāns. Dzīvo šūnu proporcija pēc 6 nedēļu kultivēšanas ar COS-7 šūnām sastādīja: PUR – $90,2 \pm 7,9\%$; PCL – $92,6 \pm 5,4\%$; želatīns – $88,1 \pm 5,7\%$. Pēc 6 nedēļu kultivēšanas ievērojamas mehānisko īpašību izmaiņas vērojamas želatīna materiālam, kas nezaudēja savu izturību, taču kļuva deformējamāks. Poliuretāna materiālam netika novērotas nozīmīgas izmaiņas mehāniskajās īpašībās. Polikaprolaktons zaudēja ~ 25% mehāniskās izturības.

Secinājumi

1. Sirds aortas vārstuļa bioprotēžu lapiņu mehāniskās īpašības nozīmīgi atšķiras no natīvajiem cūkas aortas vārstuļa lapiņu audiem. To mehāniskās īpašības ir dažādas, ko nosaka to dažādie fiksācijas apstākļi un izmantotais biomateriāls.
2. Visām pārbaudītajām bioprotēzēm piemīt natīvajiem vārstuļu audiem līdzīga nelineāra sprieguma – deformācijas attiecība un anizotropija.
3. Pārbaudītās agrīnās paaudzes bioprotēzes ir ar padevīgākiem fiksējošajiem karkasiem salīdzinājumā ar modernajām protēzēm.
4. Minimālās bioprotēžu fiksējošā karkasa deformējamības vērtības ir 1,2% ksenoaortālajām un 3,0% ksenoperikardiālajām bioprotēzēm.

5. No nanošķiedru materiāliem pēc mehāniskajām īpašībām vislabāk radiālajam aortas vārstuļa lapiņu virzienam atbilst želatīns un garenvirzienam – poliuretāns. Lai visprecīzāk modelētu natīvo vārstuļu lapiņu mehāniskās īpašības, ieteicams kombinēts materiāls ar savstarpēji perpendikulāri izvietotām želatīna un poliuretāna šķiedrām.
6. Ilgstošā kultūrā ar COS-7 šūnām tika pierādīta pārbaudīto polimēru nanošķiedru materiālu biosaderība.
7. Pārbaudītie materiāli ir pielietojami sirds vārstuļu lapiņu audu inženierijas nolūkiem, pateicoties to biosaderībai un pietiekami lēnajai biodegradācijai.

SUMMARY

Introduction

An estimated 2.5% of the general population suffer from heart valve diseases. If the diseased valve can not be repaired, it has to be replaced with a prosthesis. Heart valve prostheses can be divided in two major groups: bioprostheses – valves made exclusively or partially from biological tissue and mechanical prostheses made from metalloceramics and polymer materials. Each year more than 275 000 valve prostheses are implanted worldwide, more than half is bioprostheses. The application of bioprostheses has a continuous tendency to grow. Most commonly used bioprostheses are made either from chemically treated porcine aortic valves or bovine pericardium fixed in a supportive stent. This type of bioprostheses is known already from the 1970s and has been used in clinics for a long time with good results. Unfortunately the most important drawback of all bioprostheses is their limited longevity – within 10 years after implantation 50–60% of patients suffer from prosthesis dysfunction due to gradual structural degradation of bioprosthetic valves caused by calcifying and non-calcifying degeneration.

In order to be used in bioprostheses, biological tissue is fixed with glutaraldehyde. This treatment destroys the antigenic structure of proteins as well as forms crosslinks among collagen molecules. Treatment with glutaraldehyde also modifies the mechanical properties of biological tissue, making it more rigid, mechanically stronger and less deformable. Subsequently these changes also affect stress distribution within the valve leaflets, which can serve as an additional factor for mechanical damage and calcinosis.

Leaflet stress distribution is even more influenced by the mechanical properties of the bioprosthetic valve stents. A rigid stent increases stress to the valve leaflets, especially to the commissure region where the leaflets is fixed to stent.

Goal of the study

To determine the optimal mechanical parameters of heart valve leaflets and their fixative stents based on the studies of mechanical properties of native porcine aortic valves, native aortic roots and various bioprostheses.

Additional goal

To find an optimal polymer nanofiber material to be used as a matrix for heart valve tissue engineering, which would mimic the mechanical properties of a native valve as close as possible.

The study can be thematically divided into three parts:

- Mechanical studies of aortic valve and bioprosthetic valve leaflets;
- Mechanical studies of fixative stents and the native aortic root;
- Assessment of application potential of polymeric nanofiber materials as a matrix for valve tissue engineering.

Material and methods

The mechanical testing of native aortic valve and bioprosthetic valve leaflets was done using universal uniaxial testing machine Zwick/Roell BDO-FB0.5TS. Samples were deformed with the speed of 5 mm/min until tissue rupture. Ten native porcine aortic valves and 4 different commercial bioprostheses – 3 from each: Medtronic Hancock II, Medtronic Freestyle, Sorin Soprano and StJude Epic were tested both in circumferential and radial directions. Sorin Soprano being xenopericardial while other three xenoaortic.

Three native porcine aortic roots and 6 bioprostheses: St. Jude Epic, Medtronic HancockII, Sorin Soprano, ATS 3F Enable, Medtronic Intact and Carpentier-Edwards Standard were used for radial deformability testing of stents and aortic roots. Medtronic Intact and Carpentier-Edwards Standard were tested after being stored untouched in original packaging from their production in 1988 and 1987 respectively. The tests were performed in a pseudostatic test system at 3 different transvalvular pressure gradients using 3 sonomicrometry probes per sample fixed at the commissural attachment points. Radial deformation was assessed as changes in radius values during the transition from a pressure corresponding to diastole to systole.

To assess the applicability of polymer nanofiber materials, 8 samples from polyurethane, polylactic acid, polycaprolactone and gelatin were custom made using electrospinning technique by a Czech company Elmarco in several area density variants. The mechanical properties of these materials before and after 6 weeks cultivation with COS-7 cells were compared with those of the native valves and bioprostheses. Biocompatibility of these materials with COS-7 cells was assessed by evaluating the proportion of life cells after 6 weeks of culture using ethidium bromide/ acridine orange staining.

Results

All of the tested bioprostheses show a non-linear stress-strain response and material anisotropy similar to native valve tissue. Modulus of elasticity for the tested bioprostheses is between 9.0 and 29.5 MPa in circumferential direction and 0.8 to 15.8 MPa in radial direction, which differs significantly from the native porcine aortic valve with a modulus of 9.7 and 1.0 MPa respectively.

The deformability of the bioprostheses varies from 1.2% for modern xenoaortic and 3.0% for modern xenopericardial prostheses up to 8.7% for the older bioprostheses. The deformability of the native aortic root is 7.1%.

From the tested nanomaterials the one most similar to native tissue in radial direction was gelatin and in circumferential direction – polyurethane. Proportion of living cells after 6 weeks in culture was PUR – $90.2\% \pm 7.9\%$; PCL – $92.6 \pm 5.4\%$; gelatin – $88.1 \pm 5.7\%$. After 6 weeks in culture with COS-7 cells there were significant changes in the mechanical properties of material made from gelatin, which didn't lose its mechanical strength but became even more deformable. Polyurethane didn't experience any significant changes. Polycaprolactate lost $\sim 25\%$ of its mechanical strength.

Conclusions

1. Mechanical properties of the leaflets of aortic valve bioprostheses differ significantly from native porcine aortic valve leaflets. Their mechanical properties are different in accordance with their different treatment, treatment conditions and biomaterial used.
2. All tested bioprostheses have a non-linear stress-strain relationship and anisotropy similar to the native valve tissue.
3. The tested older bioprostheses have more pliable stents when compared to the modern bioprostheses.
4. The minimal deformability of a bioprosthetic valve carcass is 1.2% for a xenoaortic and 3.0% for a xenopericardial prosthesis.
5. Gelatin is best to mimic radial direction and polyurethane – circumferential direction of native valve tissue. To model the mechanical properties of native valve tissue as precise as possible, a material made from both polyurethane and gelatin with their fibers predominantly orientated in a perpendicular fashion is suggested.

6. The tested nanofiber materials were proven to be biocompatible in a prolonged culture with COS-7 cells.
7. The tested nanofiber materials can be used in heart valve tissue engineering because of their biocompatibility and slow biodegradation.

SATURS

1. Ievads. Problēmas nostādne	13
1.1. Pētījuma novitāte	15
1.2. Pētījuma praktiskais pielietojums	15
2. Darba mērķis un uzdevumi. Aizstāvēšanai izvirzītās hipotēzes	16
3. Literatūras apskats	18
3.1. Sirds un sirds vārstuļu anatomija un fizioloģija	18
3.2. Aortas vārstuļa viru slāņu uzbūve un ultrastruktūra	24
3.3. Aortas vārstuļa mehāniskās īpašības	28
3.4. Aortas vārstuļa patoloģija	29
3.4.1. Klīniskais aortas stenozes nozīmīgums	31
3.5. Sirds vārstuļu kaišu terapija	31
3.5.1. Ārstēšanas modalitātes – pieejamās protēzes	33
3.5.2. Mehāniskās sirds vārstuļu protēzes	34
3.5.3. Bioloģiskās sirds vārstuļu protēzes	36
3.5.4. Bioprotēžu deģenerācijas mehānismi	38
3.5.5. Bioprotēžu fiksējošo karkasu mehāniskās īpašības	40
3.5.6. Alternatīvas protezēšanas iespējas – audu inženierija	41
3.5.7. Matrices sirds vārstuļu audu inženierijai	43
3.5.8. Sirds vārstuļu protēzes no polimēru materiāliem	45
4. Materiāls un metodes	47
4.1. Aortas vārstuļa un bioprotēžu lapiņu mehānisko īpašību noteikšana	47
4.1.1. Natīvie cūkas aortas vārstuļi	47
4.1.2. Pētījumā izmantotās aortas vārstuļa bioprotēzes	49
4.2. Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehānisko īpašību noteikšana	51
4.3. Polimēru nanošķiedru materiāla izmantošanas iespēju izvērtēšana vārstuļu lapiņu audu inženierijas mērķiem	55
4.3.1. Nanošķiedru materiāli iegūti elektrovērpšanas ceļā	55
4.3.2. Sintētiskā un bioloģiskā materiāla mehānisko īpašību pētījumi vienass noslogojuma stendā	59
4.3.3. Šūnu kultūra uz polimēru nanošķiedru materiāla	61
4.4. Datu analīze	62

5. Rezultāti	63
5.1. Aortas vārstuļa un bioprotēžu lapiņu mehānisko īpašību noteikšana.....	63
5.1.1. Natīvo cūkas aortas vārstuļa lapiņu mehāniskās īpašības.....	63
5.1.2. Dažādu aortas vārstuļa bioprotēžu lapiņu mehāniskās īpašības	64
5.2. Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehānisko īpašību noteikšana.....	68
5.3. Polimēru nanošķiedru materiālu izmantošanas iespēju izvērtēšana vārstuļa lapiņu audu inženierijas mērķiem.....	70
5.3.1. Nanomateriālu mehāniskās īpašības salīdzinājumā ar natīvo cūkas aortas vārstuli pirms un pēc 6 nedēļu <i>in vitro</i> kultivēšanas ar fibroblastu šūnām.....	70
5.3.2. Nanomateriālu biosaderība ar COS-7 šūnām <i>in vitro</i>	72
5.3.3. Nanomateriālu mehāniskās īpašības pēc 6 nedēļu <i>in vitro</i> kultivēšanas ar fibroblastu šūnām	73
6. Diskusija	76
6.1. Lapiņu mehānisko īpašību nozīmīgums vārstuļa protēžu ilgmūžībai	76
6.2. Nanomateriālu atbilstība vārstuļa mehāniskajām īpašībām.....	78
6.3. Bioprotēžu stentu mehānisko īpašību potenciālais nozīmīgums vārstuļa protēžu ilgmūžībai	79
6.4. Pētījuma trūkumi un ierobežojumi	80
7. Secinājumi	82
8. Praktiskās rekomendācijas	83
9. Perspektīvie turpmāko pētījumu virzieni	85
10. Literatūras saraksts	86
11. Zinātniskās publikācijas.....	103
12. Ziņojumi par darba rezultātiem.....	105
13. Pielikumi.....	109
13.1. Protokols COS-7 šūnu kultivēšanai uz nanošķiedru materiāliem	109
13.2. Protokols šūnu vitalitātes novērtēšanai fluorescences mikroskopā pēc kultivēšanas uz nanošķiedru materiāliem.....	111
13.3. Ētikas komitejas atļauja.....	113
14. Pateicības	114

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

AS – aortas vārstuļa stenoze

COS-7 – šūnu līnija, kas sākotnēji iegūta no Āfrikas zaļā pērtiķa nieru fibroblastu šūnu līnijas (ATCC 1651 CRL)

DMEM – „Dulbecco's modified Eagle's medium”, vide šūnu kultivēšanai, kura piemērota ļoti dažādu šūnu kultivēšanai, ieskaitot cilvēka, pērtiķu, žurku u.c.

E – elastības modulis

ECM – ekstracelulārā matrice

FITC – fluoresceīna izotiocianāts, fluoresceīna atvasinājums, kas tiek plaši pielietots fluorescentās mikroskopijas vajadzībām

PBS – „phosphate buffered saline”, plaši pielietots sāļu buferšķīdums, kas satur nātrija un kālija fosfātus un kālija hlorīdu

PCL – polikaprolaktons

PLA – polilaktāts

PUR – poliuretāns

TAVI – transkatetra aortas vārstuļa implantācija

UV – ultravioletais starojums

VIC – „valve interstitial cells”, vārstuļu interstīcija šūnas

$\epsilon_{\max}$ – graužoša deformācija

$\sigma_{\max}$ – graužošais spriegums

Saīsinājumi sarindoti alfabēta kārtībā.

Starptautiskajā citējamajā literatūrā sirds ķirurģijas un audu inženierijas jēdzieni tiek lietoti angļu valodā. Šajā darbā izmantots šo jēdzienu brīvs autora tulkojums, latviskojums.

1. IEVADS. PROBLĒMAS NOSTĀDNE

Sirds vārstuļu kaites ir plaši izplatīta un potenciāli dzīvību apdraudoša slimību grupa, kas skar $\sim 2,5\%$ no kopējās populācijas ekonomiski attīstītajās valstīs. Ar pieaugošu vecumu to izplatība palielinās un sasniedz pat $11,7\%$ starp cilvēkiem, kas ir vecāki par 75 gadiem. Pieaugot vecumam, jo īpaši pieaug tieši aortālā vārstuļa stenozes izplatība, kas kļuvusi par visizplatītāko sirds vārstuļu kaiti attīstītajās pasaules valstīs [69, 115].

Visā pasaulē joprojām ir aktuāli cilvēka aortas vārstuļa labāka aizstājēja meklējumi. Pašlaik klīniskajā praksē visbiežāk pielietotās ir mehāniskās un bioloģiskās vārstuļu protēzes. Aortālā vārstuļa protezēšanas operācijās, īpaši vecāka gadu gājuma pacientiem, ļoti nozīmīgu vietu ieņem vārstuļu bioprotēzes, kas tiek izgatavotas no īpaši apstrādātiem cūkas aortas vārstuļiem vai liellopa perikarda. Šo vārstuļu galvenais mīnuss ir to ierobežotā ilgmūžība, ko galvenokārt nosaka bioprotēžu kalcificējošā deģenerācija pēc implantācijas organismā [145]. Tādēļ notiek aktīvi meklējumi, lai atrastu ideālu, pēc iespējas ilgmūžīgāku materiālu bioprotēžu izgatavošanai.

Pašreizējo bioprotēžu izgatavošanā lietotā biomateriāla paātrināto kalcifikāciju daļēji nosaka tā apstrāde ar glutāraldehīdu, kas pati par sevi veicina kalcija sāļu izgulsnēšanos [145], tādēļ dažādu moderno bioprotēžu izgatavošanas procesā tiek pielietotas atšķirīgas, bieži slepenībā turētas, pēcapstrādes metodes, kas ir paredzētas tam, lai mazinātu materiāla kalcificēšanos. Biomateriāla apstrāde ar glutāraldehīdu arī izmaina tā mehāniskās īpašības [19, 132], audi kļūst rigīdāki un izmainās sprieguma sadalījums tajos, kas var kalpot kā papildus veicinošs faktors mehāniskam bojājumam un kalcinozei [178].

Taču, publiski nav pieejami dati, kur tiktu salīdzinātas šo jau praksē izmantoto biomateriālu mehāniskās īpašības. Šie dati ir nepieciešami, lai izvērtētu, kura no metodēm ļauj saglabāt mehāniskās īpašības, kas ir salīdzināmas ar natīvo cilvēka aortas vārstuli. Vairāki autori ir izteikuši savas bažas, ka ne tik daudz kalcifikācija, bet arī no natīvā vārstuļa atšķirīgās mehāniskās īpašības un sprieguma sadalījums lapiņās ir faktors, kas var novest pie to disfunkcijas [178].

Vēl vairāk sprieguma sadalījumu vārstuļa lapiņās ietekmē to fiksējošā aparāta rigiditāte. Šis apgalvojums ir ticis pārliecinoši apstiprināts matemātiski modelējot

sprieguma sadalījumu bioprotēžu lapiņās [29]. Rīgīds fiksējošais stents palielina mehānisko slodzi vārstuļa lapiņām, īpaši komisūru reģionam, ar kuru lapiņas ir fiksētas pie stenta.

Šis pētījums šobrīd ir īpaši aktuāls, jo sirds ķirurģijas praksē ļoti strauji ienāk aortas vārstuļa stentprotēzes, kuru fiksējošie stenti ir praktiski bez jebkādas radiālās deformējamības un par kuru ilgmūžību pašlaik vēl nav datu. Šī pētījuma rezultāti potenciāli ļautu prognozēt šo protēžu ilgmūžību, kā arī varētu sniegt norādījumus par to, kādām mehāniskajām īpašībām ir jāatbilst nākamās paaudzes stentprotēzēm.

Neskatoties uz trūkumiem, vārstuļu bioprotēzes ir viena no veiksmīgākajām medicīnas ierīcēm, kas radītas no bioloģiskajiem audiem. No nedzīviem, ķīmiski apstrādātiem audiem – cūkas aortas vārstuļiem vai liellopa perikarda – radītās bioprotēzes ir pierādījušas sevi kā lielisku produktu īstermiņā (līdz 10–15 gadiem), biosaderības ziņā ievērojami pārspējot mehāniskās vārstuļu protēzes. To nodrošina imunoloģiskai sistēmai atpazīstamu svešu šūnu komponentu neesamība, natīvajam vārstulim pietuvinātas mehāniskās īpašības, pateicoties kolagēna šķiedru līdzībai starp dažādām dzīvnieku valsts sugām. No citas puses dzīvū šūnu trūkums bioprotēzēs nosaka vairākus to trūkumus, piemēram: 1) nespēju atjaunot ekstracelulārās matricēs komponentus, tai skaitā kolagēnu, 2) nespēju reparēt audu noguruma radītos bojājumus, 3) nespēju aktīvi pretoties infekcijai, 4) nespēju pretoties kalcifikācijai, 5) nespēju augt un remodelēties [156]. Kaut arī šie trūkumi ir zināmi jau daudzus gadu desmitus, bioprotēzes turpina ieņemt nozīmīgu lomu vārstuļu kaišu ārstēšanā, pateicoties to labi prognozējamajai izturībai un paredzamajiem rezultātiem. Tomēr tas neaptur pētniekus meklēt jaunus veidus un iespējas radīt ideālu sirds vārstuļu aizvietotāju, kuram nebūtu raksturīgi bioprotēžu trūkumi. Audu inženierija pēdējos gados ir izvirzījies priekšplānā kā metode, kas varētu sniegt atbildi šai problēmai. Viena no aortas vārstuļa audu inženierijas neatrisinātajām problēmām ir piemērotas matricēs izvēle šim mērķim. Tai pēc mehāniskajām īpašībām jāatbilst natīvajam sirds aortas vārstulim, tai jābūt biosaderīgai, kā arī, ideālā gadījumā, biodegradablai noteiktā laikā, kas nav īsāks par šūnu spēju radīt jaunu saistaudu šķiedru karkasu.

1.1. Pētījuma novitāte

Darba pamatideja ir, izvērtējot vairākas esošās bioprotēzes ar labiem attāļajiem rezultātiem un „zelta standartu” natīvo aortas vārstuli, definēt mehānisko īpašību robežas bioprotēžu struktūrkomponentēm: lapiņām un fiksējošajiem karkasiem. Līdz šim ir bijuši salīdzinoši daudz pētījumu par natīvo lapiņu mehāniskajām īpašībām, mazāk par bioprotēzēm, bet neviens līdz šim nav mēģinājis definēt vēlamās to mehānisko īpašību robežas. Šinī darbā pirmo reizi tiek definētas mehāniskās īpašības, pēc kurām vadīties, izvērtējot jaunus biomateriālus un apstrādes metodes bioprotēžu lapiņu radīšanai.

Pētījumi par bioprotēžu fiksējošo karkasu radiālo deformējamību iztrūkst. Tomēr daudzās publikācijās tiek īpaši uzsvērts, ka fiksējošā karkasa lokanībai ir ļoti svarīga loma bioprotēžu ilgstošai funkcionēšanai. Šinī darbā pirmo reizi tiek definētas minimālās un optimālās radiālās deformācijas vērtības, kurām jāatbilst jaunu standarta un transkatetra bioprotēžu fiksējošajiem karkasiem.

Viena no aortas vārstuļa audu inženierijas neatrisinātajām problēmām ir piemērotas matricas izvēle šim mērķim. Šinī darbā tiek piedāvāts oriģināls risinājums, kurš ļauj iegūt kombinētu materiālu, kas pēc mehāniskajām īpašībām atbilst natīvajam sirds aortas vārstulim, ir biosaderīgs un ar lēnu biodegradāciju.

1.2. Pētījuma praktiskais pielietojums

Definētās mehānisko īpašību robežas bioprotēžu lapiņu materiālam var izmantot jaunu biomateriālu un to apstrādes metožu izvērtēšanai.

Definētās radiālās deformējamības robežas var pielietot radot jaunas klasiskās, kā arī transkatetra aortas vārstuļa bioprotēzes. Īpaša loma šiem datiem ir tieši izstrādājot transkatetra protēzes, jo to fiksējošajiem stentiem ir jābūt ar salīdzinoši lielu radiālo spēku, kas nodrošina to fiksāciju fibrozajā gredzenā.

Jaunais nanošķiedru materiāla dizains potenciāli pielietojams sirds aortas vārstuļa lapiņu audu inženierijā kā matrice šūnu kultivēšanai.

2. DARBA MĒRĶIS UN UZDEVUMI.

AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĪTĀS HIPOTĒZES

Pētījuma mērķis

Balstoties uz natīva cūkas aortas vārstuļa un bioprotēžu biomehānisko īpašību pētījumiem, noteikt optimālus aortas vārstuļa protēzes lapiņu un to fiksējošo karkasu mehāniskos parametrus jaunu bioprotēžu izgatavošanai.

Papildus mērķis

Piemeklēt optimālu polimēru nanošķiedru materiālu, kuru izmantot kā matrici sirds aortas vārstuļa protēžu lapiņu iegūšanai audu inženierijas ceļā, kura mehāniskās īpašības visvairāk atbilst natīvajām aortas vārstuļa lapiņām.

Pētījuma uzdevumi

Pētījums tematiski sadalīts trīs daļās:

- I. Aortas vārstuļa un bioprotēžu lapiņu mehānisko īpašību pētījumi
 1. Veikt mehānisko īpašību pētījumus vienass noslogojuma stendā natīvām cūkas aortas vārstuļa lapiņām, kā arī dažādu klīniskajā praksē plaši pielietotu bioprotēžu lapiņām.
 2. Noteikt mehānisko īpašību robežas, kurām jāatbilst aortas vārstuļa bioprotēžu lapiņu materiālam.
- II. Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehānisko īpašību pētījumi
 1. Veikt natīvas cūkas aortas saknes un dažādu bioprotēžu fiksējošo karkasu radiālās deformējamības izpēti pseidostatiska spiediena sistēmā ar sonomikrometrijas palīdzību.
 2. Apkopojot datus par aortas saknes un bioprotēžu stentu deformējamību, noteikt mehānisko īpašību robežas, kurām jāatbilst bioprotēžu fiksējošajiem karkasiem.
- III. Polimēru nanošķiedru materiālu izmantošanas iespēju izvērtēšana vārstuļa lapiņu audu inženierijas mērķiem
 1. Veikt mehānisko īpašību pētījumus vienass noslogojuma stendā dažādu polimēru nanošķiedru elektrovērpšanas ceļā iegūtiem materiāliem.

2. Atbilstoši iepriekš noteiktajiem kritērijiem piemeklēt pēc mehāniskajām īpašībām vispiemērotāko nanošķiedru materiālu aortas vārstuļa lapiņu audu inženierijas mērķiem.
3. Pārbaudīt izvēlēta nanošķiedru materiāla biosaderību ar COS-7 šūnām, novērtējot dzīvo šūnu proporciju pēc 6 nedēļu kultivācijas uz pārbaudāmā materiāla.
4. Pārbaudīt nanošķiedru materiālu noturību pret biodegradāciju *in-vitro*, nosakot to mehāniskās īpašības vienass noslogojuma stendā pēc 6 nedēļu kultivēšanas ar COS-7 šūnām.

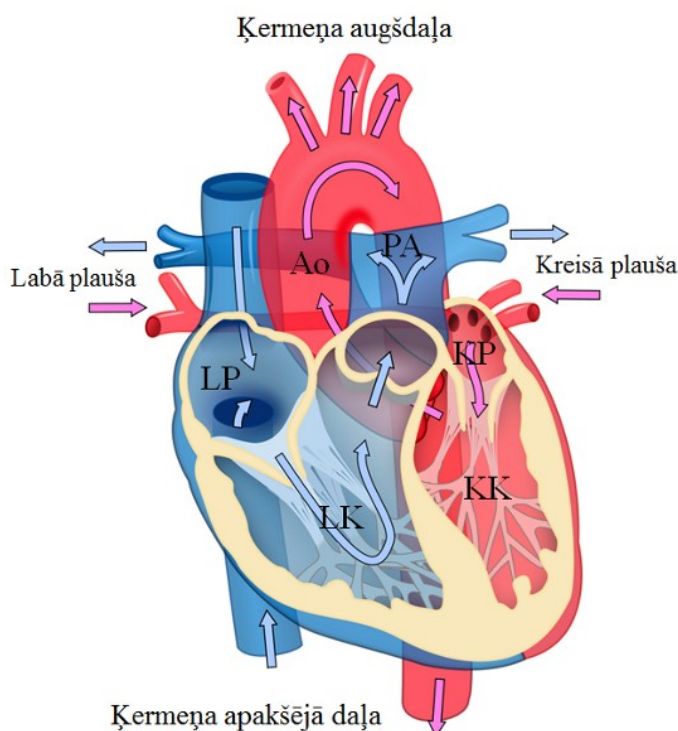
Pētījuma hipotēzes

1. Komerčiāli pieejamo bioprotēžu lapiņu un to fiksējošo karkasu mehāniskie parametri ievērojami atšķiras no natīvā aortas vārstuļa lapiņām un natīvās aortas saknes.
2. Ir iespējams atrast polimēru nanošķiedru materiālu, kas mehānisko īpašību ziņā ir salīdzināms ar natīvā aortas vārstuļa lapiņām un kas vienlaicīgi ir biosaderīgs un pietiekami noturīgs pret pāragru biodegradāciju.

3. LITERATŪRAS APSKATS

3.1. Sirds un sirds vārstuļu anatomija un fizioloģija

Sirdij ir četras kameras, kuras darbojas secīgi sirds cikla laikā. Asinis ieplūst sirds labajā priekškambarī pa augšējo un apakšējo dobo vēnu. Diastoles, sirds cikla relaksācijas fāzes, laikā asinis caur trikuspidālo vārstuli nonāk labajā sirds kambarī. Sirdij saraujoties, sistoles laikā, asinis caur pulmonālo vārstuli nonāk plaušu artērijā un tās zaros. No šejienes asinis tālāk nonāk plaušās, kur norit skābekļa un oglekļa dioksīda apmaiņa, un pēc tam atgriežas sirds kreisajā priekškambarī pa plaušu vēnām. Cirkulācija kreisajā sirds pusē ir līdzīga labajai. Diastoles laikā asinis no kreisā priekškambara caur mitrālo vārstuli ieplūst kreisajā kambarī. Sistoles laikā asinis cauri aortas vārstulim nonāk aortā un tālāk jau sistēmiskajā cirkulācijā (3.1. attēls). Priekškambari darbojas kā asiņu rezervuāri, kuri uzglabā asinis līdz kambaru relaksācijas brīdim, savukārt, kambari ir veidoti no bieza miokarda slāņa, kurš saraujoties izsviež asinis no sirds aortā un plaušu artērijā.



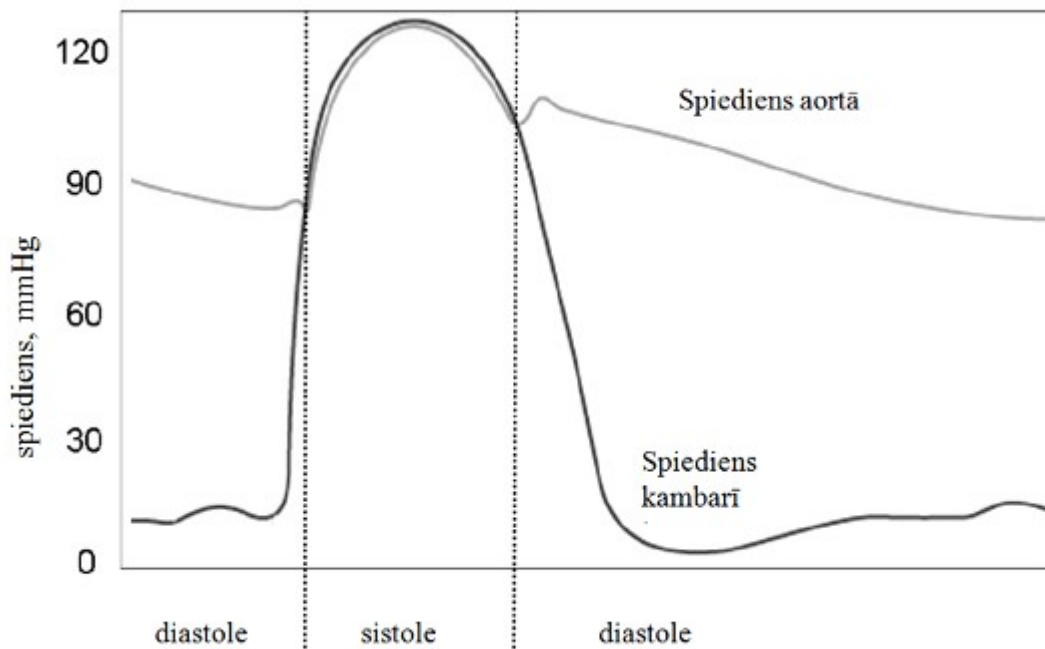
3.1. att. Asins cirkulācija normālā pieauguša cilvēka sirdī

Apzīmējumi: Ao – aorta; PA – plaušu artērija; LP – labais priekškambaris;

KP – kreisais priekškambaris; LK – labais kambaris; KK – kreisais kambaris.

Avots: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/67/Heart_diagram_blood_flow_en.svg

Aplūkojot kambaru dinamiku sirds cikla laikā, tā fāzes var raksturot sekojoši: diastole ir relaksācijas un uzpildīšanās fāze savukārt sistole ir saraušanās un asiņu pumpēšanas fāze. Diastoles laikā kambaru muskulatūra atslābst un spiediens kambaros pietuvojas 0 mmHg. Asinis, kas ir sakrājušās priekškambaros, spiediena ietekmē plūst lejup uz kambariem. Šinī brīdī atrioventrikulārais mezgls, kas darbojas kā dabīgais sirds elektrostimulators, dod signālu, lai sāktos jauna sistole. Pirmie saraujas priekškambari palīdzot asinīm pārplūst no priekškambariem uz kambariem, kaut arī šī asiņu pārplūšana notiek galvenokārt pasīvi spiediena gradienta ietekmē. Kontrakcijas vilnis turpinās tālāk uz kambaru miokardu, liekot tam sarauties. Spiedienam kambaros pārsniedzot priekškambaru spiedienu, rodas asiņu atpakaļplūsma uz priekškambariem, kura slēdz mitrālo un trikuspidālo vārstuļus. Pieaugot kontrakcijas spēkam intraventrikulārais spiediens strauji pieaug izovolumetriskās saraušanās fāzes laikā, kad kambaru tilpums paliek nemainīgs. Līdzko kambaru spiediens pārsniedz spiedienu lielajās artērijās (10–12 mmHg plaušu artērijā un 60–80 mm Hg aortā) atveras to trīsviru semilunārie vārstuļi. Maksimālais kreisā kambara spiediens var būt 100–200 mmHg [93, 169], taču parasti miera stāvoklī ir aptuveni 120 mmHg, 3.2. attēls.



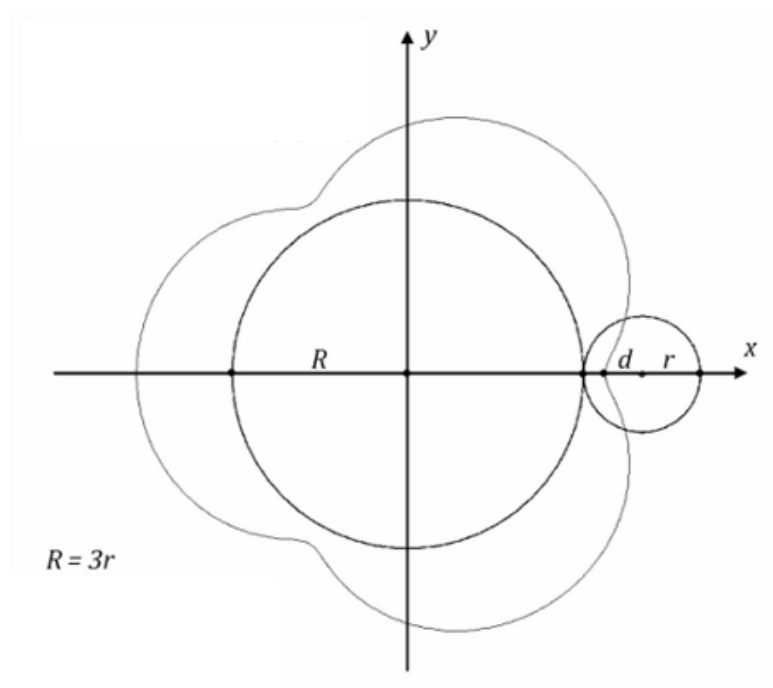
3.2. att. Spiediena izmaiņas sirds kreisajā kambarī un aortā sirds cikla laikā.

Beidzoties kambaru kontrakcijai, beidzas arī sistole. Kambari atslābst un intraventrikulārais spiediens strauji samazinās, asinis sāk atplūst atpakaļ no artērijām, kur ir lielāks spiediens, šinī mirklī slēdzas aortas un pulmonālais vārstulis, lai novērstu šo asiņu atpakaļplūsmu. Diastoles laikā, kad kambaru spiediens ir viszemākais, tiek sasniegts maksimālais transvalvulārais gradients aortas un pulmonālajam vārstuļiem. Šinī brīdī semilunāro vārstuļu lapiņas ir pakļautas vislielākajam mehāniskajam spriegumam. Spiediens kambaros turpina kristies līdz tas ir zemāks nekā priekškambaros, tad atveras atrioventrikulārie vārstuļi un kambari sāk uzpildīties ar asinīm no priekškambariem un sirds cikls atkārtojas. Sirds vārstuļiem ir īpaši nozīmīga loma pareizai un efektīvai asins plūsmai sirds cikla laikā. Normālai sirds funkcijai īpaši nozīmīgi ir kreisās sirds puses vārstuļi, kuru disfunkcijas gadījumā sirds funkcija cieš ievērojamāk un straujāk. Šī funkcionālā nozīmīguma dēļ, kā arī tādēļ, ka daudz biežāk no patoloģijām cieš tieši kreisās puses vārstuļi – aortas un mitrālais, tiem ir pievērsta daudz lielāka uzmanība gan no klīniskā, gan no zinātniskās izpētes viedokļa.

Aortas vārstuļa anatomija

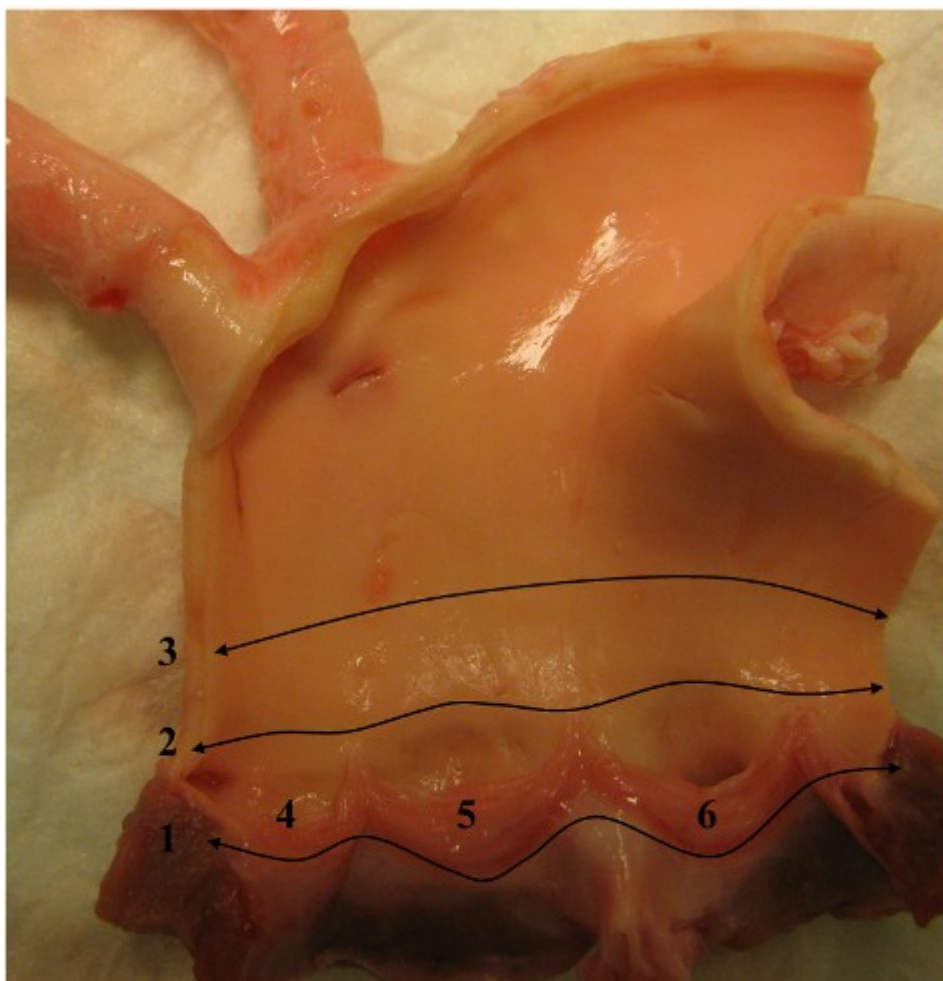
Aortas vārstulis atrodas starp kreisā kambara izejas traktu un aortu un tā galvenā funkcija ir novērst asins retrogrādu plūsmu no aortas atpakaļ kreisajā kambarī diastoles laikā. Tā struktūra ir detalizēti pētīta un aprakstīta balstoties uz anatomiskiem, histoloģiskiem un ultrastrukturālas pētījumiem [59, 107, 108]. Ir veikti arī pētījumi par tā detalizētu mikrostrukturālo uzbūvi, kuru fokuss galvenokārt virzīts uz kolagēna un elastīgo šķiedru morfoloģiju un mijiedarbību [86, 143, 158].

Aortas vārstulis ir veidots no trīs virām, kuras katra nosedz aptuveni 120 grādus no aortas atveres. Aorta distāli no vārstuļa ir cilindriskas formas, savukārt, aortas saknes līmenī šķērsgrīzumā tai ir sarežģītāka forma, tai ir trīs sinusi, kas izskatās, kā iztelpumi aortas sienā. Šo (Valsalvas) sinusu ģeometrija šķērsgrīzumā vadošies pēc *Reul* un kolēģu datiem [128] visvairāk atbilst ģeometriskai figūrai epitrohoīdam. Epitrohoīds ir noslēgta līnija, kuru uzzīmējis punkts, kas atrodas riņķa līnijas ar rādiusu r iekšienē, kura ripo pa fiksētas riņķa līnijas ar rādiusu R ārpusi, punkts atrodas attālumā d no ārējās riņķa līnijas centra (3.3. attēls).



3.3. att. Epitrohoīds, figūra, kas visvairāk atbilst Valsalvas sinusu ģeometrijai

Aortas sinusus dēvē atbilstoši no tiem atejošajām koronārajām artērijām – ir labais, kreisais un nekoronārais aortas sinuss – un tiem atbilstoši nosauktas aortas vārstuļa viras (attēls 3.4.).



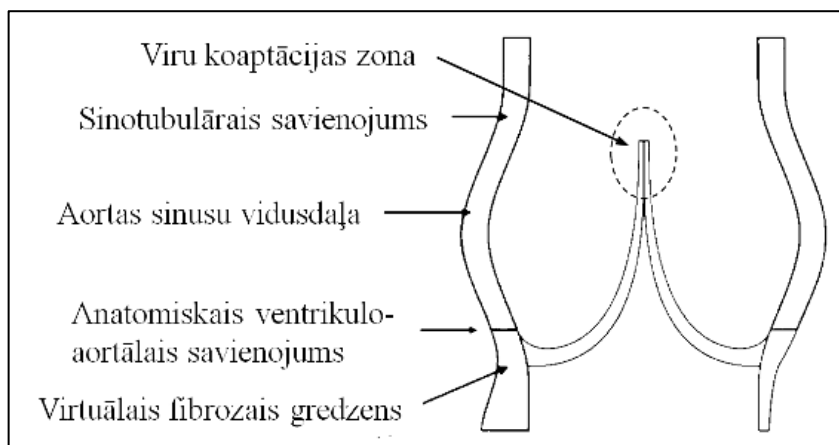
3.4. att. Cūkas aortas vārstulis un aortas sakne, kā arī ascendējošā aorta un daļa aortas loka.

Apzīmējumi: 1) liekta līnija, kas ataino aortas vārstuļa fibrozā gredzena atrašanās vietu; 2) sinotubulārais savienojums; 3) ascendējošā aorta; 4) labā koronārā aortas vārstuļa vira un daļēji redzama labās koronārās artērijas ostija; 5) nekoronārā aortas vārstuļa vira; 6) kreisā koronārā aortas vārstuļa vira un daļēji redzama kreisās koronārās artērijas ostija.

Avots: Foto no darba autora personīgā arhīva.

Aortas vārstuļa virām ir daudzslāņu struktūra, kuru pamata veidojošais komponents ir saistaudu šķiedras: kolagēns, elastīgās šķiedras, kā arī proteoglikāni, glikoproteīni un endotēlija un fibroblastu šūnas. Atšķirībā no citiem orgāniem aortas vārstuļa galvenais funkcionālais komponents ir saistaudu proteīnu šķiedras, ne šūnas. Katra aortas vārstuļa vira ir piestiprināta pie aortas sienas ar sānu un apakšējām malām. Viras sānu daļas

augstākie punkti, kas ir piestiprināti pie aortas, tiek saukti par komisūrām. Sistoles laikā, kad asinis izplūst no kreisā kambara cauri aortas vārstulim, aortas vārstuļa lapiņas saplok, tuvojoties pie aortas sienas. Diastoles laikā vārstuļa lapiņas ļoti ātri sakļaujas kopā, lai novērstu asins atpakaļplūsmu no aortas uz kreiso kambari. Slēgtā stāvoklī savstarpēji saskaras aptuveni augšējā trešdaļa no aortas vārstuļa virām, veidojot drošu slēguma zonu, ko dēvē par koaptācijas zonu, skatīt attēlu 3.5.



3.5. att. Aortas saknes un aortas vārstuļa shematisks zīmējums

Koaptācijas reģiona centrā, katrai virai ir izteikts audu sablīvējums, kas tiek dēvēts par Arantija mezgliņu [59]. Tiek uzskatīts, ka šīs struktūras funkcija ir veicināt vīru koaptāciju un mazināt regurgitācijas iespējamību vārstuļa centrālajā daļā. Galvenās vārstuļa daļas, kas nes slodzi, ir vārstuļa viras pamatne un vēderiņa reģions. Vēderiņa reģionam ir izteikti slāņaina struktūra.

Aortas vārstuļa pētījumi galvenokārt skāruši tā anatomiju, kā arī ģeometriju [128, 160] un dinamiskos mērījumus sirds cikla laikā [16, 83]. Ir veikti arī dinamiskie plūsmas pētījumi aortas saknē un virās [10, 144]. *Gross* un *Kugel* [59] pirmie identificēja aortas vārstuļa virām trīs atsevišķus slāņus un nosauca tos par *fibrosa*, *spongiosa* un *ventricularis*. Shematisks slāņu izkārtojums atainots 3.6. attēlā.

<i>Fibrosa</i>	Kolagēns +++ Elastīns +
<i>Spongiosa</i>	Proteoglikāni +++ Kolagēns + Elastīns +
<i>Ventricularis</i>	Elastīns +++ Kolagēns +

**3.6. att. Shematisks aortas vārstuļa viru slāņu
atainojums**

Šie slāņi kopā veido īpašības, kas raksturo aortas vārstuļa lapiņas, taču atsevišķi šie slāņi ir savstarpēji ļoti atšķirīgi gan pēc uzbūves, gan mehāniskajām īpašībām. *Fibrosa* slānis atrodas aortālajā viru pusē un to veido cirkulāri orientēti lieli kolagēna šķiedru kūlīši. *Fibrosa* tiek uzskatīta par galveno mehānisko izturību nodrošinošo slāni. Tieši kolagēna šķiedras ir tās, kas nodrošina mehānisko izturību pret asins spiediena radīto slodzi. Pētījumi ir parādījuši, ka *fibrosa* satur daudz vairāk kolagēna šķiedru kā citi slāņi [30]. Otrā viras pusē, kas atrodas tuvāk kreisajam kambarim atrodas *ventricularis* slānis. Šis slānis satur mazāk kolagēna šķiedru, bet daudz vairāk elastīgās šķiedras, kas to padara izturīgāku pret lielākām deformācijām [143, 144]. Starp *ventricularis* un *fibrosa* atrodas nestrukturāls slānis, kas tiek dēvēts par *spongiosa*. Kaut arī dažas elastīgās un kolagēna šķiedras, savienojot ārējos slāņus, šķērso *spongiosa*, tā tomēr galvenokārt ir veidota no proteoglikāniem un glikoproteīniem un dažām atsevišķām šūnām. *Spongiosa* ar lielāko varbūtību kalpo kā sprieguma pārnese slānis starp abiem ārējiem slāņiem.

3.2. Aortas vārstuļa viru slāņu uzbūve un ultrastruktūra

Aortas vārstuļa viru mehāniskās īpašības nosaka ne tikai lapiņu strukturālo komponentu tips, izkārtojums un daudzums, bet arī tas, kā lapiņu slāņi savstarpēji ir saistīti, kā tie mijiedarbojas. Iestieptā stāvoklī *fibrosa* un *ventricularis* – abi slāņi ir taisni un vienāda garuma. Taču bez iestiepuma *fibrosa* slānis iegūst viļņotu struktūru radiālā virzienā kamēr *ventricularis* saglabā taisnāku izvietojumu. Pateicoties šīm

īpašībām *fibrosa* spēj deformēties pat par 60% [181], neskatoties uz faktu, ka šis slānis satur ļoti daudz relatīvi mazāk elastīgo kolagēna šķiedru. Šis viļņojums *fibrosa* slānī sastopams tikai radiālā virzienā, bet ne garenvirzienā. Šī izteiktā deformējamība radiālā virzienā ir ļoti nozīmīga vārstuļa slēgšanās laikā un tā ilglaicīgai izturībai, jo priekšlaicīgs kolagēna viļņotās struktūras zudums var radīt audu izturības problēmas [55]. Ņemot vērā kolagēna šķiedru relatīvo rigīdumu un to mehānisko izturību, kā arī to, ka šīs šķiedras ir vairāk izplatītas, tiek uzskatīts, ka tās ir galvenais vārstuļa lapiņu strukturālais komponents. Taču kaut arī elastīgās šķiedras ir daudz mazāk izplatītas vārstuļa lapiņās tām ir ne mazāk nozīmīga strukturāla loma.

Kolagēns

Visizplatītākā no saistaudu olbaltumvielām cilvēka organismā – kolagēns ir nozīmīga komponente daudzās organisma struktūrās, kam jāiztur lielas mehāniskas slodzes [114]. Tas ir pamata struktūrkomponente saitēs un cīpslās, nodrošinot to mehānisko izturību. Kolagēna šķiedru struktūra ir sarežģīta, bet pietiekami labi izpētīta sākot ar tropokolagēna molekulām līdz makroskopiski saskatāmiem šķiedru kūlīšiem. Struktūras ar augstu kolagēna saturu, piemēram, cīpslas iztur 4–6% deformāciju pirms pārplīst [182]. Taisnas kolagēna šķiedras var izturēt maksimālu deformāciju līdz 12% [76]. Aortālā vārstuļa virās ir galvenokārt I tipa kolagēns, daudz mazāk III tipa un pavisam nedaudz V tipa kolagēns [9]; sastāva ziņā tās daudz neatšķiras no mitrālā vārstuļa [34]. Ir aprakstīts, ka kolagēns *fibrosa* slānī galvenokārt ir izkārtots garenvirzienā [59], savukārt, *ventricularis* slānī kolagēna šķiedrām nav šādas noteiktas orientācijas. Kolagēna konfigurācija aortas vārstuļa lapiņās ir īpaša, kas nodrošina to izturību pret daudzkārt lielāku deformāciju kā cīpslās. Makroskopiski vērojamā kolagēna struktūru viļņainība ir viens no faktoriem, bet arī mikroskopiskā šķiedru struktūra nodrošina šo palielināto deformējamību. Miera stāvoklī kolagēna šķiedras atrodas sarukušā stāvoklī, kas kopā ar viļņoto izkārtojumu pieļauj elastīgu iestiepumu līdz pat 60% apjomā bez permanentas šķiedru deformācijas [181]. Nav pilnībā skaidrs, kas nodrošina kolagēna šķiedru atgriešanos sarukušā stāvoklī pēc tam, kad tās diastoles asins spiediena slodzes rezultātā ir tikušas izstieptas. Viens no iespējamajiem skaidrojumiem ir, ka tieši šī ir viena no funkcijām, ko pilda elastīgās šķiedras.

Elastīgās šķiedras

Elastīgās šķiedras ir mazāk izplatītas cilvēka organismā kā kolagēna šķiedras, tās veido pamata elements elastīns, ko apņem mikrofibrillārs materiāls, kas var atšķirties pēc aminoskābju sastāva un šķērssaišu skaita [58]. Elastīgās šķiedras sastopamas visās lielajās artērijās, kā arī ādā, plaušās, sirds vārstuļos un citur. Elastīns satur daudz šķērssaišu, kas nodrošina tā augsto ķīmisko izturību, kā arī izteikto noturīgumu pret permanentu deformāciju. Elastīgās šķiedras spēj izturēt 150% izstiepumu, kas tās padara par vienu no viselastīgākajiem materiāliem cilvēka ķermenī. Maz ir zināms par elastīgo šķiedru funkciju aortas vārstuļa lapiņās, bet neskatoties uz to relatīvi nelielo procentuālo saturu aortas vārstuļa virās salīdzinājumā ar kolagēnu – 13% pret 50% no sausnes [84, 177], to ietekme uz mehāniskajām īpašībām ir nozīmīga. Pēc fermentatīvas elastīna eliminācijas aortas vārstuļa lapiņu mehānikās īpašības vienas noslogojuma testos nozīmīgi izmainās – tās kļūst ievērojami rigīdākas [84].

Schoen un *Levy* [146] īsumā aortas vārstuļa slēgšanās/atvēršanās biomehāniku skaidroja tā, ka brīdī, kad aortas vārstulis ir gandrīz pilnībā slēdzies un kolagēna šķiedru kūlīši gandrīz pilnībā iztaisnojušies, kolagēns iztur mehānisko noslogojumu un nepieļauj lapiņu prolapsu. Savukārt aortas vārstulim atveroties, elastīgās šķiedras pie nelielā mehāniskā noslogojuma saraujas un atgriež arī fibrosa slāni sākotnējā krokotā stāvoklī.

Glikoproteīni un proteoglikāni

Sirds vārstuļa lapiņu šūnas spēj ražot glikoproteīnus un proteoglikānus, kas veido želejveidīgu masu spongiosa slānī, kas apņem struktūrolbaltumvielu šķiedras un satur daudz ūdens [75]. Kaut arī to funkcija sirds vārstuļos nav līdz galam izprasta, šie savienojumi tiek sintezēti salīdzinoši ļoti aktīvi *spongiosa* slānī un vienlīdz ātri notiek arī to noārdīšanās, īpaši aortas vārstulī [75]. Šo molekulu funkcija iespējams ir ļoti nozīmīga: tās var nodrošināt sprieguma spēku pānesi starp *fibrosa* un *ventricularis* slāņiem, nodrošināt izejmateriālus kolagēna un elastīna šķiedru produkcijai, kā arī regulēt šūnu un ekstracelulārās matricas komponentu adhēziju. To produkciju visticamāk ietekmē autoregulācijas mehānisms, kurš ir atkarīgs no sprieguma spēkiem starp vārstuļa lapiņu slāņiem. Pastāv hipotēzes, ka pastiprināta šo komponentu

produkcija var veicināt tādu slimību kā miksomatoza deģenerācija, kā arī cita veida vārstuļa nepietiekamības attīstību [33, 161], kamēr samazināta produkcija var veicināt ātrāku bioloģisko audu nodilumu un tai sekojošu disfunkciju [18]. Detalizētāka informācija par glikoproteīniem un proteoglikāniem šeit netiek iekļauta, jo to nozīmīgums vārstuļu biomehānikā nav zināms.

Šūnas

Šūnas, kas atrodas aortas vārstuļa lapiņās starp endotēlija šūnu slāņiem abās pusēs tiek dēvētas par vārstuļa intersticiālajām šūnām (VIC – *valvular interstitial cells*). Starp intersticiālajām šūnām ir identificējamas trīs šūnu grupas ar atšķirīgiem fenotipiem:

- 1) gludie miocīti, kas organizēti kā atsevišķas šūnas vai veidojot kūlišus [7, 32],
- 2) fibroblasti, kas uztur ekstracelulāro matrici un 3) šūnas ar fenotipiskajām īpašībām, kas atbilst gan fibroblastiem, gan gludās muskulatūras šūnām un tiek dēvēti par miofibroblastiem [105, 163, 167]. Unikālās miofibroblastu īpašības, kuri satur gan skeleta muskuļu gan kardiālās kontraktīlās kontraktīlās olbaltumvielas, var būt tās, kas nodrošina vārstuļa lapiņu noturīgumu visa cilvēka mūža garumā, jo tās ne tikai spēj sintezēt ekstracelulārās matricas proteīnus ieskaitot kolagēnu un elastīnu, bet arī proteolītiskos fermentus, kas nodrošina aktīvu ECM remodelāciju. Dažādo fenotipu šūnu izplatība aortas vārstuļa lapiņās ir tieši atkarīga no vides apstākļiem un no slodzes, kādai ir pakļautas aortas vārstuļa viras. Normālos apstākļos pieauguša indivīda aortas vārstuļa lapiņās fibroblasti galvenokārt ir atrodami *ventricularis* slānī, kamēr gludās muskulatūras šūnas un miofibroblasti galvenokārt ir izvietoti *fibrosa* slānī [47]. Šajā šūnu izvietojumā var vilkt paralēles ar asinsvada sienību, kur gludie miocīti un miofibroblasti sastopami *media* slānī, kamēr fibroblasti galvenokārt adventīcijas slānī. Hipertensijas gadījumā fibroblasti adventīcijas slānī transformējas par miofibroblastiem, lai adaptētos palielinātajai mehāniskajai slodzei [138]. Adaptācijas process līdzīgs minētajam varētu izskaidrot arī šūnu izplatību aortas vārstuļa lapiņās. Pieaugošu slodžu un patoloģiju gadījumos ir vērojama tendence fibroblastiem pārvērsties aktīvākajos miofibroblastos, kas arī sekretē dažādus proteolītiskos enzīmus, kuru ietekmē notiek arī ekstracelulārās matricas remodelēšanās [126]. Vārstuļu intersticiālās šūnas spēj mainīt lapiņu mehāniskās īpašības atbilstoši lokālajam noslogojumam [20, 21, 104, 112, 135]. Kopš tika atklāta gludās muskulatūras šūnu sistēma aortas vārstuļa lapiņās, tiek arī apšaubīta to pasīvās funkcionēšanas hipotēze [7]. Gludās muskulatūras šūnas

galvenokārt ir izvietotas garenvirzienā *ventricularis* slānī [32], ir novērotas to kontraktilās spējas [54, 105, 162], kā arī sensoro nervu klātesamība vārstuļu lapiņās [98]. Kontrakcijas lapiņas ietvaros varētu spēlēt lomu to atvēršanās un slēgšanās procesā, kā arī sniegt papildus atbalstu paaugstinātas mehāniskās slodzes brīžos diastoles laikā [32, 162].

Endotēlija šūnas, kas sedz vārstuļa lapiņu virsmu, nodrošina aizsargājošo, antitrombotisku pārklājumu. Interesanti atzīmēt, ka vārstuļu endotēlija šūnas ir orientētas perpendikulāri asins plūsmai, atšķirībā no endotēlija šūnām asinsvados. Tas liecina, ka kāds cits spēks, nevis asins plūsma ietekmē šo šūnu izkārtojumu. Pastāv hipotēze, ka līdzīgi kā kolagēna šķiedru izkārtojumu galvenokārt garenvirzienā ietekmē spiediena spēks diastoles laikā, arī endotēlija šūnas ir izkārtotas atbilstoši šim spēka virzienam. Vienīgā vieta, kur endotēlija šūnas ir izkārtotas paralēli asins plūsmai, ir Arantija mezgliņa rajons [45]. Eksperimentāli ir pierādīts, ka pastāv ļoti cieša komunikācija starp vārstuļu endotēlija šūnām un intersticiālajām šūnām. Endotēlija šūnas spēj detektēt paaugstinātas slodzes, spiediena apstākļus un par to signalizēt VIC ar citokīnu starpniecību, kas savukārt spēj izmainīt lapiņu lokālās mehāniskās īpašības atbilstoši slodzei [20, 21].

3.3. Aortas vārstuļa mehāniskās īpašības

Sirds cikla laikā aortas vārstuļa lapiņas tiek pakļautas lielai deformācijai un ievērojami maina savu formu. Materiāla atbildes reakcija uz noslogojumu ir izteikti nelineāra un hiperelastīga. Lapiņu materiālu varētu raksturot kā elastīgu, homogēnu un anizotropu, ar nelineāru sprieguma-deformācijas attiecību. Piemēram, elastības modulis garenvirzienā var būt līdz pat 6–8 reizēm lielāks nekā radiālā virzienā [73, 158], ko galvenokārt nosaka kolagēna šķiedru izvietojums gareniski. Ļoti daudz ir veikti pētījumi, lai noskaidrotu aortas vārstuļa lapiņu mehāniskās īpašības. Lielākā daļa pētījumu ir veikti, izmantojot cūkas aortas vārstuļa lapiņas, pateicoties to lielajai līdzībai ar cilvēka aortas vārstuli. Tikai dažos pētījumos ir analizētas cilvēka vārstuļa mehāniskās īpašības [101, 158]. *Mavrlis* un *Missirlis* [101] veiktajos vienas noslogojuma testos ar natīviem un ķīmiski apstrādātiem cūkas un cilvēka aortas vārstuļiem parādīja, ka natīvam cūkas vārstuļu materiālam piemīt tikai salīdzinoši

nedaudz lielāka deformējamība un tas ir mazāk rigīds, kā cilvēka vārstuļu materiāls. Taču kopumā to īpašības ir salīdzināmas. Vairāki pētnieki ir veikuši vienas noslogojuma testus un ieguvuši pārliedzinošus datus par aortas vārstuļa audu mehānisko īpašību anizotropo dabu [109, 158]. Stradiņš un kolēģi [158] veica arī mehānisko īpašību pētījumus vienas noslogojuma standā atsevišķi dažādām aortas vārstuļa daļām, kā arī aortas sienas audu paraugiem un salīdzināja šos datus ar pulmonālā vārstuļa mehāniskajām īpašībām. Ir veikti arī divas mehānisko īpašību pētījumi aortas vārstuļa viru materiālam, [102, 133]. Balstoties uz šiem datiem ir mēģināts izstrādāt šīs anizotropās mehāniskās struktūras modeli, kas ļautu izprast un paredzēt atbildes reakcijas pie dažādām nospriegojuma situācijām [82, 159]. Lai labāk izprastu kolagēna šķiedru un elastīgo šķiedru lomu vārstuļa lapiņu mehānikā, *Vesely* un *Noseworthy* [181] atdalīja *fibrosa* un *ventricularis* slāņus natīviem un fiksētiem aortas vārstuļiem un veica noslogojuma testus ar tiem. No šī pētījuma tika izvirzīta hipotēze, ka elastīgās šķiedras minimāli palielina vārstuļa materiāla rigīdumu un mehānisko izturību, taču spēlē nozīmīgu lomu, lai atgrieztu kolagēna šķiedru kūlīšu sākotnējā, neiestieptajā stāvoklī.

3.4. Aortas vārstuļa patoloģija

Vārstuļu kaišu epidemioloģiskā struktūra pasaulē ir ievērojami izmainījusies pēdējo desmitgažu laikā. Uzlabojoties infekciju kontrolei, attīstītajās pasaules valstīs samazinājušās reimatiskas ģenēzes patoloģijas; savukārt, progresējošā populācijas novecošanās izraisījusi deģeneratīvu vārstuļu saslimšanu – aortālā vārstuļa stenozes (AS) un mitrālā vārstuļa nepietiekamības pieaugumu [24, 152, 154]. Šeit jāmin, ka ļoti maz ir pētījumu par vārstuļu kaišu izplatību vispārējā populācijā, pārsvarā aptuvenie dati tiek iegūti no ķirurģiskās populācijas pētījumiem. Taču atsevišķi pētījumi tomēr ir veikti [70, 152], un pēc to datiem var secināt, ka vecākiem cilvēkiem visizplatītākā ir AS un mitrālā vārstuļa nepietiekamība. Savukārt, ja runājam par operētajiem pacientiem, tad no vecāka gadagājuma pacientiem, kuriem veikta vārstuļu operācija, 60–70 % gadījumu tā ir tieši AS dēļ [2].

Aortas vārstuļa stenoze ir visizplatītākā sirds vārstuļu kaite rietumu pasaulē un viens no biežākajiem kardiovaskulāro slimību izraisītās nāves cēloņiem aiz koronārās sirds slimības, sirds mazspējas un hipertensijas [187]. Galvenais AS patoģenētiskais

faktors ir ateroskleroze. Aortas vārstuļa sklerozi bez stenozes atrod 26–29% indivīdu pēc 65 gadiem [118, 155]. Aortas vārstuļa sklerozes biežums ievērojami pieaug, pieaugot indivīdu vecumam. Tā vecumā no 75 līdz 84 gadiem to atrod 35 % cilvēku, bet virs 85 gadu vecuma pat 48 % indivīdu [155]. Ļoti nozīmīgs predisponējošs faktors AS ir iedzimts divvīru aortas vārstulis. Sekojoši, divi galvenie smagas AS varianti ir iedzimta divvīru aortas vārstuļa kalcifikācija, kas bieži sastopama cilvēkiem agrīnākā vecumā (no 50 līdz 70 gadiem divvīru vārstulis sastopams divās trešdaļās AS gadījumu) un trīsvīru aortas vārstuļa deģeneratīva kalcifikācija, kas vecumā virs 70 gadiem sastopama ap 60% AS gadījumu [131].



**3.7. att. Stenotisks aortas vārstulis ar kalcinozi tā virās,
intraoperatīvs skats**

Avots: Sirds Ķirurģijas centra arhīvs

Prognose pacientiem simptomātiskas AS gadījumā bez ķirurģiskas terapijas ir ļoti slikta – mirstība gada laikā pārsniedz 30% [175].

3.4.1. Klīniskais aortas stenozes nozīmīgums

Sirds vārstuļu kaišu diagnostiku un ārstēšanu vecāka gadagājuma cilvēkiem ir ietekmējusi ļoti straujā populācijas novecošanās, kas aizsākās pagājušā gadsimta vidusdaļā. Populācijas novecošanās dēļ pieprasījums pēc bioprotēzēm katru gadu pasaulē palielinās aptuveni par 5% [176]. Ja 1998. gadā Latvijā bija 488,5 tūkstoši jeb 19,9% cilvēku vecāku par 60 gadiem, tad tiek prognozēts, ka 2025. gadā šis skaitlis pieaugs līdz 584,5 tūkstošiem jeb 27,1% no populācijas [1]. Pateicoties progresam sirds ķirurģijā, ir izdevies nozīmīgi uzlabot dzīvildzi un dzīves kvalitāti daudziem pacientiem ar vārstuļu kaitēm cienījamā vecumā. Pēc dažu pētījumu datiem dzīves kvalitāte un dzīvildze tiem pacientiem, kuri sekmīgi pārcieš operāciju un postoperatīvo periodu AS dēļ, būtiski neatšķiras no līdzīga vecuma indivīdiem vispārējā populācijā [117, 149]. Attiecīgi ir mainījies klasiskais uzskats, ka sirds vārstuļu kaišu ķirurģiska korekcija ir piemērojama tikai tiem vecajiem pacientiem, kuri ir labā vispārējā stāvoklī, jo aizvien labāki rezultāti tiek iegūti operējot arī tos slimniekus, kuru blakus slimības ir nopietnas, bet nav nekontrolētas [3]. Aortas vārstuļa protezēšanu pārcietušo pacientu vidējais vecums Latvijā no 2008. gada līdz 2010. gadam ir pieaudzis no 65,84 gadiem līdz 67,35 gadiem, kopumā aortas vārstuļa operācijas ir bijušas nepieciešamas 1044 cilvēkiem šajā laika periodā. No šiem 1044 cilvēkiem 534 cilvēki saņēma bioprotēzes un 510 saņēma mehāniskas protēzes. Bioprotēžu pielietojums pieaudzis no 42,3% gadījumu 2008. gadā līdz pat 60,5% 2010. gadā [74]. Šis bioprotēžu pielietojuma pieaugums ir vēl iespaidīgāks salīdzinājumā ar 2002. gadu, kad tikai 4% pacientu saņēma aortālā vārstuļa bioprotēzi, bet 2006. gadā šis proporcija jau bija pieaugusi līdz 25% [157].

3.5. Sirds vārstuļu kaišu terapija

Bojātu vārstuli iespējams ķirurģiski salabot; gadījumos, kad bojājums ir pārāk nopietns, vārstulis ir jāprotezē. Sirds vārstuļu protēzes var iedalīt divās lielās grupās:

1) tādās, kuras pilnībā vai daļēji ir izgatavotas izmantojot bioloģiskos materiālus – cilvēka vai dzīvnieku audus, un 2) protēzes, kuras izgatavotas no ne-bioloģiskiem materiāliem – polimēriem, metāla, keramikas. Pirmās pieņemts saukt par bioprotēzēm, pēdējās par mehāniskajām protēzēm. Katru gadu kopā visā pasaulē tiek implantēts vairāk kā 275 000 sirds vārstuļu protēžu, no kurām aptuveni puse ir bioprotēzes [145].

Bioprotēžu pielietojumam ir tendence pieaugt, populācijai progresīvi novecojot, katru gadu pasaules kopējais bioprotēžu patēriņš palielinās par ~5% [176]. Visbiežāk izmantotās ir bioprotēzes, kas izgatavotas no ķīmiski apstrādātiem liellopu perikarda vai cūkas aortas vārstuļiem iestiprinātiem sintētiska materiāla karkasā – stentā, vai bez tāda karkasa.

Šāda tipa bioprotēzes ir pazīstamas jau kopš 1970-tajiem gadiem un tiek pielietotas klīniskajā praksē jau ilgstoši ar apmierinošiem rezultātiem [15, 53, 78, 85, 87, 113]. Taču visu bioprotēžu galvenais mīnuss ir to ierobežotā ilgmūžība [111, 137, 148, 176] – 10 gadu laika pēc implantācijas aptuveni 50–60% vārstuļu būs radušies defekti, kas prasa atkārtotu ķirurģisku iejaukšanos vai retos gadījumos pat izraisa pacienta nāvi. Problēmas pamatā ir bioloģisko audu pakāpeniska strukturāla degradācija, ko izraisa kalcificējoša un nekalcificējoša audu deģenerācija [111, 145, 176].

Pirms izmantošanas bioprotēzēs bioloģiskie audi tiek apstrādāti ķīmiski. Šī apstrāde iekļauj arī fiksāciju ar glutāraldehīdu, kas iznīcina olbaltumvielu antigēno struktūru kā arī veido šķērssaites kolagēna molekulu ietvaros un starp kolagēna šķiedrām un arī ar citām pamatvielas molekulām. Šī ķīmiskā aģenta izmantošana izmaina arī bioloģisko audu mehāniskās īpašības, padarot tos stingrākus, mehāniski izturīgākus un mazāk elastīgus [132].

Proгноzi pēc vārstuļu operācijas iespaido ļoti daudzi faktori, no kuriem nebūt ne maznozīmīgs ir tieši pacienta vecums, kas pēc vairāku pētījumu datiem atstāj tiešu iespaidu gan uz stacionārā pavadīto laiku, gan intrahospitālo mirstību. Vecāka gadagājuma pacientu prognozi pasliktina ne tikai ar vecumu saistītās blakus saslimšanas un sliktais vispārējais stāvoklis, bet arī ar vecumu pieaugošā aortas kalcinoze, kas apgrūtina tehnisko operācijas izpildījumu, jo audi kļūst izteikti irdeni un neizturīgi. Pēc 2006.–2008. gada Eiropas datiem vidējais vecums, kad pacientam veic izolētu aortas vārstuļa operāciju ir 66,8 gadi, vidējā pacientu mirstība ir 2,9 %, kas variē no 1,2% pacientiem jaunākiem par 56 gadiem līdz pat 6,1% pacientiem virs 80 gadu vecuma. Pacienti vecumā līdz 61 gadam stacionārā vidēji pavadījuši 10,7 dienas pēc operācijas, savukārt, pacienti, kas vecāki par 80 gadiem 13,2 dienas [17]. Intrahospitālo mirstību palielina operācijas apjoms, tā kombinētu operāciju gadījumā – aortas vārstuļa kaites

korekcija plus koronāro asinsvadu šuntēšana – vidējie mirstības rādītāji ir 5,5% līmenī, taču pacientiem vecākiem par 80 gadiem tas sasniedz pat 8,7% [17].

Taču neskatoties uz sirds ķirurģijas progresu, ļoti daudziem cilvēkiem gados ar nopietnām, dzīvību apdraudošām blakus slimībām aortas vārstuļa ķirurģiska protezēšana tiek atteikta vai ir kontrindicēta pārāk augstā operācijas riska dēļ. Eiropā pirms transkatetra aortas vārstuļa implantācijas (TAVI) ieviešanas līdz pat aptuveni 32% simptomātisku AS pacientu nesaņem ķirurģisku palīdzību savu blakus saslimšanu vai vispārējā veselības stāvokļa dēļ [69]. Pirmā aortas vārstuļa perkutānā implantācija pasaulē tika veikta Francijā 2002. gadā [39]. Šī metode gadu gaitā ir turpinājusi strauji attīstīties, un pašlaik pasaulē jau vairāk kā 50 000 cilvēku ir veikta TAVI. Tā sevi ir apstiprinājusi kā dzīvotspējīgu stratēģiju pacientiem ar smagu, simptomātisku AS, kuru vispārējais veselības stāvoklis nepieļauj ķirurģisku vārstuļa protezēšanu. Latvijā līdz šim ir veiktas 123 TAVI procedūras ar ļoti labiem rezultātiem – 30 dienu mirstība 2,4% (Latvijas Kardioloģijas centra dati).

3.5.1. Ārstēšanas modalitātes – pieejamās protēzes

Sirds vārstuļu protēzes tika ieviestas klīniskajā praksē jau vairāk kā pirms 50 gadiem. Latvijā aortas vārstuļa protezēšana pirmo reizi tika veikta 1971. gadā, to veica profesors G. Cukermans no Maskavas Bakuļeva institūta un tūlīt pēc tam arī Sirds un asinsvadu ķirurģijas centra dibinātājs profesors J. Volkolakovs. Šobrīd ik gadus vairāk kā 275 000 cilvēku visā pasaulē tiek implantēta kāda no sirds vārstuļu protēzēm. Kaut arī gadu gaitā sirds vārstuļu protēžu dizains ir vairākkārtēji ievērojami mainījies, ideāls dabīgā vārstuļa aizvietotājs vēl nav atrasts. Galvenās īpašības, kurām būtu jāatbilst ideālām sirds vārstuļu protēzēm jau 1950-tajos gados formulēja sirds vārstuļu ķirurģijas pionieris *Dwight Emary Harken* [61]:

1. Tās nedrīkst būt trombogēnas;
2. Tām jābūt ķīmiski inertām un tās nedrīkst bojāt asins šūnas;
3. Tās neradītu pretestību fizioloģiskai asins plūsmai;
4. Tām jāslēdzas ātri (mazāk kā 0,05 sekundēs);

5. Tām jāpaliek slēgtā stāvoklī atbilstošā sirds cikla fāzē;
6. Tām jābūt izturīgām ar noturīgu ģeometrisku formu;
7. Tām jābūt pozicionētām fizioloģiski pareizā vietā;
8. Jāpiemīt permanentas fiksācijas spējai;
9. Tās nedrīkst radīt diskomfortu pacientam;
10. Jābūt tehniski viegli implantējamām.

Dotajā brīdī visas vārstuļu protēzes varētu iedalīt 4 lielās grupās:

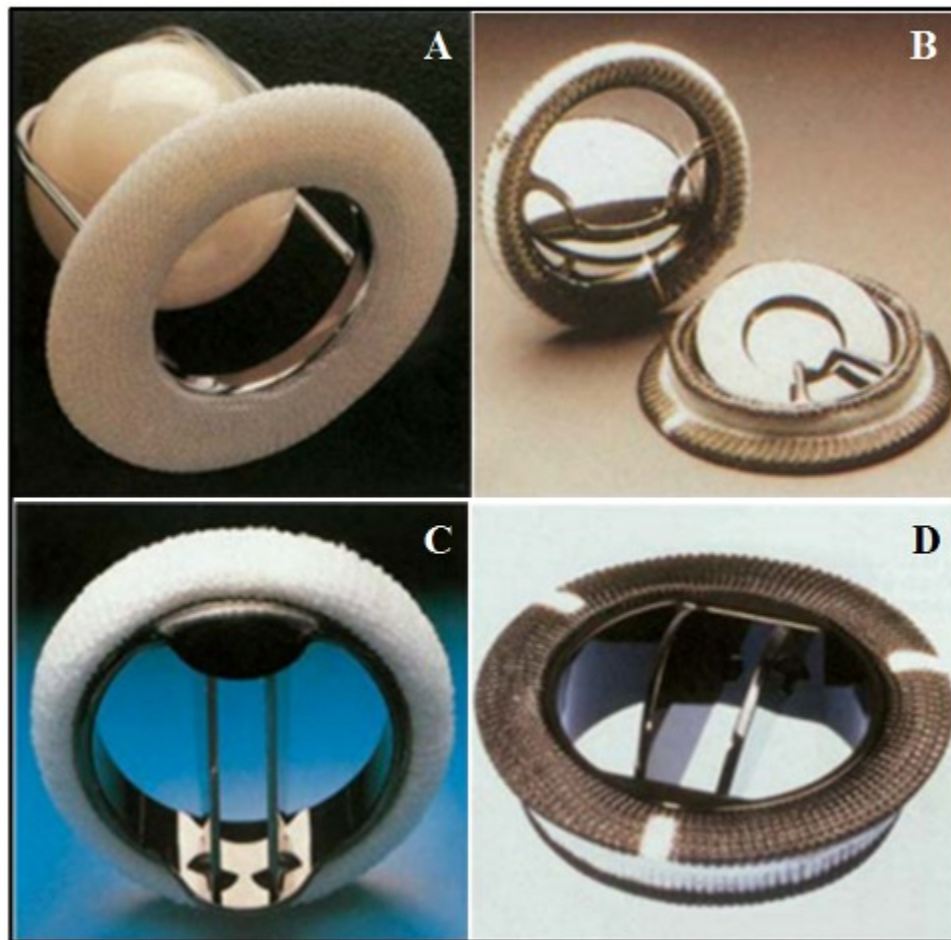
1. Mehāniskās protēzēs – ar rigīdiem mākslīgi radītiem slēdzēj mehānismiem;
2. Bioprotēzēs – kuru slēdzēj mehānisms ir elastīgs un izgatavots no bioloģiskiem ksenogēnas vai homologas izcelsmes audiem;
3. Protēzes, kas iegūtas audu inženierijas ceļā;
4. Protēzes no polimēru materiāla.

No šīm četrām, pagaidām tikai pirmo divu grupu protēzes ir plaši komerciāli pieejamas, tādēļ praksē visbiežāk piemin tikai tās. Par katru no šīm grupām nedaudz detalizētāk tiks pastāstīts sekojošajās nodaļās.

3.5.2. Mehāniskās sirds vārstuļu protēzes

Pirmās mehāniskās sirds vārstuļu protēzes parādījās 1960 tajos gados, un tās bija veidotas no metāliska karkasa, kurā kustējās silikona lodīte, kas bija impregnēta ar bārija sulfātu, lai būtu rentgenpozitīva – attēls 3.9.A. 1969. gadā parādījās pirmā viena diska vārstuļu protēze – *Bjork-Shiley* [13]. Tās dizains tika arī turpmāk uzlabots un kopumā tika implantēts aptuveni 360 000 šādu protēžu – attēls 3.9.B. Pašreizējās divviru mehāniskās protēzes ir balstītas uz *St. Jude Medical* 1977. gadā izstrādātās protēzes dizaina īpašībām, kura galvenā īpatnība ir divas mehāniskas cieta materiāla lapiņas, kas ir iestiprinātas protēzes karkasā ar eņģu mehānismu – attēls 3.9.C un D. Eņģu mehānisms katrā sirds cikla laikā nodrošina lapiņu kustību par 55° līdz 60°

atkarībā no protēzes izmēriem no noslēgtas pozīcijas līdz 85° leņķim attiecībā pret protēzes karkasu pilnībā atvērtā stāvoklī.



**3.9. att. Mehāniskas sirds vārstuļu protēzes: A) *Starr-Edwards* ar lodīti;
B) *Medtronic Hall* protēze ar vienu viru; C) *St Jude* divviru mehāniska protēze;
D) *Carbomedics* divviru mehāniska protēze**

Avots: [92]

Galvenā mehānisko protēžu priekšrocība ir to dokumentāli apstiprinātā izturība, un galvenais to trūkums ir augstais trombogēnums. Pašreiz lietoto mehānisko protēžu mehāniskā noturība ir apbrīnojama, ņemot vērā apstākļus, kādos tām jādarbojas un jāveic ~40 000 000 slēgšanās/atvēršanās cikli gadā. Ņemot vērā asins kustības īpatnības un to, kā uzvedas šķidrumi vispār, ir secināts, ka visbiežāk trombi veidojas protēžu distālajā pusē, kur atrodas arī vairākas aprēķinātas asiņu stāzes zonas. Ņemot vērā mehānisko protēžu trombogenitāti, visiem pacientiem, kas jebkad ir saņēmuši

mehānisku protēzi ir obligāta asins antikoagulācija ar varfarīnu [171]. Kaut gan antikoagulantu lietošana ir relatīvi droša, to lietošana palielina nopietnas asiņošanas risku. Ja šāda nopietna asiņošana sākas, piemēram, kuņģa-zarnu traktā vai galvas smadzenēs, tai var būt potenciāli fatālas sekas. Ļoti reti ir gadījumi, kad nākas aizvietot protēzi tās malfunkcijas dēļ, taču trombembolijas risks saglabājas visu mūžu pēc mehāniskas protēzes implantācijas, pat ar apmierinošiem asins antikoagulācijas rādītājiem [174]. Mehāniskās protēzes tromboze ir ļoti nopietns sarežģījums ar potenciāli fatālām sekām, kas pieprasa vai nu akūtu reoperāciju, vai atsevišķos gadījumos – trombolīzi, trombozējušies mehāniska protēze redzama attēlā 3.10.



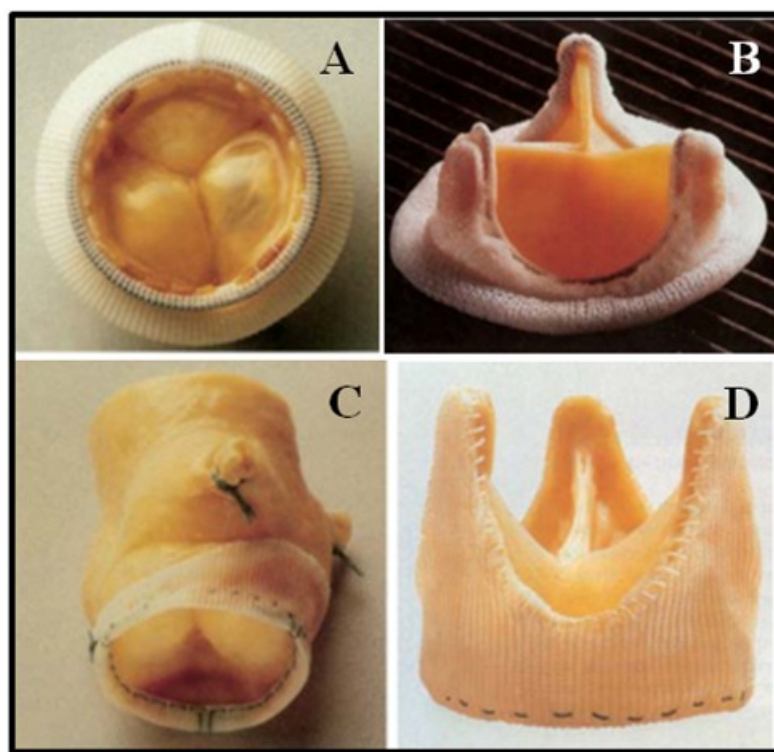
**3.10. att. Trombozējušies divviru mehāniska sirds vārstuļu
mehāniskā protēze**

Avots: Sirds Ķirurģijas centra arhīvs

3.5.3. Bioloģiskās sirds vārstuļu protēzes

Bioloģiskās sirds vārstuļu protēzes, jeb bioprotēzes, parasti ir veidotas no cūkas aortas vārstuļa lapiņu materiāla vai liellopa perikarda, kas vai nu ir iestiprināts īpašā karkasā – stentā vai ir bez tā, skatīt 3.11. att. Bioloģiskais materiāls, kas tiek izmantots bioprotēzēs, ir īpaši ķīmiski apstrādāts – fiksēts ar glutāraldehīdu. Šādu apstrādes

metodi ieviesa *Carpentier* 1969. gadā, lai stabilizētu kolagēna šķiedras izmantojamajā biomateriālā un mazinātu tā antigenitāti. Ksenoaortālas ar glutāraldehīdu apstrādātas bioprotēzes klīniskajā praksē tiek izmantotas kopš 1971. gada ar labiem panākumiem. Tās ir pierādījušas sevi kā labu alternatīvu mehāniskajām protēzēm ar izciliem dzīves kvalitātes rādītājiem, zemu trombembolijas un vārstuļa trombozes risku un brīvību no ar antikoagulantu lietošanu saistītām asiņošanām [174]. Šīs ir uzskatāmas par bioprotēžu galvenajām priekšrocībām. Bioprotēzes tiek uzskatītas par mazāk trombogēnām to viru dabīgā materiāla, aksiālās transvalvulārās asins plūsmas un neierobežotās viru kustības dēļ. Tā kā liela daļa bioprotēžu recipientu tiek vadīti bez antikoagulantiem, tad viņiem nepastāv ar to lietošanu saistīto komplikāciju, galvenokārt, asiņošanas risks. Pašreiz bioprotēzes tiek ieteiktas vecāka gadu gājuma cilvēkiem un sievietēm reproduktīvajā vecumā, kuras plāno grūtniecību nākotnē, jo varfarīna lietošana ir saistīta ar augstu embriopātijas un augļa nāves risku [38].



3.11. att. Bioprotēzes

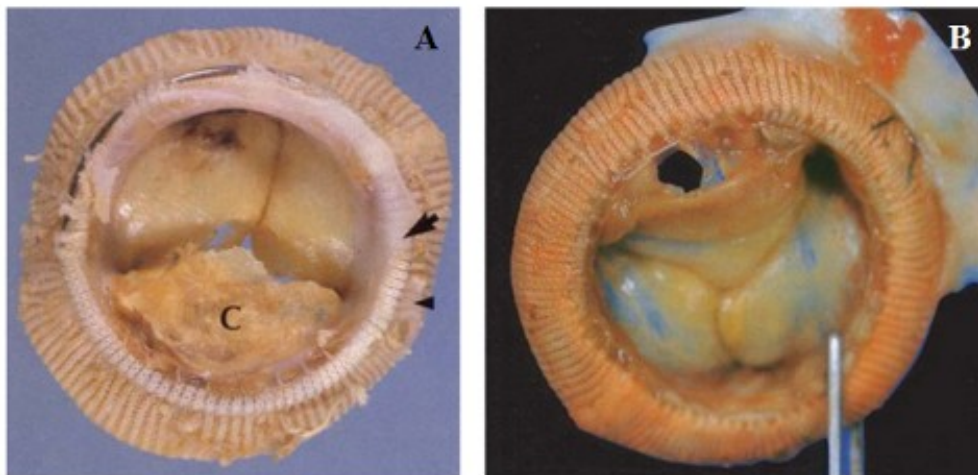
A) *Hancock* ksenoaortāla stentēta protēze; B) *Carpentier-Edwards* - ksenoperikardiāla bioprotēze; C) *Medtronic Freestyle* bez-karkasa bioprotēze; D) *St. Jude Medical Toronto SPV* bezkarkasa bioprotēze

Avots: [92]

Ir veikti vairāki pētījumi par bioprotēžu ilgmūžību, piemēram, *Rizzoli et al.* [130] ir pētījuši *Hancock II* ksenoaortālās protēzes: pēc 15 gadu apsekošanas brīvība no ar protēzi saistītas mirstības bija $84 \% \pm 3,5 \%$ un brīvība no trombembolijas, un asiņošanas attiecīgi $78,2 \% \pm 4 \%$ un $83,5 \% \pm 3,6\%$. Īpaši jāatzīmē, ka brīvība no strukturāliem vārstuļa bojājumiem bija daudz lielāka pacientiem vecākiem par 65 gadiem - $95\% \pm 3,0\%$ un $84,5\% \pm 3,5\%$. Šie rādītāji ir apstiprināti daudzos pētījumos un ir salīdzināmi dažādām komerciāli pieejamajām bioprotēzēm. Atbilstoši šiem rezultātiem arī pēdējās Eiropas un ASV vārstuļu kaišu ārstēšanas vadlīnijas iesaka pielietot bioprotēzes pacientiem pēc 65 gadu vecuma [14, 171]. Taču kaut arī pirmajos 5 gados pēc implantācijas protēžu audu bojājumi ir ļoti reti sastopami, pēc šī perioda to biežums pieaug. Sekojoši, kaut arī bioprotēžu hemodinamiskie rādītāji ir tikpat labi kā mehāniskajām protēzēm un tās ir pacientam daudz draudzīgākas, neradot mehānisku troksni atvēršanās un slēgšanās laikā, kā arī ir ar mazāku trombožu/asiņošanas risku, bioprotēžu pielietojums jaunākiem pacientiem ir ierobežots to neapmierinošās ilgmūžības dēļ. Vārstulim strukturāli nolietojoties, rodas atkārtotas intervences nepieciešamība. Kaut arī pēdējā dekādē ir parādījusies iespēja koriģēt bojātu bioprotēzi ar transkatetra vārstuļu protēžu implantācijas (TAVI) palīdzību, tā jebkurā gadījumā ir atkārtota procedūra ar noteiktu mirstības risku. Lai potenciāli uzlabotu bioloģiskas izcelsmes vārstuļu protēžu ilgmūžības rādītājus ir jāsaprot to deģenerācijas mehānismi.

3.5.4. Bioprotēžu deģenerācijas mehānismi

Strukturāli traucējumi bez infekcijas ir biežākais bioprotēžu disfunkcijas iemesls, tas kalpo par iemeslu aptuveni trīs ceturtdaļām no reoperācijām saistībā ar šiem implantiem. Varbūtējie iemesli bioprotēžu strukturālajiem traucējumiem ir sekojoši: 1) lapiņu mineralizācija (kalcifikācija) ar vai bez sekundāra plīsuma lapiņās, 2) nekalcificējoša lapiņu deģenerācija – materiāla nogurums, 3) ar protēzes dizaina kļūdām saistīti plīsumi tās lapiņās, skat. 3.12. att. [145, 184].



3.12. att. Aortas vārstuļa bioprotēžu bojājuma veidi

A) disfunkcija, ko izraisījusi vienas no virām vairāk asimetriska kalcinoze;

B) plīsums un perforācija bioprotēzes virā

Avots: [92]

No šiem bioprotēžu strukturālajiem traucējumiem pēdējam ir vairāk vēsturiska nozīme. Kā bojājuma mehānismi visbiežāk kombinējoties darbojas: 1) sprieguma koncentrācija lapiņu kalcinozes dēļ, 2) strukturālie bojājumi, kurus izraisa kalcija izgulsnēšanās, 3) materiāla nogurums nesaistīts ar kalcinozi. Kaut arī protēžu deģenerācijas mehānisms nav pilnībā skaidrs, ir pētījumi, kas norāda, ka galveno lomu spēlē kalcinoze, audu locīšanās izraisīts nogurums, stresa pārdale lapiņās, kur lielāka stresa rajonos lapiņas ātrāk deģenerējas un var pat perforēt [51, 62, 180].

Vārstuļu protēžu lapiņu kalcifikāciju var iedalīt iekšējā un ārējā. Iekšējā kalcifikācijas gadījumā kalcija sāļi izgulsnējas paša biomateriāla ietvaros un skar tā sākotnējos komponentus. Šīs kalcinozes fokusi parasti ir nodulāras struktūras, bieži trausli, bāli dzeltenīgā nokrāsā un visbiežāk izvietojas komisūru stiprināšanās vietās un lapiņu bazālās piestiprināšanās vietās – vietās, kur ir vislielākais dinamiskais materiāla kustīgums un deformācijas sirds cikla laikā [147]. Pirmie kalcinozes fokusi parasti parādās *fibrosa* slānī, bet vēlāk tie dominējoši pārņem *spongiosa* slāni – tie saistās ar saistaudu šķiedrām un atlikušajām šūnām [145]. Savukārt jau pat neliela kalcinoze rada materiāla mehānisko un dinamisko īpašību izmaiņas, kas savukārt noved pie paaugstināta mehāniskā sprieguma zonu attīstības vārstulī [145]. Ārējā kalcinoze veidojas uz struktūrām, kas sākotnēji neietilpst vārstuļa protēzes sastāvā, piemēram, uz trombiem, endokardīta veģetācijām vai pseidoīntīmas. Ja ārējie kalcija depozīti var

izveidoties pat dažu dienu laikā, tad iekšējai kalcinozei, lai tā kļūtu klīniski nozīmīga, ir vajadzīgi vairāki gadi, kamēr kalcinoze ir pietiekami liela, lai tā ietekmētu lapiņu mehāniskās īpašības, tai skaitā, materiāla rigīdumu, kas veicina pašu lapiņu disfunkciju, kā arī var veicināt protēzes strukturālo bojājumu, piemēram, plīsumu rašanos.

3.5.5. Bioprotēžu fiksējošo karkasu mehāniskās īpašības

Pirmās paaudzes bioprotēzes tika izgatavotas no augsta spiediena apstākļos fiksētām cūkas aortas vārstu lapiņām, kas tika iestiprinātas pilnībā rigīdos stentos - karkasos. Šāda tipa protēzes agrīni bojājās – bieži tika novēroti lapiņu plīsumi tuvu to piestiprināšanās vietai pie karkasa [176]. Negatīvo rezultātu ietekmē bioprotēžu dizains tika izmainīts un tapa bioprotēžu 2. paaudze ar padevīgiem fiksējošajiem karkasiem un pie citādiem apstākļiem fiksētām vārstu lapiņām [176]. Veicot datormodelēšanas eksperimentus, *Christie* [29] nonāca pie secinājuma, ka elastīga karkasa priekšrocības izpaužas spējā daļu no mehāniskā sprieguma no vārstu lapiņām pārvadīt uz stentu, tam pildot amortizatora funkciju. Diemžēl vēl joprojām nav veikti korekti eksperimentāli pētījumi, lai pierādītu un izvērtētu stenta padevīguma pakāpes nozīmīgumu bioprotēžu ilgmūžības nodrošināšanai [176]. Taču, ir zināmas vairākas 2. paaudzes bioprotēzes, ar padevīgiem fiksējošajiem karkasiem, ar ļoti labiem attālajiem rezultātiem pat līdz 20 gadiem un vairāk pēc implantācijas, ieskaitot *Medtronic Intact*, *St Jude Biocor* (Epic) un *Carpentier-Edwards Standard* [43, 44, 71, 113].

Kaut arī katrs ķirurgs zina, ka visām modernajām standarta bioprotēzēm ir padevīgi fiksējošie stenti, nav pieejami publicēti dati par to, cik gan īsti deformējami tie ir. Šāda tipa informācija būtu ļoti svarīga inženieriem, kuri izstrādā jaunas bioprotēzes un trans-katetra stentprotēzes. Loģiska pieeja šim jautājumam iespējams būtu kopēt dabu un pielāgot stentu īpašības aortas saknes radiālās stiepjamības īpašībām sinotubulārā savienojuma līmenī. Var pieņemt, ka tieši šādi ir rīkojušās medicīnas kompānijas, kuras ražo vārstu protēzes, taču drošu datu, kas to apstiprinātu iztrūkst.

3.5.6. Alternatīvas protezēšanas iespējas – audu inženierija

Audu inženierija parasti sākas ar šūnu izsēšanu uz poraina trīsdimensiju substrāta – matricēs, kas var būt gan sintētiskas, gan dabīgas izcelsmes. Turpmākajā inkubācijas periodā, kas var notikt gan *in vivo*, gan *in vitro*, uzstās šūnas dalās un ražo ekstracelulārās matricēs komponentus, kas piesaista ūdeni un rada dabīgiem audiem līdzīgas struktūras iespaidu. Inkubācijas perioda laikā matricēs materiāls tiek pakāpeniski nomainīts ar *de novo* sintezētajām saistaudu šķiedrām. Gala rezultātā inženierijas ceļā radītie audi satur tikai šūnas un to radīto ekstracelulāro matrici, bez sākotnējās matricēs materiāla [170].

Ja tiek izmantota matrice, kas nenoārdās, vai noārdās tikai daļēji, tad šādu pieeju var saukt par biohibrīdu. Šādas pieejas pamatā ir ideja kombinēt sintētisko materiālu izturību ar biosaderību, ko nodrošina dabīgie audi, konkrētāk, endotēlijs. Šīs idejas guva popularitāti 1990-tajos gados, kad bija arī mēģinājumi noklāt mehānisko vārstuļu protēžu virsmu ar endotēlija šūnām. Šie mēģinājumi bija neveiksmīgi, jo šūnas nespēja noturēties uz protēzes virsmas pēc saskares ar asins plūsmas radītajiem berzes spēkiem [11]. Biohibrīdu vārstuļu gadījumā, kad par pamatu tiek izmantotas bioprotēzes, galvenais sagaidāmais ieguvums bija rezistences pret kalcifikāciju pieaugums un samazināta imūno šūnu aktivācija, slēpjot antigēnās struktūras zem endotēlija šūnu slāņa [168]. Pamatā bija mēģinājumi modificēt vārstuļu protēžu materiāla virsmu, lai palielinātu endotēlija šūnu piesaisti pie tās. Kaut arī tika sasniegti relatīvi labāki rezultāti pārklājot bioprotēžu virsmu ar endotēlija šūnām, īpaši tām bioprotēzēm, kuru materiāla fiksācijai tika lietoti citi līdzekļi nevis glutāraldehīds [60, 72, 185], nebija pārliecības, vai tas varētu uzlabot šo protēžu ilgmūžību. Šāda pieeja neatrisina noguruma radīto bojājumu reparācijas jautājumu, kā arī augšanas un reģenerācijas problēmu, kas īpaši svarīga pediatrikajiem pacientiem. Tādējādi, ņemot vērā izmaksas, kas nepieciešamas biohibrīdu protēžu radīšanai un neskaidro klīnisko ieguvumu no šādas stratēģijas, pēdējos gados šī pieeja ir daudz mazāk aktuāla, kā audu inženierija.

Skatot audu inženierijas metodes, kuras ir populāras pašreiz, var izdalīt divus galvenos virzienus: 1) izmantojot biodegradablas sintētiska materiāla matricēs un 2) decelularizācijas pieeju, kad par matrici tiek izmantoti no šūnu materiāla atbrīvoti cilvēka vai cūkas aortas vārstuļa audi.

Pionieri biodegradabla sintētiskā materiāla izmantošanā sirds vārstuļu audu inženierijas mērķiem bija Džona Meijera laboratorija no Bostonas Bērnu slimnīcas, tādēļ bieži šī pieeja tiek dēvēta par Meijera metodi [66]. Sākotnēji vaskulārās gludās muskulatūras šūnas, kas tika izolētas no ekscidēta aitas asinsvada, tika uzstētas uz sintētiska materiāla matricēs, inkubētas dažas nedēļas *in vitro* un tad implantētas atpakaļ aitas organismā kā autotransplants. Tika novērota šāda autotransplanta apmierinoša funkcija līdz pat 20 nedēļām [66]. Saprotams, ka vaskulārās gludās muskulatūras šūnu ieguve būtu saistīta ar nepieņemamu traumu pacientam, tādēļ ir pārbaudīti dažādi citi šūnu veidi kā, piemēram, kaulu smadzeņu cilmes šūnas un nabas saites šūnas [64, 65]. Šīs šūnas var iegūt ar mazāku traumu pacientam un, ņemot vērā to lieliskās proliferācijas spējas, tās varētu kļūt par labu šūnu avotu vārstuļu audu inženierijas mērķiem. No sintētiskajiem materiāliem, kas jau pierādījuši sevi kardiovaskulārās sistēmas audu inženierijas mērķiem, ir poliglikols [150], PGA (poliglikolskābe) [151], PLA (polilaktāts) un PLGA (PGA un PLA kopolimērs) [192]. Šie materiāli ir apstiprināti ķirurģiskai lietošanai, tie ir biosaderīgi un biodegradabli. Galvenā sintētisko materiālu priekšrocība ir iespēja tos ķīmiski modificēt, lai varētu mainīt to biodegradācijas ātrumu, pielāgojot to konkrētajām vajadzībām. Piedevām šo materiālu matricēs viegli iekļaut dažādas specifiskas olbaltumvielas, piemēram, augšanas faktorus, kas var veicināt specifisku audu augšanu [67, 191].

Decelularizācijas pieejas gadījumā visbiežāk tiek pielietots cūkas aortas vārstulis, kā *Synergraft; Cryolife, Inc., Atlanta, GA* [116]. Šinī gadījumā cūkas aortas vārstulis netiek apstrādāts ar glutāraldehīdu, kā veidojot bioprotēzes, bet gan ar deterģentiem, piemēram, *Tween 20* vai *Triton 100*, atstājot saistaudu šķiedras – kolagēnu un elastīnu neizmainītas. Hipotēze ir, ka pēc implantācijas šīs dabīgās šķiedras veicinās šūnu infiltrāciju un decelularizēto audu repopulāciju ar paša pacienta saistaudu šūnām, kas pēc tam varētu aktīvi veikt audu reparāciju un remodelēšanos līdzīgi kā natīvos audos. Kaut arī šī pieeja šķiet ļoti pievilcīga, jo šie decelularizētie audi atbilst natīviem pēc to mehāniskajām īpašībām un tiem piemīt dabīga bioaktivitāte, tomēr pastāv arī vairāki riski, ieskaitot potenciālu vīrusu un prionu pārnesi un fundamentālu problēmu – nefiksēto audu imunogenitāti. Ir ziņots par agrīnām klīniskām neveiksmēm ar šāda tipa vārstuļiem pediatriem pacientiem, kas varētu būt audu nepilnīgas decelularizācijas un tās izsauktas imūnās atbildes dēļ un kas rezultējās 75% letalitātē [116].

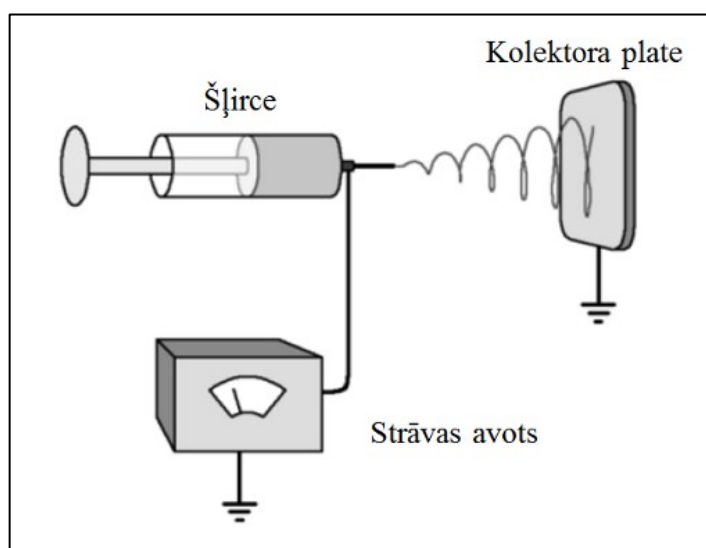
Pašlaik audu inženierija galvenokārt ir pievērsusies tikai mēģinājumiem radīt aizvietotājus semilunārajiem vārstuļiem, jo to struktūra nav tik sarežģīta kā atrioventrikulāro vārstuļu uzbūve. Tā kā natīvais aortas vārstulis ir uzskatāms kā „zelta standarts” audu inženierijai, tieši palielinātā audu inženierijas popularitāte ir rosinājusi arī jaunu pastiprinātas intereses vilni par sirds vārstuļu anatomiju, ultrastruktūru un biomehāniku.

3.5.7. Matrices sirds vārstuļu audu inženierijai

Matrices, kuras izmanto audu inženierijā, tiek veidotas, lai atdarinātu strukturālās, ķīmiskās un mehāniskās natīvās ekstracelulārās matrices īpašības. Sirds vārstuļa lapiņu uzbūves pamatā ir nanometru izmēra kolagēna šķiedras, kas ir savītas ar hidratētu glikozaminoglikānu tīklu un elastīgajām šķiedrām [6, 95]. Šis šķiedru tīklojums ne tikai nodrošina audu mehānisko izturību, bet arī nodrošina ārējo stimulu pārnesi šūnām, kas kalpo, lai producētu molekulāros signālus [56, 57]. Adu inženierijai izmantojamās matrices tiek veidotas, lai atdarinātu ekstracelulārās matrices strukturālās īpašības, īpaši, nanometru diametra šķiedras un savstarpēji savienotu poru sistēmu. Bez šīm strukturālajām īpašībām matricēm nepieciešama ķīmiskā uzbūve, kas veicina šūnu-matrices mijiedarbību, mehānisko izturību un biodegradācijas pakāpi, kas atbilst ekstracelulārās matrices *de novo* sintēzes ātrumam, lai būtu iespējama matrices aizvietošana ar jauniem audiem, nezaudējot protēzes funkcionālo izturību [123, 124].

Pastāv dažādas ražošanas metodes, lai izgatavotu matrices, kas atbilst šādām īpašībām, ieskaitot fāzu separācijas metodi [164, 189], ekstrūziju [25, 164, 188], hidrogēlu veidošanu [49] un polimēru nanošķiedru elektrovērpšanu (*electrospinning*) [96]. Kaut visām šīm metodēm piemīt potenciāls matriču radīšanai, taču elektrovērpšana ir viena no perspektīvākajām, jo ar tās palīdzību var veidot matrices no ļoti dažādiem materiāliem, tā ir salīdzinoši lēta un reproducējama. Elektrovērpšanas principa pamatā ir elektriskās strāvas pieslēgšana pie šļirces adatas gala, kura ir uzpildīta ar vajadzīgā polimēra šķīdumu – 3.13. att., kad uz adatas gala veidojas šķīduma piliens, tas, pārvarot virsmas sprieguma spēkus, virzās uz lādētā kolektora pusi elektriskā lauka ietekmē, kas izveidojies starp kolektoru un elektriski lādēto adatas galu. Tā rodas ļoti tieva polimēra šķīduma strūkļa, kas tiek orientēta kolektora virzienā [127]. Polimērs tiek izstiepts ļoti tievās šķiedrās virzienā no piliena adatas galā līdz

iezemētajam kolektoram. Šī procesa laikā šķīdinātājs iztvaiko, vēl vairāk samazinot radītās polimēra šķiedras diametru, kas beigās kā nejauši orientēts šķiedru tīklojums veido polimēra nanošķiedru matrici uz kolektora virsmas. Šķiedru diametrs ir atkarīgs no polimēra šķīduma koncentrācijas, plūsmas ātruma, šķīdinātāja un šķīduma virsmas sprieguma spēka [28]. Kontrolēti kustinot vai rotējot kolektoru ir iespējams panākt nanošķiedru orientāciju kādā konkrētā virzienā. Šo metodi viegli pielāgot arī liela apjoma produkcijai, kā izejmateriālus var izmantot ļoti dažādus dabīgos un sintētiskos polimērus.



3.13. att. Shematisks elektrovērpšanas darbības principa atainojums

Avots: <http://www.neotherix.com/technology.php>.

Lai radītu matricas audu inženierijai ir tikuši izmantoti dažādi sintētiskie materiāli, tai skaitā, polilaktāts [8, 49], poliglikolskābe [8, 49], poliakrilāts [49], polikaprolaktons [8, 49]. Alternatīvi arī dažādi dabā sastopami polimēri var tikt izmantoti elektrovērpšanai, piemēram, kolagēns [27, 91, 100, 188], fibrinogēns [103], želatīns [91, 190].

Matricas mehāniskās īpašības ir ļoti nozīmīgs faktors, kas jāņem vērā, veidojot šī materiāla dizainu audu inženierijas mērķiem. To mehāniskās īpašības nosaka arī audus veidojošo šūnu veselīgumu un arī to fenotipu. Cilvēka natīvajos audos ekstracelulārā matrice ir tā, kas nodrošina audu integritāti [95], tā kā sintētiskās matricēs uz laiku kalpos par ekstracelulāro matrici, tām jānodrošina mehānisks atbalsts audiem pirms nav notikusi pilnīga jauno audu noformēšanās vai remodelācija. Tā dažkārt ir

problēma, jo nereti audu inženierijas ceļā iegūtie audi ir mehāniski neizturīgāki par natīvajiem tieši to matricēs nepietiekamās izturības dēļ [80]. Matricēs deformējamība arī ir nozīmīga, jo ir pierādīts, ka tā regulē dažādu šūnu uzvedību, tai skaitā šūnas-matricēs adhēziju [48, 120], kustīgumu [37, 94], diferenciāciju [88, 89], fenotipu [35, 119] un apoptozi [26]. Kaut arī pastāv metodes, kas ļauj atdarināt ekstracelulārās matricēs strukturālās un ķīmiskās īpatnības, ir problēmas tieši atdarināt tās mehāniskās īpašības [80]. Piemēram, natīvajos audos sastopamajam kolagēnam piemīt zema mehāniskā izturība un tas bieži noārdās saskarē ar ūdeni, neskatoties uz to, ka tas tiek iegūts no dabiskiem avotiem [36]. Problēma ir metodēs, kas tiek izmantotas, lai iegūtu kolagēnu, kas sabojā tā strukturālās īpatnības, samazinot tā mehānisko izturību. Lai cīnītos ar šīm problēmām tiek pielietotas dažādas metodes, tai skaitā, ķīmiska šķērssaišu radīšana, kopolimerizācija, kā arī polimēru jaukšana [50, 63].

3.5.8. Sirds vārstuļu protēzes no polimēru materiāliem

Polimēru vārstuļu protēzes no lokanas sintētiskas membrānas tika radītas ar mērķi pārvarēt trūkumus, kuri piemīt mehāniskajām un bioloģiskajām sirds vārstuļu protēzēm – trombogenitāti un ierobežotu ilgmūžību, respektīvi. Realitātē pašlaik šo mērķi joprojām nav izdevies sasniegt. Polimēru vārstuļu protēzes ir piedzīvojušas neveiksmes to trombogenitātes, kalcifikācijas, materiāla degradācijas oksidācijas un augsta dinamiskā sprieguma dēļ [12, 40, 41, 68, 97]. Nepareiza materiālu izvēle un neveiksmīgs vārstuļa dizains ir minēti kā galvenie neveiksmju iemesli.

Polimēru vārstuļa protēzes ideja ir jau pietiekami sena. *Roe* uzsāka fleksibla silikona gumijas vārstuļa implantācijas cilvēkiem 1958. gadā. Augstie mirstības un morbiditātes rādītāji piespieda agrīni pārtraukt šo pētījumu [41]. Neilgi pēc tam *Braunwald* implantēja politetrafluoretilēna vārstuļa protēzes aortas pozīcijā 23 pacientiem. Mirstība bija augsta materiāla kalcinēšanās un viru plīsumu dēļ. Vēl divus klīniskos pētījumus veica *Roe* 1966. gadā ar kombinētu dakrona un silikona protēzi un *Hufnagel* 1977. gadā ar vienas viras dakrona protēzi. To rezultāti bija slikti – ar augstu mirstību. Pateicoties vārstuļu bioloģisko un mehānisko protēžu panākumiem polimēra protēžu implantācija tika pārtraukta 80-tajos gados, taču pētījumi šajā jomā turpinājās. Visvairāk pētītas ir polimēru protēzes no poliuretāna (PUR) un dažādām tā modifikācijām. PUR biodegradācija vienmēr ir sagādājusi problēmas [12, 121], kā arī ir

novērota kalcifikācija, trombu veidošanās un izturības trūkums [12, 41, 97], kas traucē šo protēžu turpmākai izmantošanai. Taču PUR ir viens no vislabāk piemērotajiem materiāliem izturības un lokanības ziņā, lai radītu trīsviru protēzes, tādēļ *Bernaca et al.* [12] izmantojot modificētu PUR – EV3.34 ar diamīna ķēdi un EV 3.35 ar diola ķēdi, radīja savu vārstuļa modeli. Šādas modifikācijas kavē PUR biodegradāciju un pēc 6 un 9 mēnešu implantācijas 18 mēnešus vecām aitām nebija novērota trombu veidošanās, kalcifikācija, fibrīna izgulsnēšanās vai mehāniska noārdīšanās [12]. Taču jāņem vērā, ka aitu modelis nav ideāli piemērots kalcifikācijas pētīšanai, kā arī trombu veidošanās aitām notiek daudz retāk kā cilvēkiem, tādēļ pāragri spriest par šī dizaina klīnisko nozīmīgumu [12, 41].

Vārstuļu izturīgums nav atkarīgs tikai no izvēlēta polimēra, bet arī no vārstuļa dizaina un ražošanas procesa. Kā tas ir pierādījies ar PUR vārstuļiem, kalcija sāļi galvenokārt izgulsnējas pastiprināta mehāniska sprieguma rajonos, kuros sākotnēji rodas mehāniskas mikrotraumas, kas kalpo kā piesaistes punkti kalcifikācijai [97]. Izteikti lieli stiepes un spiedes spēki, kas rodas vārstuļa lapiņām dinamiski kustoties, ir tie kas noved pie to disfunkcijas. Ir mēģināts dažādi cīnīties ar šiem negatīvajiem efektiem, gan mainot lapiņu ģeometriju, gan variējot ar fiksējošā karkasa dizainu, bet vadoties pēc *Cacciola et al.* un *De Hart et al.* [22, 23, 42] atbilde varētu būt nostiprinošu šķiedru integrācijā vārstuļu lapiņu materiālā. Šis koncepts gan nav pārbaudīts ar reāliem protēžu modeļiem, bet gan tikai datorā modelēšanā, kur pēc augstāka elastības moduļa šķiedru integrācijas lapiņu materiālā tika panākta pat 60–75% sprieguma redukcija pamata materiālam [23, 42]. Realizējot šo dizainu dzīvē vajadzētu būt iespējamam radīt vārstuli ar neierobežotu kustīgumu, vārstulim atveroties un slēdzoties, un ar pietiekamu izturīgumu, kamēr vārstulis ir slēgts.

4. MATERIĀLS UN METODES

Eksperimentālie pētījumi veikti ar Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Attīstības biedrības klīniskās izpētes ētikas komisijas atļauju, pielikums 13.3., 119. lpp.

Iestādes, kurās veikti eksperimentālie pētījumi:

- VSIA Paula Stradiņa KUS, Sirds ķirurģijas centrs, Rīga, Latvija;
- Rīgas Stradiņa universitāte, Biomehānikas laboratorija, Rīga, Latvija;
- Rīgas Stradiņa universitāte, Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūts, Rīga, Latvija;
- Centre hospitalier universitaire vaudois – CHUV, Lozanna, Šveice.

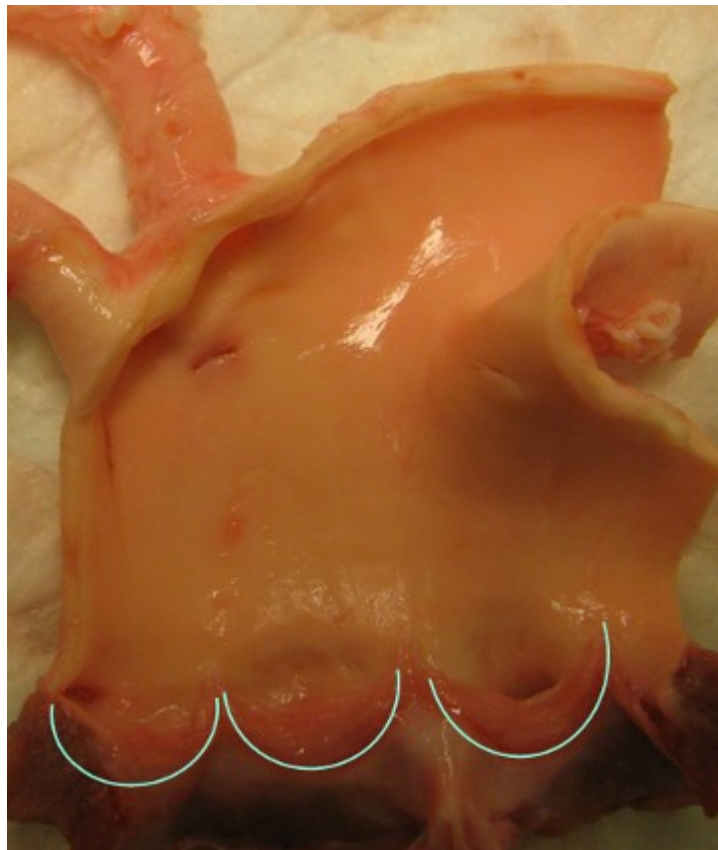
4.1. Aortas vārstuļa un bioprotēžu lapiņu mehānisko īpašību noteikšana

Vadoties pēc *Mavrlias* un *Missirlis* un mūsu grupas [73, 101] agrāk veiktajiem vienass noslogojuma testiem ar natīviem un ķīmiski apstrādātiem cūkas un cilvēka aortas vārstuļiem, kopumā to īpašības ir salīdzināmas. Natīvam cūkas vārstuļu materiālam piemīt tikai salīdzinoši nedaudz lielāka deformējamība un mazāka rigiditāte, kā cilvēka vārstuļu materiālam. Tādēļ manā pētījumā tika izvēlēts cūkas aortas vārstuļa materiāls galvenokārt tā pieejamības dēļ, salīdzinājumā ar patoloģiski neizmainītu cilvēka vārstuļu audu materiālu. Salīdzinājums ar agrāk gūtajiem datiem par cilvēka vārstuļa mehāniskajām īpašībām netika veikts, atšķirīgo izmantoto testēšanas ierīču dēļ agrākajos pētījumos un tagad, kas radītu lielu kļūdu salīdzināmajos datos.

4.1.1. Natīvie cūkas aortas vārstuļi

Mehānisko īpašību pētījumiem izmantojām aortas vārstuļu lapiņas, kas tika iegūtas no 10 cūku sirdīm, kas tika iegādātas no kautuves, ne vēlāk kā 24 stundu laikā pēc dzīvnieka nāves iestāšanās. Vārstuļu lapiņas tika ekscidētas gar to pamatni (attēls 4.1.) un uzglabātas fizioloģiskajā šķīdumā maksimāli līdz 12 h pirms testu veikšanas. No aortas vārstuļa lapiņām tika sagatavoti paraugi 12 garenvirzienā un 13 radiālā virzienā kā parādīts 4.2. attēlā, izgriežot vismaz 15 mm garus un tieši 3,5 mm platus

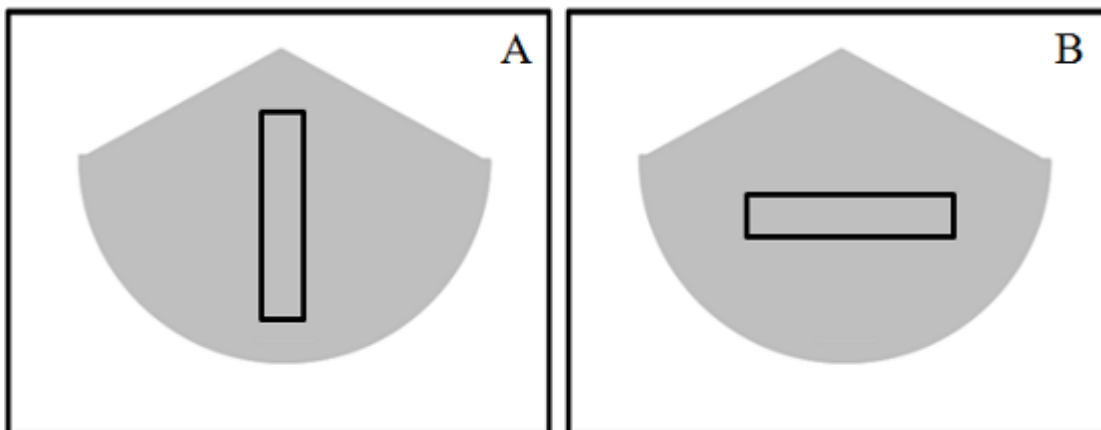
paraugus. Paraugu biezums tika izmērīts ar katetometru *MK-6* (LOMO, Sanktpēterburga, Krievija) ar precizitāti $\pm 0,01$ mm. Mērījumi tika veikti *Zwick/Roell BDO-FB0.5TS* vienass noslogojuma stendā aprīkotā ar 50 N spēka tenzodevēju, kas pieslēgts datoram ar testXpert ierīces vadības un datu analīzes programmu. Paraugi tika deformēti ar 5 mm/min ātrumu līdz parauga saplīšanai. Maksimālā (graujošā) deformācija un spriegums tika noteikti katram paraugam. Paraugu cietība tika izteikta kā pieskares elastības modulis (E) sprieguma-deformācijas līknes lineārajā daļā.



**4.1. att. Cūkas aortas sakne ar aortas vārstuli,
ascendējošā aorta un aortas loks, griezumus
pa lielo kurvatūru.**

Ar gaišām līnijām iezīmētas griezumuma līnijas, ekscidējot
aortas vārstuļa lapiņas pētījuma vajadzībām.

Avots: Foto no personīgā arhīva.



4.2. att. Virzieni kādos tika izgriezti paraugi no aortas vārstuļa lapiņām

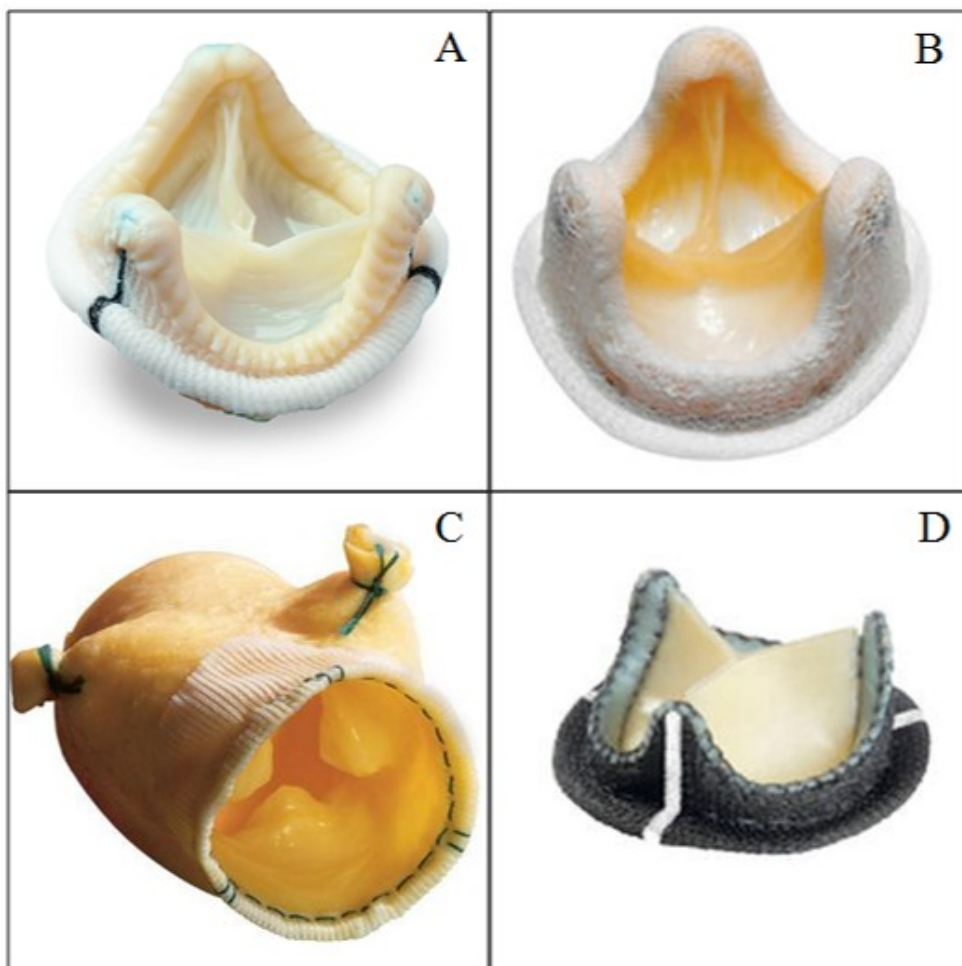
A) radiālais un B) garenvirziens.

4.1.2. Pētījumā izmantotās aortas vārstuļa bioprotēzes

Ar natīvo vārstuļu materiālu salīdzināju trīs dažādas ksenoaortālas bioprotēzes, no katras pārbaudot pa trim: 3 *EPIC* bioprotēzes (St. Jude Medical, Minesota, ASV), 3 *Hancock II* bioprotēzes (Medtronic Inc., Mineapole, Minesota, ASV), 3 *Freestyle* bezkarkasa bioprotēzes (Medtronic Inc., Mineapole, Minesota, ASV). Lai novērtētu, cik lielā mērā atšķiras bioprotēzes no cita materiāla, pārbaudīju arī 3 ksenoperikardiālas bioprotēzes *Sorin Soprano* (SORIN S.p.A., Milāna, Itālija), kas izgatavotas no apstrādāta liellopa perikarda. Paraugi tika iegūti no bioprotēzēm, kuru derīguma termiņš bija tikko beidzies (līdz 4 nedēļām pēc termiņa beigām). Paraugi tika sagatavoti līdzīgi kā no natīvo vārstuļu lapiņām, līdzīgos virzienos kā atainots 4.2. attēlā. *St. Jude Medical* ksenoaortālo bioprotēzi *EPIC*, kas izgatavota no cūkas aortas vārstuļa lapiņām iestiprinātām polimēru materiāla karkasā (4.3. att. A) izvēlējās, jo tā un tās modifikācijas (*St. Jude Biocor*, *Epic-Biocor*) ir ar salīdzinoši ilgu lietošanas vēsturi [78, 87, 113], 90-to gadu beigās uzlabota ar modernu pretkalcifikācijas apstrādi [81]. *Medtronic Hancock II* (4.3. att. B), kas arī ir izgatavota no cūkas aortas vārstuļa lapiņām izvēlējās arī tās ilgstošās lietošanas vēstures un lielisko klīnisko rezultātu dēļ [172]. *Medtronic Freestyle* (4.3. att. C) ir vienīgā no pārbaudītajām bioprotēzēm, kas ir bez karkasa un pēc būtības ir vesela cūkas aortas sakne ar aortas vārstuli. Pašlaik gan ir pieejami tikai vidēja termiņa rezultāti par šo protēzi, kas ir apmierinoši [5, 52]. *Sorin Soprano* (4.3. att. D), savukārt, no

pārbaudītajām ir vienīgā ksenoperikardiālā bioprotēze, kas ir izgatavota no apstrādāta liellopa perikarda, arī ar labiem attālajiem rezultātiem [183].

Gan natīvo vārstuļu, gan bioprotēžu lapiņu testēšanas metodika ir aprakstīta detalizētāk šī darba sadaļā 4.3.2.



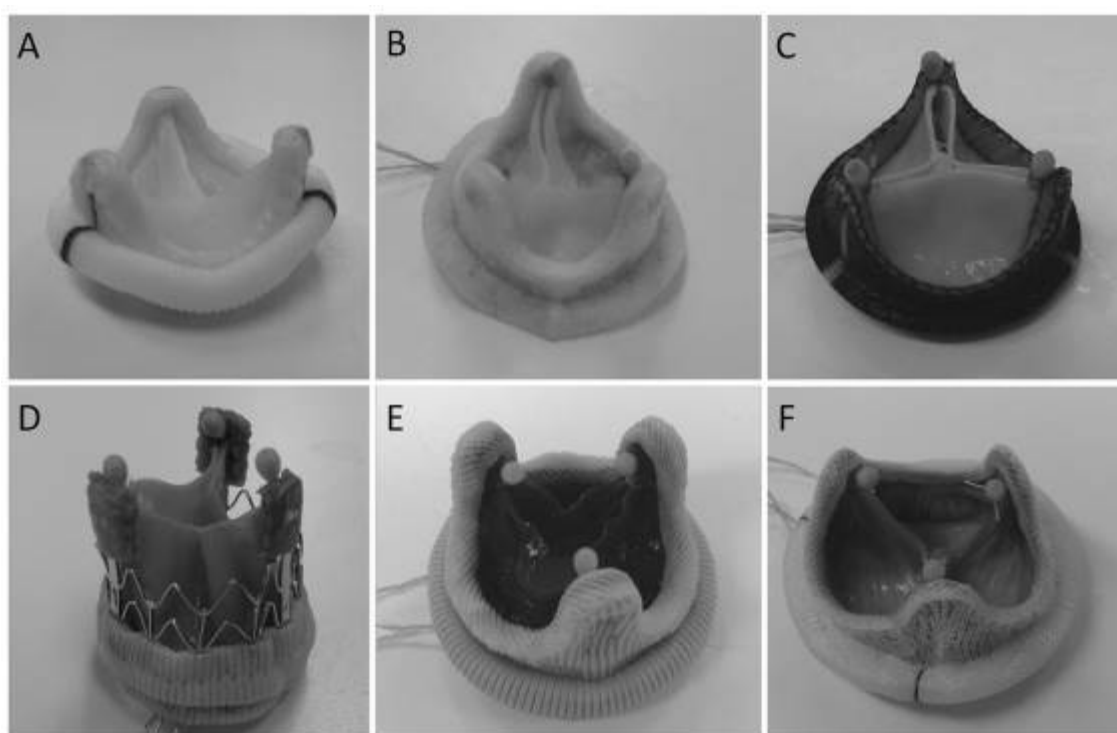
4.3. att. Pētījumā izmantotās bioprotēzes

A) *St Jude Medical Epic*, B) *Medtronic Hancock II*,
C) *Medtronic Freestyle*, D) *Sorin Soprano*

Avots: A) <http://cdn.medgadget.com/img/54355sjm2.jpg>;
B) http://img.medicalexpo.com/images_me/photo-g/aortic-valve-bioprosthes-porcine-70691-3020049.jpg; C) http://www.ctsnet.org/vendor_graphics/products/401.jpg;
D) http://img.medicalexpo.com/images_me/photo-mg/aortic-valve-bioprosthes-70922-96641.jpg

4.2. Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehānisko īpašību noteikšana

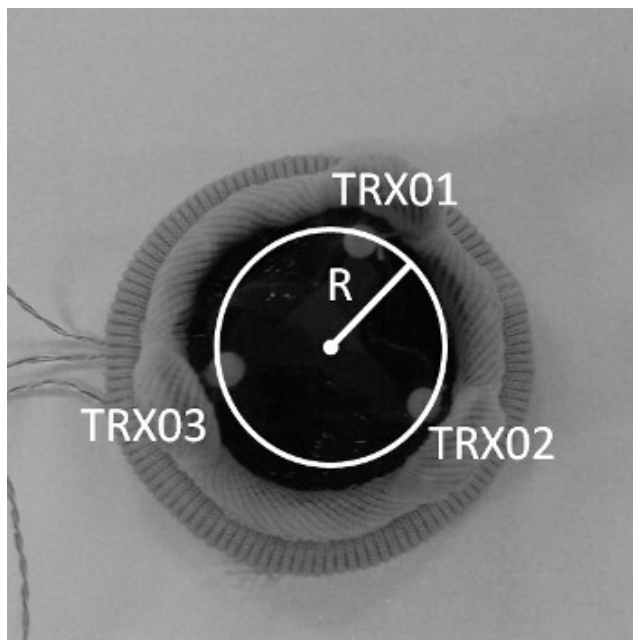
Fiksējošo karkasu deformājamības pētījumiem tika izmantotas sekojošas bioprotēzes: *Medtronic Intact* (Medtronic Blood Systems, Irvine, CA, ASV) ražota 1988.g. un *Carpentier Edwards Standard* (American Edwards Laboratories, Irvine, CA, ASV) ražota 1987. g. Abas bioprotēzes atradās oriģinālajā iepakojumā un bija uzglabātas istabas temperatūrā. Tās tika salīdzinātas ar 3 dažādu modeļu modernajām tradicionālajām bioprotēzēm ar zināmiem labiem vidēja un ilgtermiņa rezultātiem [113, 172, 183]: *St Jude Epic* (St. Jude Medical Inc., St. Paul, MN, ASV), *Medtronic Hancock II* (Medtronic Inc., Minneapolis, MN, ASV), *Sorin Soprano* (Sorin S.p.A., Milāna, Itālija) un *ATS* (ATS Medical Inc., Minneapolis, MN, ASV) stentprotēzi – *Enable* ar nitinola stentu implantācijai aortālā pozīcijā vaļējā ceļā. Minētās bioprotēzes redzamas 4.4. attēlā.



4.4. att. Pārbaudīto bioprotēžu fotoattēli

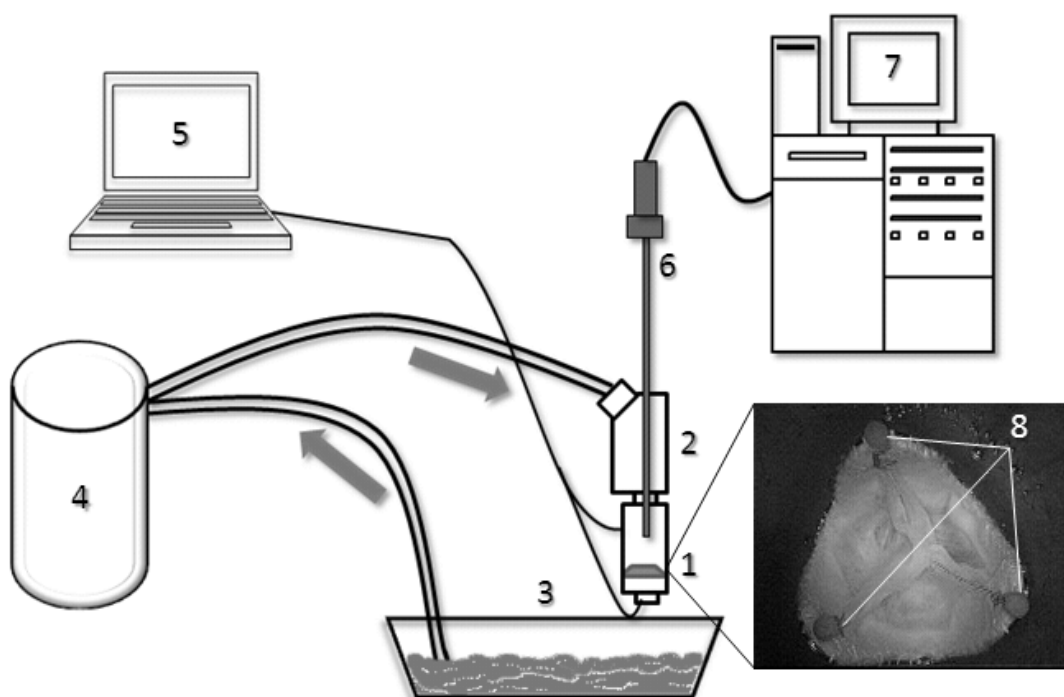
A – St. Jude Epic, B – Medtronic Hancock II, C – Sorin Soprano,
D – ATS 3F Enable, E – Medtronic Intact, F – Carpentier-Edwards Standard

Visas protēzes tika pārbaudītas pie 3 dažādiem transvalvulārā spiediena gradientiem: 0–10 mmHg, 70–90 mmHg un 120–140 mmHg, izmantojot 3 TRX 2mm sonomikrometrijas zondes (Sonometrics Corp., London, Ontario, Canada), kas tika fiksētas vārstuļu lapiņu komisūru piestiprināšanas vietās – 4.5. attēls.



4.5. att. Sonomikrometrijas zonžu izvietojums uz bioprotēzes un ap tām apvilkta riņķa līnija

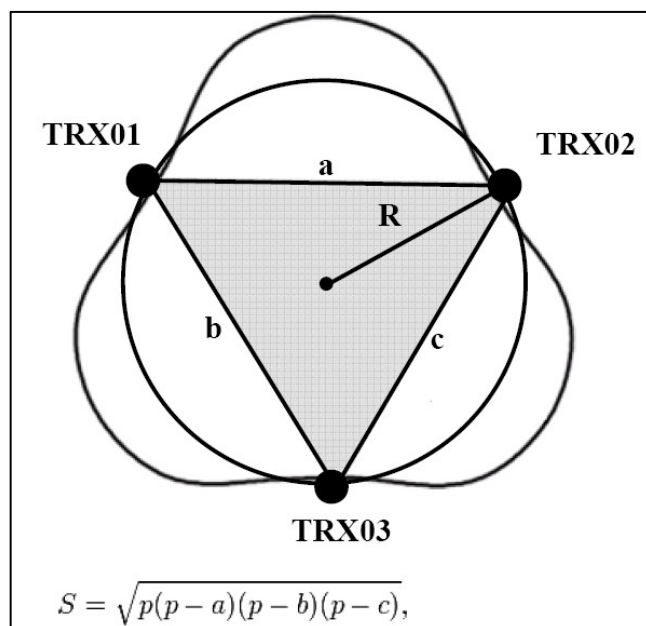
In vitro eksperiments tika veikts speciāli izveidotā testa sistēmā (skat. 4.6. attēlu). Lai izvērtētu dažādo protēžu karkasu mehāniskās īpašības, tika salīdzinātas ap trīs sonomikrometrijas zondēm apvilkta riņķa līnijas rādiusa vērtības dinamikā, mainoties transvalvulārajam spiediena gradientam.



4.6. att. Pētījumā izmantotās testēšanas iekārtas shēma

- 1 – protēzes fiksējošā kamera;
- 2 – kamera ar divām atverēm;
- 3 – konteiners ar istabas temperatūras 0,9% NaCl šķīdumu;
- 4 – oklūzijas sūkņi;
- 5 – sistēma reālā laika spiediena fiksēšanai;
- 6 – endoskops;
- 7 – endoskopa “tornis”;
- 8 – trīs sonomikrometra zondes fiksētas komisūru līmenī.

Vidējās rādiusa vērtības tika aprēķinātas pēc 3 mērījumiem no 2400 starpzonžu distanču vērtībām, kas tika iegūtas ar frekvenci 626 Hz. Aprēķinos tika pielietota formula $R = abc/4S$, kur a , b , c – attiecīgie starpzonžu attālumi un S – trīs zonžu izveidotā trīsstūra laukums, kas tika aprēķināts, izmantojot Hērona formulu (4.7. att.).



4.7. att. Shematisks skats uz aortas sakni no augšas sinusu līmeni

Attēlā atainota trīs sonomikrometrijas zonžu (TRX01, TRX02 un TRX03) atrašanās vieta, kā arī trīsstūris, kas izveidojas, savienojot šīs zondes savā starpā un riņķa līnija ar rādiusu R , kas apvilka ap šo trīsstūri. Attēlā parādīta arī Hērona formula, kura tika izmantota iekrāsotā trīsstūra laukuma S aprēķināšanai, kur p ir trīsstūra pusperimetrs

Papildus tika pielietota *Philips BV Pulsera* mobilā rentgeniekārta (Philips Medical Systems, Best, Holande), lai pārbaudītu divu vecāko bioprotēžu stentu integritāti.

Šie dati tika salīdzināti ar 3 cūku (svars: 51 ± 2 kg) aortas sakņu mehāniskajām īpašībām sinotubulārā savienojuma līmenī. Testa metodika bija līdzīga – 3 sonomikrometrijas zondes tika piefiksētas pie aortas sienas komisūru līmenī un aortas sakne tika iemontēta testa sistēmā, lai pakļautu sekojošiem spiedieniem: 0–10 mmHg, 70–90 mmHg un 120–140 mmHg. Procentuālās rādiusa izmaiņas tika noteiktas katrai atsevišķajai aortai, un no šīm vērtībām tika aprēķināta vidējā deformējamība $\pm$ standartnovirze.

Diastoles rādiuss aortas saknei un protēzēm tika aprēķināts pie transvalvulārā spiediena gradienta 70–90 mmHg, sistoles rādiuss – saknei pie 120–140 mmHg (atbilst spiedienam sistoles laikā), protēzēm pie 0–10 mmHg (atbilst transvalvulārā spiediena

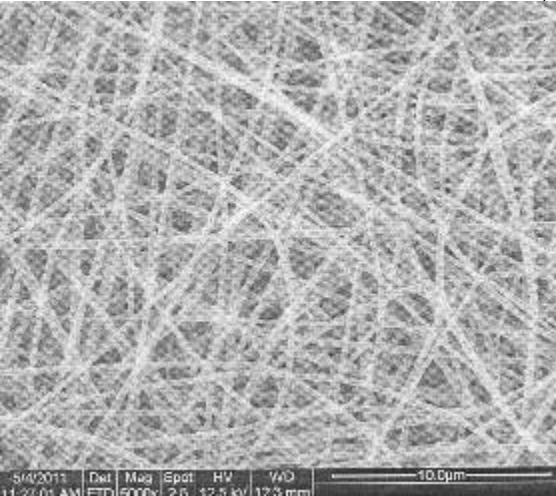
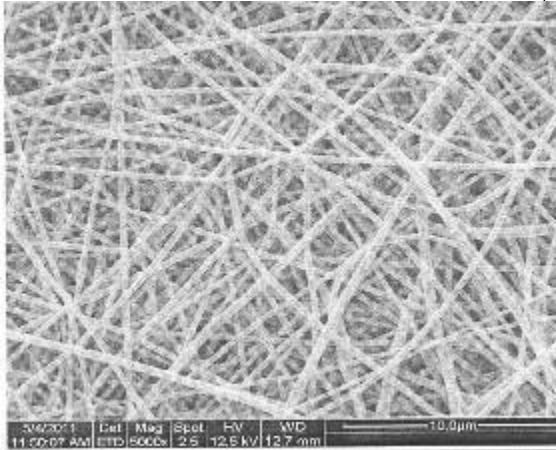
gradientam sistoles laikā). Deformējamība definēta kā relatīvais rādiusa pieaugums procentos, izmainot transvalvulārā spiediena gradientu no diastolei atbilstošā uz sistolei atbilstošu.

4.3. Polimēru nanošķiedru materiāla izmantošanas iespēju izvērtēšana vārstuļu lapiņu audu inženierijas mērķiem

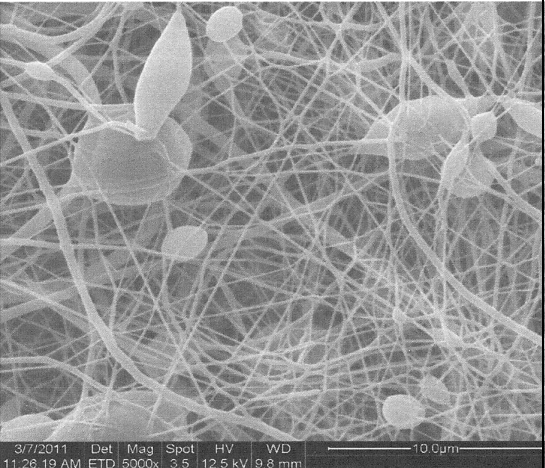
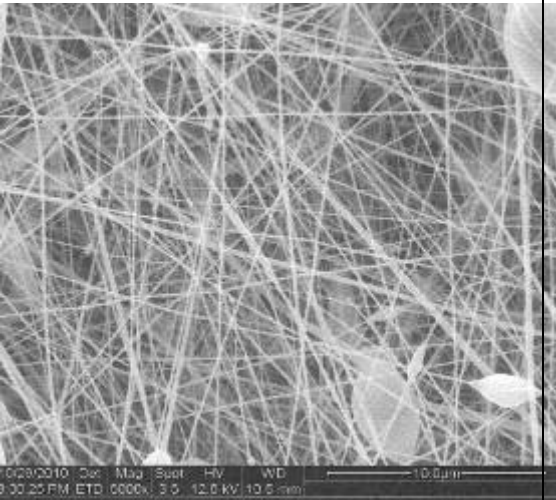
4.3.1. Nanošķiedru materiāli iegūti elektrovērpšanas ceļā

Ar elektrovērpšanas metodi radītie nanošķiedru materiāli tika izgatavoti pēc pasūtījuma Čehijas kompānijā *Elmarco* (Elmarco s.r.o., Liberec, Čehija) no vairākiem polimēru materiāliem, ieskaitot, želatīnu, poliuretānu, polilaktātu un polikaprolaktonu. Tie tika izgatavoti ar atšķirīgu nanošķiedru diametru un dažādu laukuma blīvumu. Materiāli tika izgatavoti pēc individuāla pasūtījuma, un *Elmarco* nodrošināja arī katra materiāla skenējošās elektronmikroskopijas attēlus. Visu materiālu biezums tika noteikts uz vietas izmantojot katetometru MK-6 (LOMO, Sanktpēterburga, Krievija) ar precizitāti $\pm 0,01$ mm. Mehānisko īpašību pētījumiem materiāls tika sagriezts 3,5 mm platos un 20 mm garos paraugos. Testēto materiālu apkopojums atrodams 4.1. tabulā. No katra materiāla sloksnes tika izgriezti 5 paraugi, kuriem tika pārbaudītas mehāniskās īpašības.

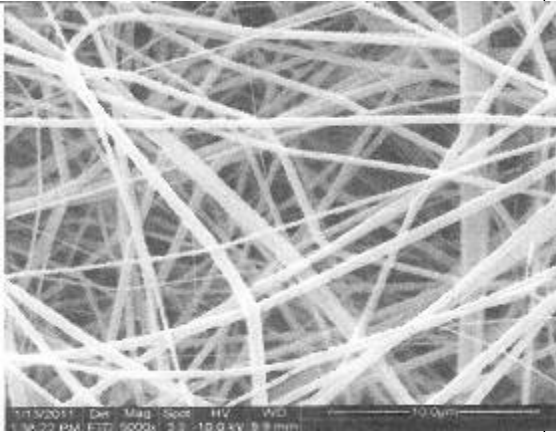
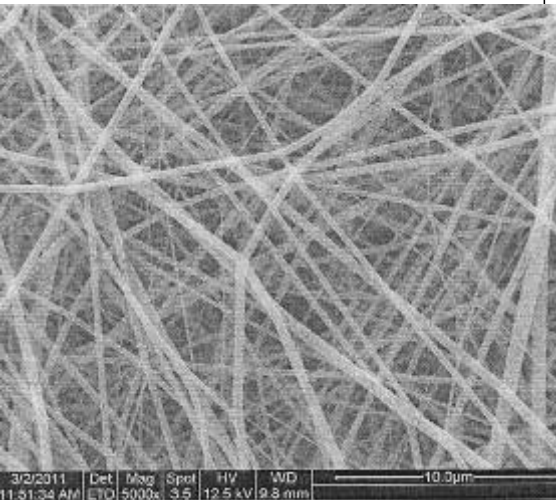
**Pētījumā izmantoti nanošķiedru materiāli, to laukuma blīvums
un šķiedru diametrs**

Polimērs	Laukuma blīvums, g/m ²	Materiāla biezums, mm / šķiedru diametrs, nm	Skenējošās elektronmikroskopijas attēls, palielinājums 5000 reizes
Poliuretāns	6,2	0,08/180–320	
Poliuretāns	10,4	0,11/210–340	

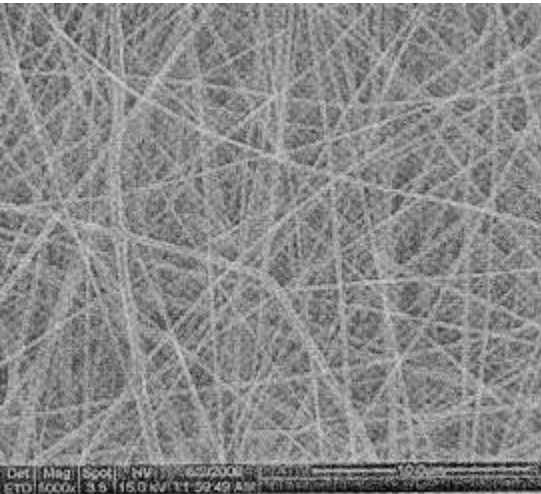
4.1. tabulas turpinājums

Polimērs	Laukuma blīvums, g/m ²	Materiāla biezums, mm / šķiedru diametrs, nm	Skenējošās elektronmikroskopijas attēls, palielinājums 5000 reizes
Polikaprolaktons	3,86	0,17/110–190	
Polikaprolaktons	12,0	0,32/150–200	Nav pieejams
Polikaprolaktons	15,7	0,39/70–270	

4.1. tabulas turpinājums

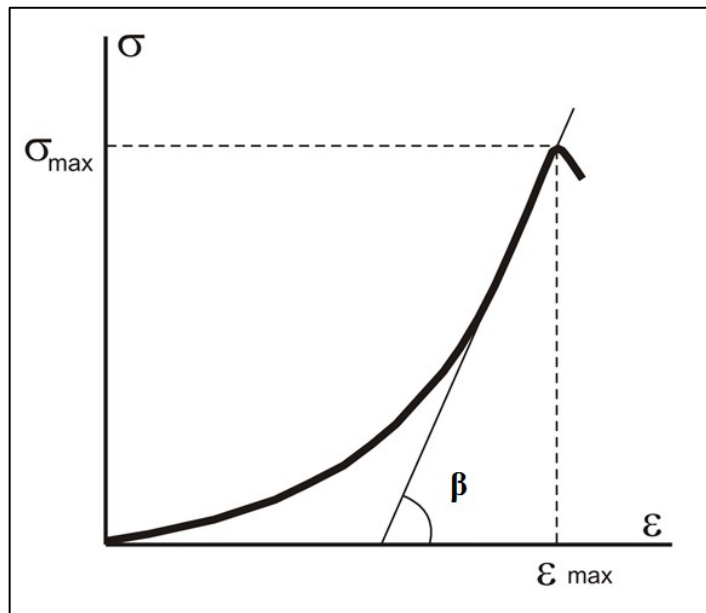
Polimērs	Laukuma blīvums, g/m ²	Materiāla biezums, mm / šķiedru diametrs, nm	Skenējošās elektronmikroskopijas attēls, palielinājums 5000 reizes
Polilaktāts	5,2	0,11/200–460	
Polilaktāts	11,0	0,29/180–250	

4.1. tabulas nobeigums

Polimērs	Laukuma blīvums, g/m ²	Materiāla biezums, mm / šķiedru diametrs, nm	Skenējošās elektronmikroskopijas attēls, palielinājums 5000 reizes
Želatīns	5,7	0,20/130–250	

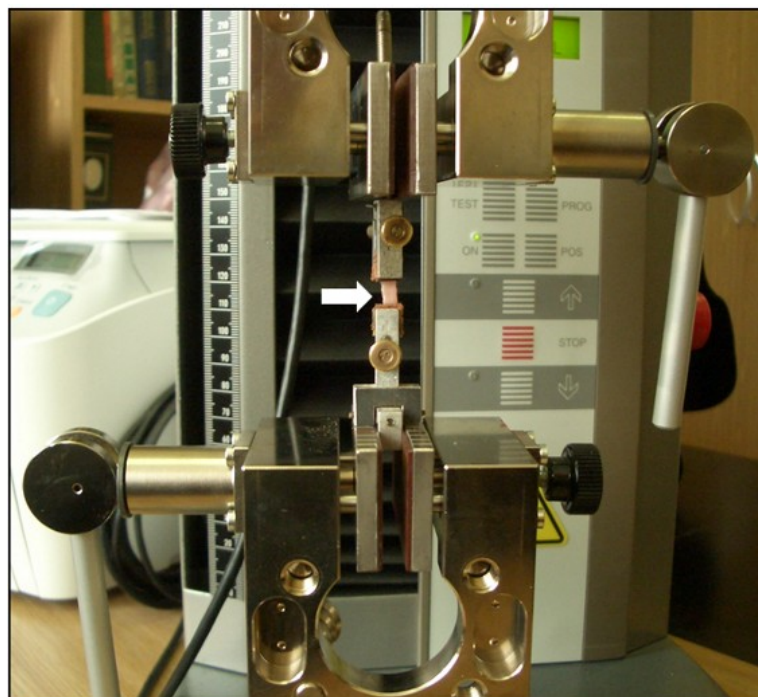
4.3.2. Sintētiskā un bioloģiskā materiāla mehānisko īpašību pētījumi vienass noslogojuma stendā

Biomehāniskās īpašības tika noteiktas vienass slogojuma stendā *Zwick/Roell BDO-FB0.5TS*, kas aprīkots ar 50 N spēka tenzodevēju. Stends tika izmantots savienojumā ar datoru ar testXpert programmatūru, kas paredzēta testēšanas ierīces vadībai un datu apstrādei. Paraugi slogošanai no vārstuļu lapiņām tika izgriezti 3,5 mm plati un ~15 līdz 30 mm gari radiālā un garenvirzienā (īsākais paraugu garums bija paraugiem radiālā virzienā), skat. 2.1. att. Visām vārstuļu un bioprotēžu lapiņām, kā arī nanomateriāliem, pirms biomehānisko īpašību pārbaudes tika mērīts biezums ar katetometru MK-6 (LOMO, Sanktpēterburga, Krievija), mērījumu precizitāte $\pm 0,01$ mm. Paraugi tika deformēti ar ātrumu 5 mm/min līdz paraugu saplīšanai. Maksimālā (graujošā) deformācija ($\epsilon_{\max}$) un maksimālais (graujošais) spriegums ($\sigma_{\max}$) tika noteikti katram paraugam. Paraugu cietība tika izteikta kā pieskares elastības modulis (E) un noteikta sprieguma – deformācijas līknes lineārajā daļā kā tangenss leņķim, kurš veidojas starp koordinātu asi un pieskari līknei tās lineārajā daļā (leņķis β attēlā 4.8.).



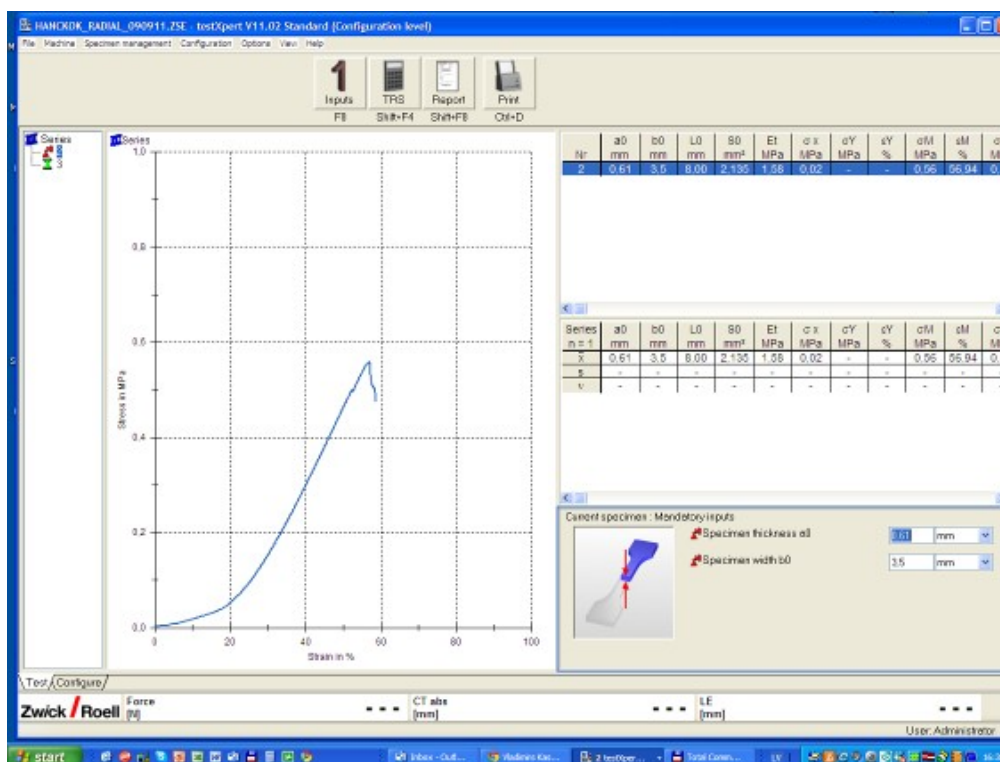
4.8. att. Piemērs sprieguma-deformācijas līknei un galvenajiem nosakāmajiem mehāniskajiem parametriem

Paraugi, ņemot vērā to nelielos izmērus, jo īpaši mazo biezumu, tika nostiprināti slogojuma stendā ar speciāli konstruēta fiksatora palīdzību, kas redzams 4.9. attēlā.



4.9. att. Vienass slogojuma stends Zwick/Roell BDO-FB0.5TS, redzamas speciāli konstruētās fiksācijas spaiļes. Ar bultiņu atzīmēts testējamais paraugs

Vienass noslogojuma standā iegūtie dati tika apstrādāti ar testXpert programmatūru, turpmākai analīzei. Izmantojot šo programmu, noteikti paraugu graužošais spriegums, graužošā deformācija, kā arī to pieskares elastības modulis to sprieguma deformācijas līknes lineārajā daļā. Programmas testXpert ekrānšāviņš redzams 4.10. attēlā.



4.10. att. Programmas testXpert ekrānšāviņš, kurā redzams viens no eksperimentiem HancockII bioprotēzes lapiņu mehānisko īpašību noteikšanai radiālā virzienā

4.3.3. Šūnu kultūra uz polimēru nanošķiedru materiāla

Rūpīgākai pārbaudei tika izvēlēti trīs materiāli želatīns ar laukuma blīvumu $5,7 \text{ g/m}^2$, PCL – $15,7 \text{ g/m}^2$ un PUR – $6,2 \text{ g/m}^2$. Pārbaudīto materiālu paraugi tika ievietoti standarta 8 iedobju šūnu kultūras platēs un kultivēti 6 nedēļas ar COS-7 šūnām, kas sākotnēji izdalītas no Āfrikas zaļā pērtiķa nieru fibroblastu šūnu līnijas (ATCC 1651 CRL). Šūnas tika uzturētas *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ar 5% fetālo teļa serumu pie 37°C mitrinātā 5% CO_2 atmosfērā. Vide tika mainīta 2 reizes nedēļā. Pēc 6 nedēļu kultivēšanas šūnu dzīvotspēja tika novērtēta izmantojot akridīna oranžā un etīdija bromīda krāsojumu, kuru pielietojot dzīvās šūnas fluorescentajā gaismā krāsojas

zaļā, bet mirušās šūnas oranžā krāsā. Dzīvo/mirušo šūnu kvantifikācijai tika skaitītas šūnas mikroskopijas redzes laukos, 200 šūnas katram paraugam, no kurām tika aprēķināta dzīvo šūnu proporcija. Izvērstāku šūnu kultivēšanas un krāsošanas protokolu skatīt 1. un 2. pielikumos.

4.4. Datu analīze

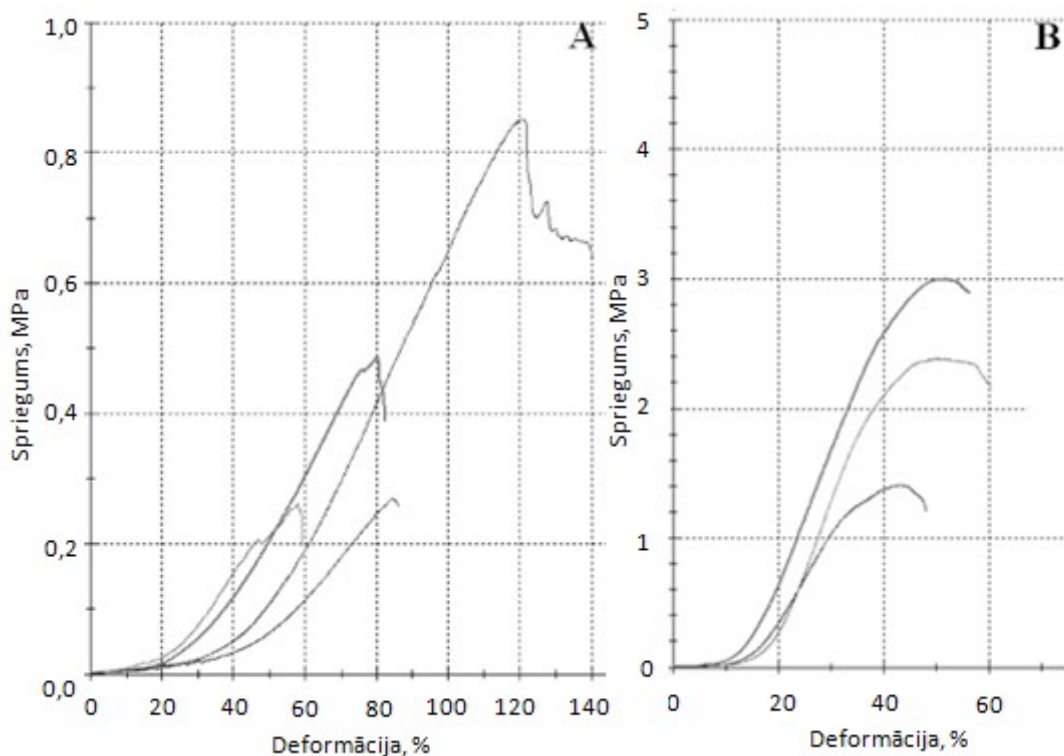
Eksperimentālie dati tika apstrādāti ar programmu SPSS for Windows 16.0 (SPSS Inc., Čikāga, IL, ASV) un Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, ASV). Analīzei lietotas aprakstošās un analītiskās statistikas metodes – aprēķināta vidējā vērtība, standartnovirze. Vidējās vērtības starp 2 atsevišķām paraugu grupām tika salīdzinātas izmantojot Stjūdenta T-testu. Divi lielumi uzskatīti par statistiski nozīmīgi atšķirīgiem, ja starpības ticamības līmenis starp tiem ir lielāks kā 95 % ($p < 0,05$). Vidējās vērtības starp 3 un vairāk atsevišķām paraugu grupām tika salīdzinātas izmantojot viena parametra ANOVA testu un atbilstošos *post hoc* testus.

5. REZULTĀTI

5.1. Aortas vārstuļa un bioprotēžu lapiņu mehānisko īpašību noteikšana

5.1.1. Natīvo cūkas aortas vārstuļa lapiņu mehāniskās īpašības

Kopumā tika pārbaudīti 14 paraugi garenvirzienā un 13 paraugi radiāli, kombinējot aortas vārstuļa lapiņas no dažādām sirdīm. Aprēķinot vidējās vērtības, garenvirzienā natīvā aortas vārstuļa lapiņu elastības modulis ir $9,7 \pm 1,3$ MPa, graužošais spriegums $2,3 \pm 0,6$ MPa un graužošā deformācija $44,8 \pm 5,9$ %. Savukārt radiālā virzienā attiecīgie parametri bija sekojoši: elastības modulis ir $1,0 \pm 0,2$ MPa, graužošais spriegums $0,5 \pm 0,2$ MPa un graužošā deformācija $95,6 \pm 31,4$ %. Sprieguma deformācijas līknes no atsevišķiem eksperimentiem cūkas vārstuļa lapiņām abos testētajos virzienos var redzēt 5.1. attēlā, kur skaidri iezīmējās materiāla mehānisko īpašību atšķirības pārbaudītajos virzienos.



5.1. att. Sprieguma deformācijas līknes no atsevišķiem eksperimentiem cūkas vārstuļa lapiņām A) radiālā un B) garenvirzienā

5.1.2. Dažādu aortas vārstuļa bioprotēžu lapiņu mehāniskās īpašības

Visu pārbaudīto bioprotēžu mehānisko īpašību apkopojums ir atainots 5.1. tabulā, kas ietver sevī visu bioprotēžu lapiņu elastības moduļa (E), graužoša sprieguma ($\sigma_{\max}$) un graužošās deformācijas ($\epsilon_{\max}$) vidējās vērtības $\pm$ SD gan garenvirzienā, gan radiālā virzienā.

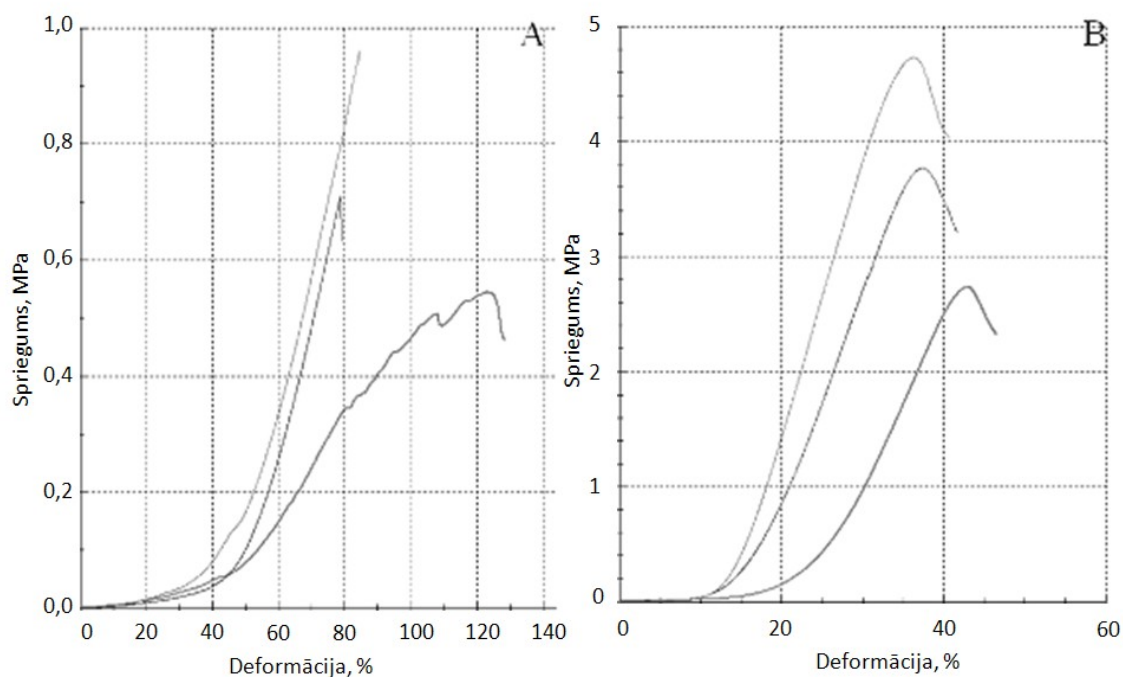
5.1. tabula

Natīvā vārstuļa un bioprotēžu mehānisko īpašību apkopojums

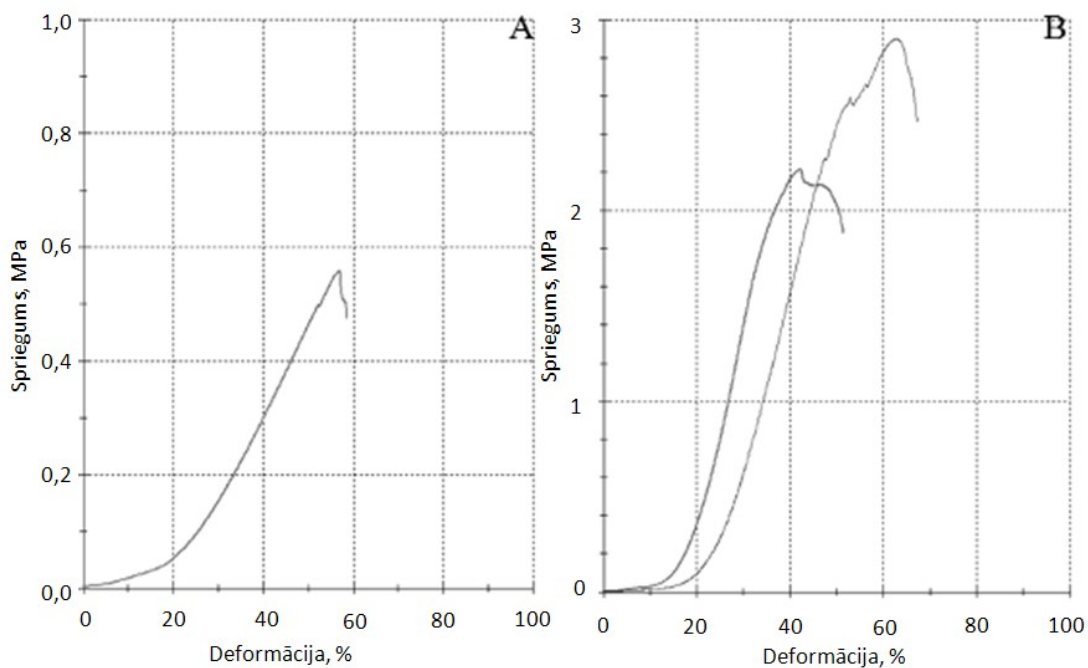
	E (Mpa)	$\sigma_{\max}$ (Mpa)	$\epsilon_{\max}$ (%)
Cūkas aortas vārstulis, garenvirzienā	$9,7 \pm 1,3$	$2,3 \pm 0,6$	$44,8 \pm 5,9$
Cūkas aortas vārstulis, radiāli	$1,0 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	$95,6 \pm 31,4$
<i>Epic</i> , garenvirzienā	$19,7 \pm 3,9$	$3,8 \pm 0,7$	$28,7 \pm 6,3$
<i>Epic</i> , radiāli	$2,0 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$	$53,0 \pm 19,8$
<i>Freestyle</i> , garenvirzienā	$9,0 \pm 3,0$	$2,8 \pm 0,5$	$64,9 \pm 10,3$
<i>Freestyle</i> , radiāli	$0,8 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$	$89,0 \pm 13,9$
<i>Hancock II</i> , garenvirzienā	$22,5 \pm 2,2$	$4,7 \pm 0,2$	$36,8 \pm 9,1$
<i>Hancock II</i> , radiāli	$2,5 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,0$	$58,3 \pm 13,2$
<i>Soprano</i> , garenvirzienā	$29,5 \pm 6,0$	$8,9 \pm 1,2$	$56,9 \pm 9,3$
<i>Soprano</i> , radiāli	$15,8 \pm 5,4$	$5,2 \pm 0,9$	$65,2 \pm 10,4$

Pārbaudītajām bioprotēzēm ir natīvajam aortas vārstulim līdzīgs nelineārs sprieguma-deformācijas līknes raksturs. Taču bioprotēzēm raksturīga lielāka lapiņu rigiditāte, uz ko norāda garenvirzienā aptuveni 2 reizes lielāks elastības modulis *Epic*,

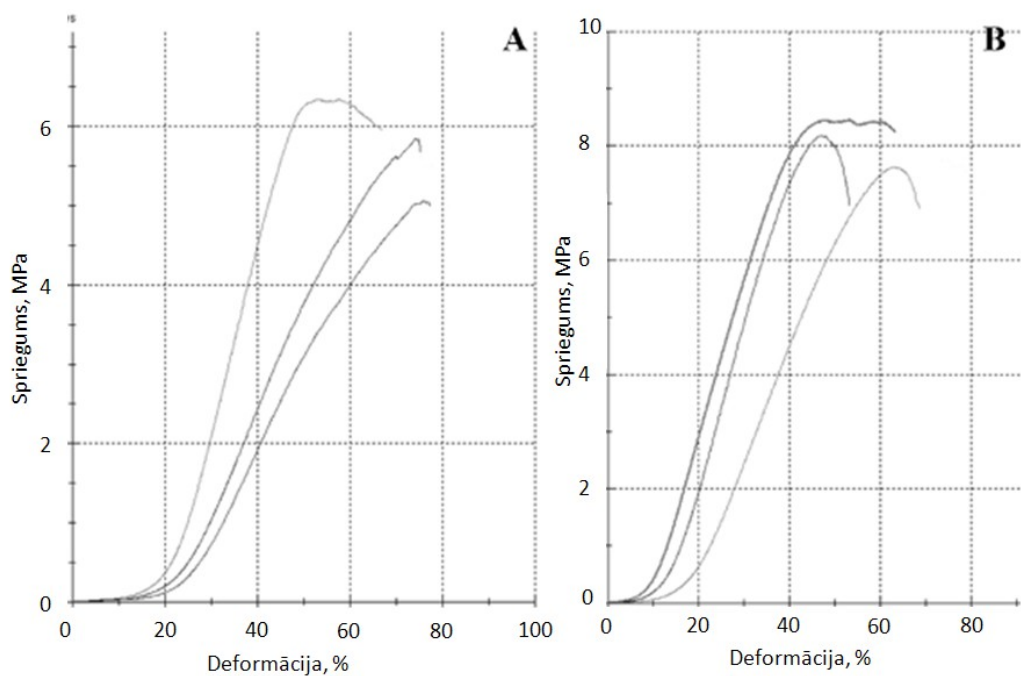
HancockII bioprotēzēm un gandrīz trīs reizes lielāks elastības modulis *Soprano* protēzes lapiņām, kuras materiāls vērtējams kā visrigidākais. *Soprano* protēzei piemīt arī vismazāk izteiktā materiāla anizotropija, un tās lapiņas radiālā virzienā ir ievērojami rigidākas un mazāk deformējamas kā ksenoaortālajām bioprotēzēm. Ja *HancockII* un *Epic* protēžu lapiņas radiālā virzienā ir aptuveni 2,5 un 2 reizes rigidākas par natīvo vārstuli ($p < 0,05$), tad *Soprano* protēzei izmantotais liellopa perikards ir vairāk kā 15 reizes rigidāks par natīvu cūkas aortas vārstuli ($p < 0,001$). *Freestyle* protēze pēc savām mehāniskajām īpašībām visvairāk atbilst natīvajam vārstulim. Šīs atšķirības starp bioprotēzēm nav vis to materiālu uzbūves, bet gan materiāla fiksācijas apstākļu īpatnību dēļ. *Freestyle* tiek fiksēta pie spiediena, kas ir tuvs 0 mmHg, savukārt pārējās protēzes tiek fiksētas pie lielāka spiediena (precīzs spiediens tiek turēts slepenībā), pie kura to saistaudu šķiedras fiksējas jau daļēji izstieptā stāvoklī un tādējādi samazinās to deformējamība [19, 132]. Šis jautājums tiks vairāk apskatīts diskusijas sadaļā. Attiecīgās sprieguma-deformācijas līknes no atsevišķiem eksperimentiem visām pārbaudītajām bioprotēzēm var redzēt attēlos 5.2. – 5.5.



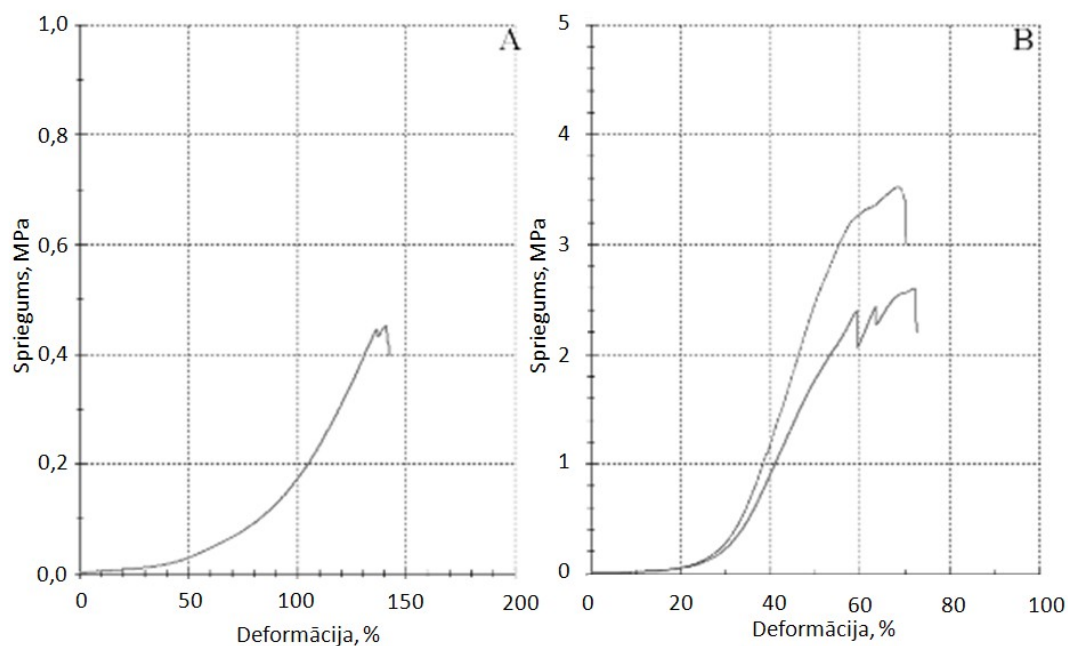
**5.2. att. Sprieguma-deformācijas līknes no atsevišķiem eksperimentiem
Epic bioprotēzes lapiņām: A) radiālā un B) garenvirzienā**



5.3. att. Sprieguma-deformācijas līknes no atsevišķiem eksperimentiem *Hancock II* bioprotēzes lapiņām: A) radiālā un B) garenvirzienā



5.4. att. Sprieguma-deformācijas līknes no atsevišķiem eksperimentiem *Soprano* bioprotēzes lapiņām: A) radiālā un B) garenvirzienā



**5.5. att. Sprieguma-deformācijas līknes no atsevišķiem eksperimentiem
Freestyle bioprotēzes lapiņām: A) radiālā un B) garenvirzienā**

Apkopojot natīvo vārstu un dažādu bioprotēžu mehānisko īpašību rādītājus ir iespējams izveidot neizsmeļošu pieļaujamo mehānisko īpašību robežu kopsavilkumu, kas atrodama šī darba sadaļā „Praktiskās rekomendācijas”.

5.2. Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehānisko īpašību noteikšana

Rezultāti apkopoti 5.2. tabulā. Diastoles rādiuss aortas saknei un protēzēm tika aprēķināts pie transvalvulārā spiediena gradienta 70–90 mmHg, sistoles rādiuss – saknei pie 120–140 mmHg (atbilst spiedienam sistoles laikā), protēzēm pie 0–10 mmHg (atbilst transvalvulārā spiediena gradientam sistoles laikā). Deformējamība definēta kā relatīvais rādiusa pieaugums procentos, izmainot transvalvulārā spiediena gradientu no diastolei atbilstošā uz sistolei atbilstošu.

5.2. tabula

Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehāniskās īpašības

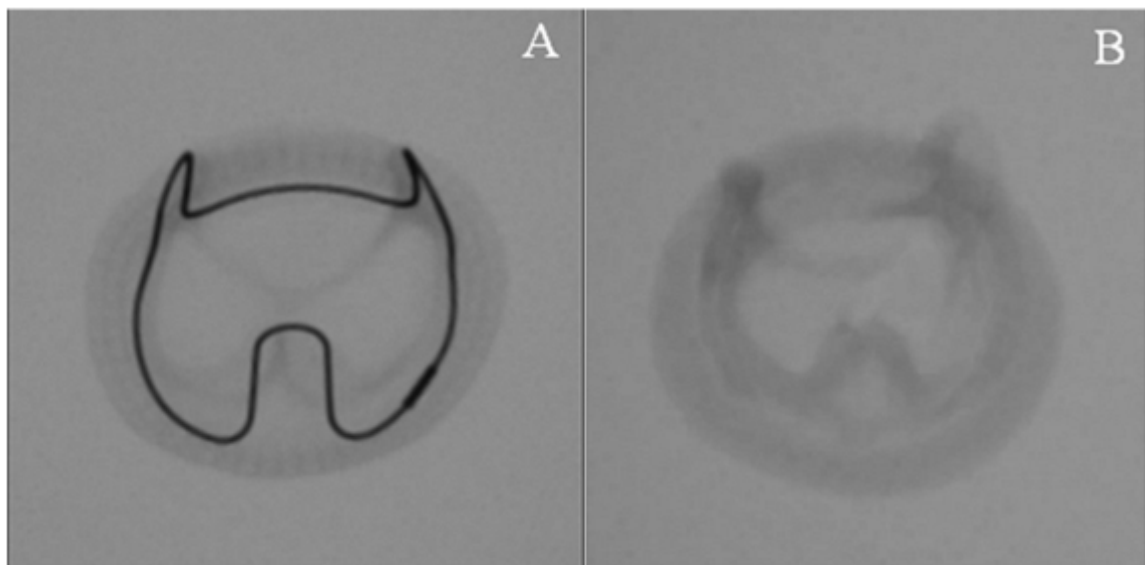
Transvalvulārā spiediena gradients, mmHg	Protēzes R komisūru fiksācijas līmenī, mm			R pieaugums (%) diastole – sistole
	0–10 (sistole)	70–90 (diastole)	120–140	
<i>Edwards CES</i> (1987.g.)	7,99	7,35	7,20	8,70
<i>Medtronic Intact</i> (1988.g.)	7,24	6,97	6,85	3,87
<i>Medtronic Hancock II</i>	10,24	9,96	9,78	2,85
<i>Sorin Soprano</i>	10,37	10,07	9,95	2,99
<i>StJude Epic</i>	8,76	8,66	8,65	1,18
<i>ATS 3F Enable</i>	11,66	11,32	11,13	3,00
Transvalvulārā spiediena gradients, mmHg	0-10	70–90 (diastole)	120–140 (sistole)	
Neapstrādāta aortas sakne	11,64 ± 1,70	14,38 ± 3,10	15,40 ± 2,80	7,09 ± 2,20

Deformējamības rādītāji tradicionālajām bioprotēzēm svārstās no 1,18% *St Jude Epic* līdz pat 8,7% *Carpentier Edwards Standard*, kuras materiāla padevīgums pārspēj natīvas cūkas aortas saknes audus. Vidējais padevīgums visu tradicionālo bioprotēžu grupā ar labiem attālajiem un vidēja termiņa rezultātiem ir $3,9 \pm 2,8\%$. Šai vidējai vērtībai aptuveni atbilst otra no vecajām bioprotēzēm – *Medtronic Intact* ar deformējamību 3,87%. Vienīgās pārbaudītās vaļēji implantējamās stentprotēzes *ATS 3F Enable* stenta padevīgums ir tieši 3,0%. Taču vidējā deformējamība vecajām

bioprotēzēm ir $6,3 \pm 3,4\%$, ievērojami augstāka par $2,3 \pm 1,0\%$ ($p < 0,05$), kas ir vidējā deformējamība modernajām standarta bioprotēzēm.

Standartnovirze pie aortas saknes R individuālajiem mērījumiem parādīta tikai, lai nodemonstrētu, cik atšķirīgas izmēros mēdz būt aortas saknes. Jāuzsver, ka šeit aprēķinātās rādiusa vērtības neatspoguļo aortas izmērus, bet gan tikai riņķa līnijas dimensijas, kas apvilktas ap trīs sonomikrometrijas zondēm, jo kā zināms aortas sakne Valsalvas sinusu un arī sinotubulārā savienojuma līmenī šķēsgriezumā vairāk atbilst epitrohoīdam ar $R = 3r$ nevis riņķa līnijai [73].

Vecāko bioprotēžu stentu integritāte tika apstiprināta kontroles rentgena uzņēmumos, skat. 5.6. attēlu.



5.6. att. Carpentier Edwards (A) un Medtronic Intact (B) bioprotēžu rentgena attēli

5.3. Polimēru nanošķiedru materiālu izmantošanas iespēju izvērtēšana vārstuļu lapiņu audu inženierijas mērķiem

5.3.1. Nanomateriālu mehāniskās īpašības salīdzinājumā ar natīvo cūkas aortas vārstuli pirms un pēc 6 nedēļu *in vitro* kultivēšanas ar fibroblastu šūnām

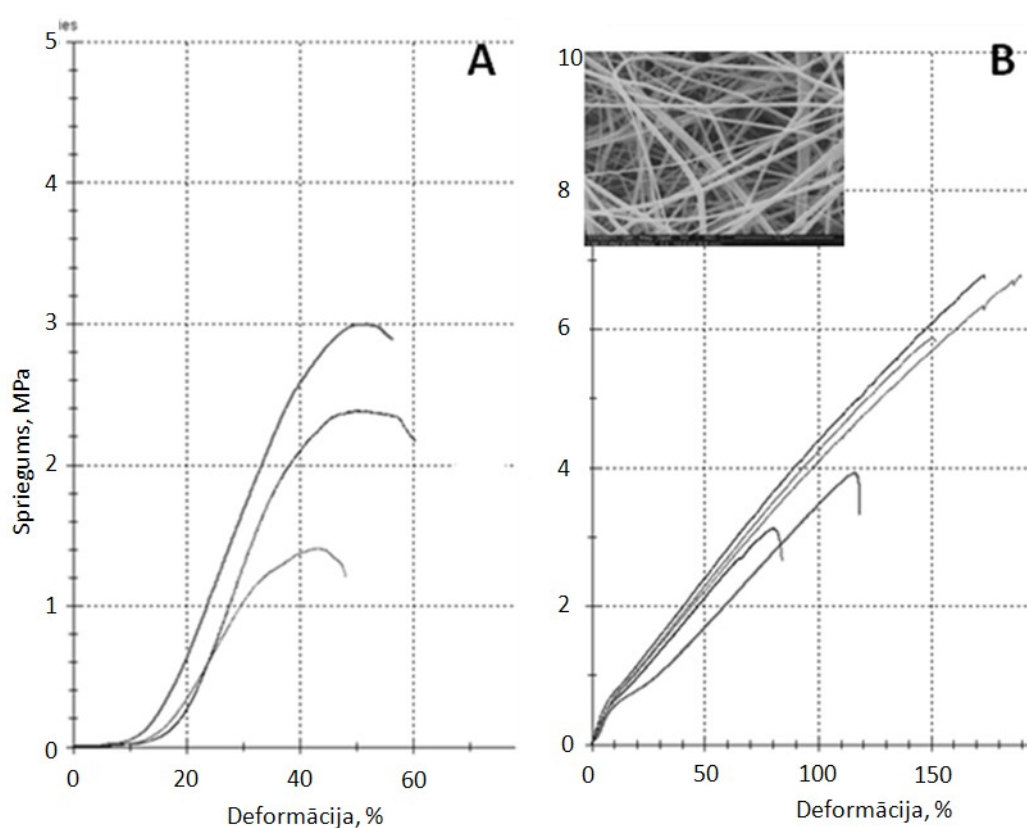
Dažādu nanošķiedru materiālu mehānisko īpašību apkopojums pirms šūnu kultūras redzams 5.3. tabulā, kurā ērtības labad iekļauti arī dati par natīva cūkas aortas vārstuļa lapiņām.

5.3. tabula

Neapstrādāta polimēru nanošķiedru materiāla mehāniskās īpašības

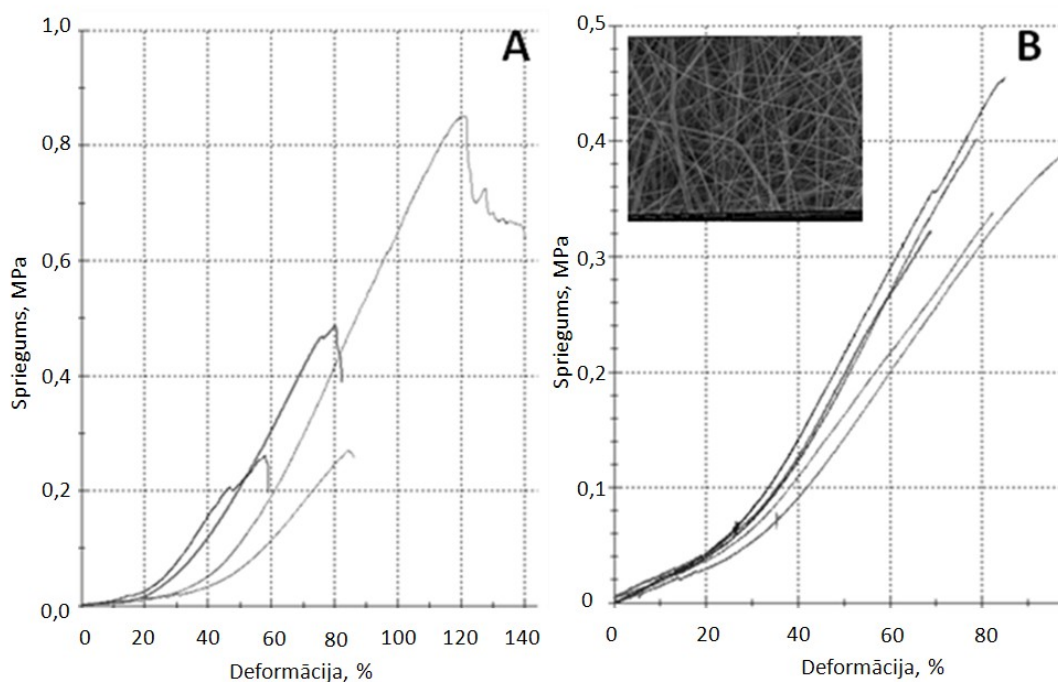
	E (MPa)	$\sigma_{\max}$ (Mpa)	$\epsilon_{\max}$ (%)
Cūkas aortas vārstulis, garenvirzienā	$9,70 \pm 1,30$	$2,30 \pm 0,60$	$44,80 \pm 5,90$
Cūkas aortas vārstulis, radiāli	$1,00 \pm 0,20$	$0,50 \pm 0,20$	$95,60 \pm 31,40$
PCL $3,86 \text{ g/m}^2$	$0,88 \pm 0,25$	$0,20 \pm 0,03$	$42,80 \pm 5,08$
PCL 12 g/m^2	$0,48 \pm 0,12$	$0,09 \pm 0,02$	$20,79 \pm 3,31$
PCL $15,7 \text{ g/m}^2$	$1,30 \pm 0,20$	$0,30 \pm 0,05$	$37,90 \pm 2,46$
PLA $5,2 \text{ g/m}^2$	$3,35 \pm 0,48$	$0,55 \pm 0,03$	$41,94 \pm 3,67$
PLA 11 g/m^2	$0,23 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,01$	$54,94 \pm 8,15$
Želatīns $5,7 \text{ g/m}^2$	$0,64 \pm 0,14$	$0,38 \pm 0,05$	$82,53 \pm 10,20$
PUR $6,2 \text{ g/m}^2$	$3,90 \pm 0,50$	$5,30 \pm 1,68$	$141,80 \pm 43,90$
PUR $10,4 \text{ g/m}^2$	$4,55 \pm 0,78$	$7,65 \pm 1,65$	$181,06 \pm 39,83$

No pārbaudītajiem materiāliem natīvajam aortas vārstulim garenvirzienā visvairāk atbilda PUR ar laukuma blīvumu $6,2 \text{ g/m}^2$, kura elastības modulis ir $E \ 3,9 \pm 0,5 \text{ MPa}$ ar graužošo spriegumu $5,3 \pm 1,68 \text{ MPa}$ un deformāciju $141,8 \pm 43,9 \text{ MPa}$. Sprieguma un deformācijas līknes PUR $6,2 \text{ g/m}^2$ paraugiem salīdzinājumā ar natīvā vārstuļa lapiņām garenvirzienā var redzēt attēlā 5.7. Radiālajam virzienam vislabāk atbilst $5,7 \text{ g/m}^2$ želatīns ar $E \ 0,64 \pm 0,14 \text{ MPa}$, graužošo spriegumu $0,38 \pm 0,05 \text{ MPa}$ un graužošo deformāciju $82,53 \pm 10,20 \%$. Sprieguma un deformācijas līknes želatīna $5,7 \text{ g/m}^2$ paraugiem salīdzinājumā ar cūkas aortas vārstuļa lapiņām radiālā virzienā var redzēt attēlā 5.8.



5.7. att. Sprieguma-deformācijas līknes:
A) cūkas aortas vārstulim garenvirzienā un
B) PUR $6,2 \text{ g/m}^2$.

Ielikumā – PUR nanošķiedru materiāla skenējošās elektronmikroskopijas attēls

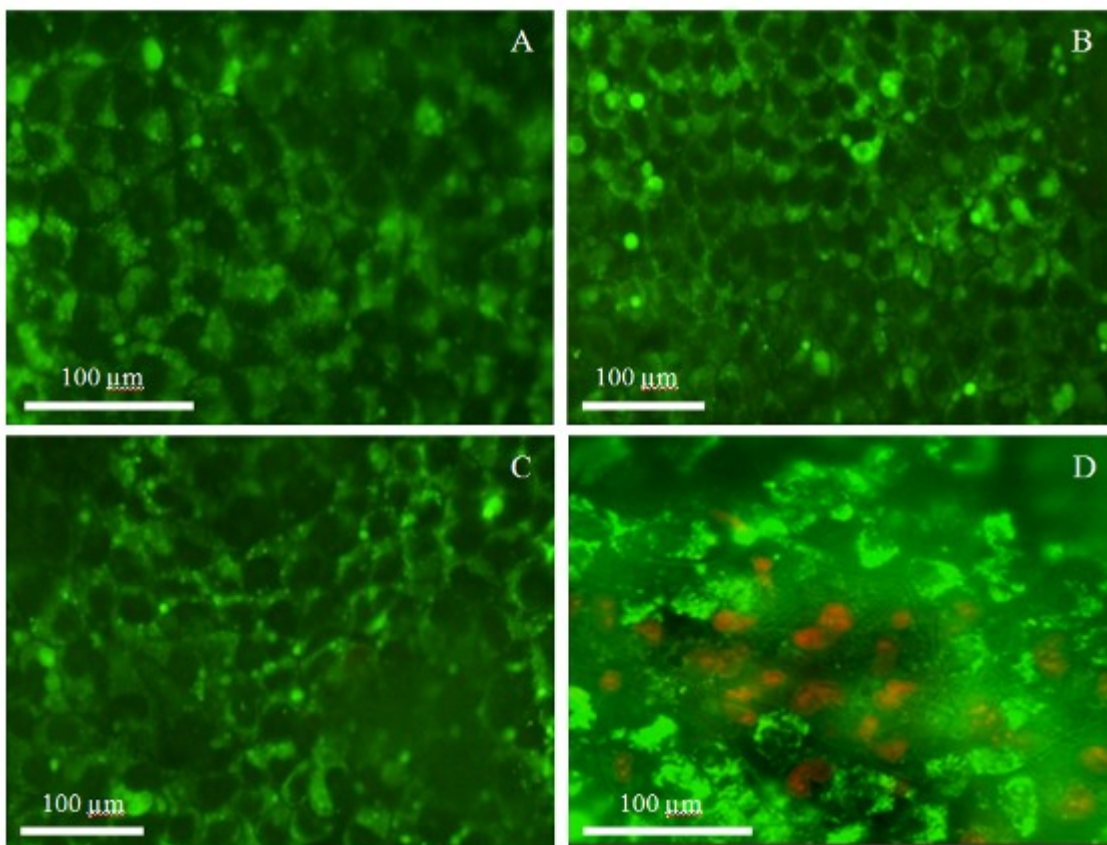


5.8. att. Sprieguma-deformācijas līknes:
A) cūkas aortas vārstulim radiālā virzienā un
B) želatīnam 5,7 g/m².

Ielikumā – želatīna nanošķiedru materiāla skenējošās elektronmikroskopijas attēls

5.3.2. Nanomateriālu biosaderība ar cos-7 šūnām *in vitro*

Biosaderība tika pārbaudīta trīs nanošķiedru materiāliem PUR ar laukuma blīvumu 6,2 g/m² un želatīnam, jo to mehāniskās īpašības vislabāk atbilda natīvajam cūkas aortas vārstulim attiecīgi garenvirzienā un radiāli. Pārbaudīts tika arī PCL 15,7 g/m², ņemot vērā lielo pieredzi pielietojot šo polimēru ķirurģijā, kā arī šī materiāla pieņemamo atbilstību natīvajam vārstulim garenvirzienā. Pārbaudītajos apstākļos COS-7 šūnas auga labi uz visiem 3 pārbaudītajiem nanošķiedru materiāliem, veidojot vienmērīgu monoslāni – attēls 5.9. Dzīvo šūnu proporcija pēc 6 nedēļu kultivēšanas sastādīja $90,2 \pm 7,9\%$ uz PUR materiāla paraugiem, $92,6 \pm 7,4\%$ uz PCL materiāla un $88,1 \pm 5,7\%$ uz želatīna bez nozīmīgas atšķirības starp materiāliem un paraugiem.



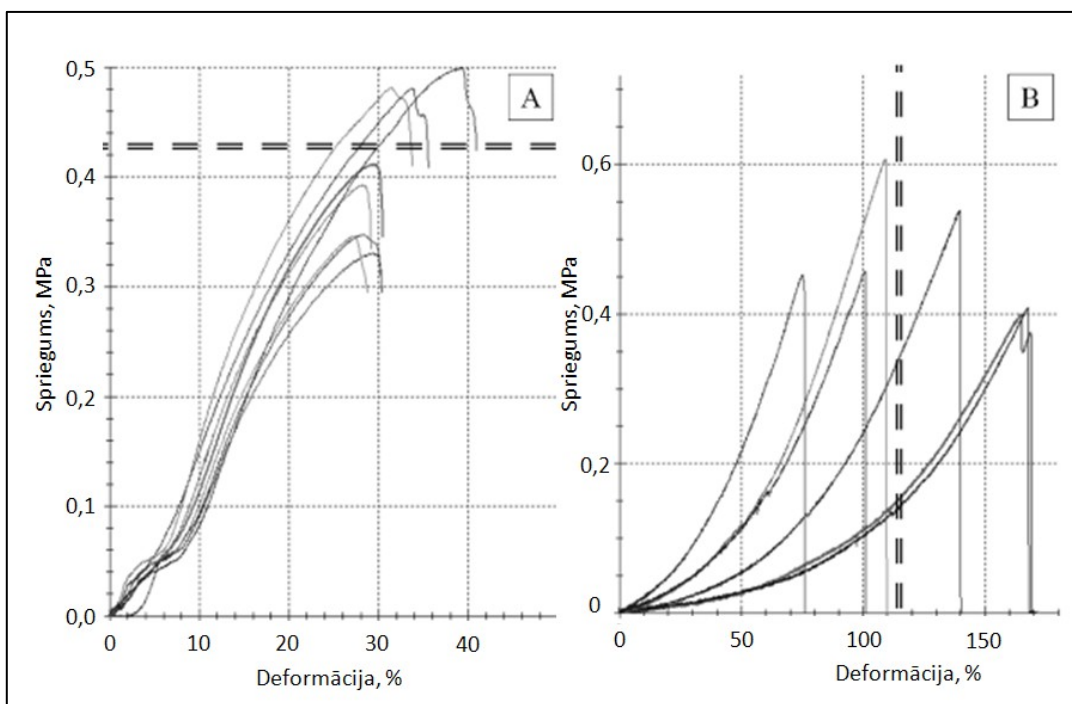
5.9. att. COS-7 šūnu kultūras fluorescentās mikroskopijas attēli pēc 6 nedēļām kultūrā – akridīna oranžā un etīdija bromide krāsojums:
A) PCL 15,7 g/m²; B) želatīns 5,7 g/m², C) PUR 6,2 g/m², D) PUR 6,2 g/m², ar vairākām redzamām mirušām šūnām oranžā krāsā

5.3.3. Nanomateriālu mehāniskās īpašības pēc 6 nedēļu *in vitro* kultivēšanas ar fibroblastu šūnām

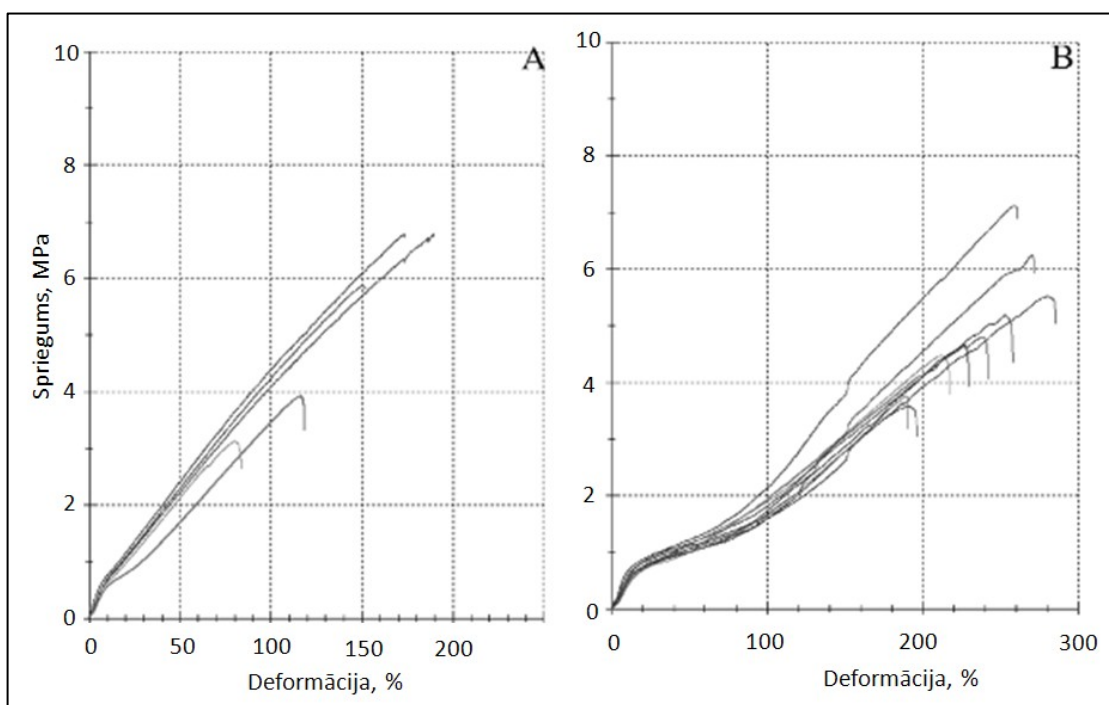
Mehānisko īpašību pētījumi pēc kultivācijas ar COS-7 šūnām ir apkopoti 5.4. tabulā. Nozīmīgi mazinājās PCL graužošais spriegums no $0,49 \pm 0,01$ MPa līdz $0,37 \pm 0,03$ MPa ($p < 0,05$), skatīt 5.10. attēlu A. Savukārt želatīna maksimālā deformējamība palielinājās no $87,2 \pm 13,8\%$ līdz $157,1 \pm 15,2\%$ ($p < 0,05$), skatīt 5.10. attēlu B. PUR materiāla paraugiem netika novērotas nozīmīgas izmaiņas mehāniskajās īpašībās pirms un pēc kultivācijas – attēls 5.11. Jāatzīmē, ka nevienam no testētajiem materiāliem ilgstošas kultivācijas ar COS-7 šūnām iespaidā nemainījās elastības modulis – tabula 5.4.

**Nanošķiedru materiālu mehāniskās īpašības pirms un
pēc 6 nedēļu kultivācijas ar COS-7 šūnām**

	E (MPa)	$\sigma_{\max}$ (Mpa)	$\varepsilon_{\max}$ (%)
PCL 15,7 g/m ²	2,10 ± 0,10	0,49 ± 0,01	34,70 ± 4,00
PCL 15,7 g/m ² (COS-7)	2,20 ± 0,10	0,37 ± 0,03	28,50 ± 1,00
Želatīns 5,7 g/m ²	0,73 ± 0,17	0,43 ± 0,09	87,20 ± 13,80
Želatīns 5,7 g/m ² (COS-7)	0,62 ± 0,16	0,45 ± 0,08	157,10 ± 15,20
PUR 6,2 g/m ²	3,90 ± 0,50	5,30 ± 1,70	141,80 ± 43,90
PUR 6,2 g/m ² (COS-7)	4,20 ± 0,60	4,70 ± 2,10	153,60 ± 51,00



5.10. att. Sprieguma-deformācijas liknes no viena eksperimenta nanošķiedru materiālam PCL 15,7 g/m² un želatīnam: A) PCL – pirms kultivēšanas ar šūnām liknes, kas sniedzas virs dubultās raustītās līnijas, pēc kultivēšanas – zem raustītās līnijas, B) želatīns – pirms kultivēšanas ar šūnām liknes, kas ir pa kreisi no raustītās līnijas, pēc kultivēšanas – pa labi aiz raustītās līnijas



5.11. att. Sprieguma-deformācijas liknes no viena eksperimenta nanošķiedru materiālam PUR 6,2 g/m²: A)Pirms kultivēšanas ar šūnām, B) pēc 6 nedēļu kultūras ar COS-7 šūnām

6. DISKUSIJA

6.1. Lapiņu mehānisko īpašību nozīmīgums

vārstuļu protēžu ilgmūžībai

Eksperimentu rezultāti parādīja, ka aortas vārstuļa lapiņu mehāniskās īpašības ir atšķirīgas radiālā un garenvirzienā, kas ir saskaņā ar agrāk publicētiem datiem par šī materiāla anizotropiju [77, 125, 140, 158]. To nosaka vārstuļa lapiņu ultrastruktūra – precīzāk saistaudu šķiedru orientācija vārstuļa lapiņās. Vairāki autori ir nodemonstrējuši, ka elastīgās šķiedras ir izvietotas aptuveni vienādi visos virzienos, bet kolagēna šķiedras galvenokārt garenvirzienā [139, 158]. Šinī pētījumā tika nodemonstrēts, ka graužošais spriegums natīvam cūkas aortas vārstulim garenvirzienā ir par 4,6 reizēm lielāks nekā radiālā, ko var skaidrot ar kolagēna šķiedru koncentrāciju šajā virzienā. Līdzīgi elastības modulis ir pat 9,7 reizes lielāks garenvirzienā. Šie rezultāti ir saskaņā ar *Sauren* un *Missirlis* ar kolēģiem [109, 140] novērojumiem cūkas vārstuļu audiem: viņi ziņoja par elastības moduli, kas ir pat 21 reizi lielāks garenvirzienā.

Jau 1980. gadā *Sauren* ar kolēģiem piedāvāja hipotēzi, ka sirds vārstuļu audu mehāniskās īpašības ir tieši saistītas ar to strukturālo elementu izvietojumu [139]. Pamatojoties uz histoloģisko uzbūvi, viņi piedāvāja loģisku skaidrojumu nelineārajām sprieguma-deformācijas līknēm, kas tika iegūtas vienass noslogojuma testos. Atbilstoši viņu hipotēzei šajā līknē var izdalīt četras fāzes. Pirmās fāzes laikā audi rada minimālu pretestību deformācijai, sprieguma pārvadi nodrošina tikai elastīgās šķiedras, tādēļ šo fāzi dēvē par elastīna fāzi. Otrās jeb pārejas fāzes laikā aizvien vairāk kolagēno šķiedru sāk izstiepties un atritināties un sāk pārņemt daļu no audu sprieguma, līkne kļūst stāvāka. Trešā, kolagēna fāze sākas, kad visas kolagēna šķiedras ir atritinājušās, līkne ir stāva un gandrīz lineāra, tā ataino kolagēna šķiedru mehāniskās īpašības. Sprieguma-deformācijas līkne atkal kļūst lēzenāka, kad sākas kolagēna šķiedru destrukcija ceturtās fāzes laikā. Vēl vairāk deformējot materiālu tas beidzot plīst. Raksturīgās 4 līknes fāzes ir redzamas visos pārbaudītajos vārstuļu materiālos, gan natīvajos, gan bioprotēzēm (att. 5.1. līdz 5.5.). Kā novērojams bioprotēzēm, vairāk *Soprano*, *Hancock II* un mazāk *Epic*, ir izteikta sprieguma-deformācijas līknes nobīde uz sprieguma asi, kā arī daudz mazāk izteikta līknes 1. un 2. fāze salīdzinājumā ar natīvajiem vārstuļiem. Kā tas ticis demonstrēts agrāk [19, 132] bioprotēžu audu mehāniskās īpašības lielā mērā nosaka tas,

vai tie tiek fiksēti noslogotā, vai nenoslogotā veidā. Fiksācija noslogotā stāvoklī izsauc līknes nobīdi pa kreisi – sprieguma ass virzienā, jo, fiksējot noslogotā stāvoklī, kolagēna šķiedras tiek nofiksētas jau atritinātā stāvoklī, tādēļ arī daļēji izpaliek līknes 1. un 2. fāze, pārbaudot materiālu ar vienas noslogojuma testiem.

Ņemot vērā agrāko pētījumu rezultātus un teorētiskus apsvērumus *Mano Thubrikar* un kolēģi nonāca pie secinājuma, ka, lai adekvāti funkcionētu, vārstuļu lapiņām ir nepieciešama šī mehāniskā divējādība ar lielu deformējamību pie neliela sprieguma (1. un 2. līknes fāze) un mehāniska izturība un materiāla rigīdums lielāka sprieguma situācijās (3. fāze) [46, 165]. Mehāniskā izturība ir īpaši nepieciešama diastoles laikā, lai novērstu lapiņu prolabēšanos un pārlieku izstiepšanos. No otras puses augsta deformējamība un elastīgums nepieciešami sistoles sākumdaļā – tas nepieciešams, lai vārstulis varētu atvērties pēc iespējas ātrāk un efektīvāk. Pārejā no diastoles uz sistoli un atpakaļ vārstuļa lapiņas izliekums mainās pilnībā uz pretējo pusi, kam ir nepieciešams, lai lapiņas rigiditāte būtu pēc iespējas mazāka. Šī fleksijas rigiditāte ir tieši proporcionāla audu elastības modulim un to biezumam [166]. Attiecīgi vārstuļu protēžu lapiņas, kuras ir daudz rigīdākas fiksācijas dēļ, katra sirds cikla laikā tiek pakļautas daudz lielākam fleksijas spriegumam un tas var izraisīt paātrinātu audu defektu veidošanos, salīdzinājumā ar vārstuļu lapiņām, kurām deformējamība ir saglabāta natīvo audu līmenī. Nesen veiktā pētījumā *Miranjafi* un kolēģi parādīja, ka reģions, kurš ir pakļauts fleksijas deformācijai ir komisūru reģions – vārstuļa lapiņas sirds cikla laikā rotē par ~ 65 grādiem šinī reģionā [106]. Tādējādi šis reģions ir pakļauts izteiktam spriegumam fleksijas deformācijas dēļ un arī asins retrogrādās plūsmas radītā noslogojuma diastoles laikā dēļ. To apstiprina novērojumi, ka bioprotēzes tiek bieži bojātas tieši komisūru reģionā [165]. Fleksijas radīts nogurums tiek uzskatīts par vienu no biežākajiem cēloņiem lapiņu plīsumam [165, 179]. Arcidiacono un kolēģi [4] ar datormodelēšanas palīdzību nodemonstrēja, ka pat nelielas izmaiņas materiāla rigiditātē ievērojami ietekmē vārstuļa atvēršanās un slēgšanās dinamiku, uzsverot mehānisko īpašību viendabīguma nozīmi vienas vārstuļa lapiņas ietvaros.

Dati par to, ka bioprotēžu mehāniskās īpašības ievērojami atšķiras no natīvo vārstuļu mehāniskajām īpašībām ir saskaņā ar daudzajām publikācijām par nekalcinējošu bioprotēžu lapiņu deģenerāciju [134, 178]. Kaut gan visticamāk šie divi procesi – pakāpeniska strukturāla deģenerācija un kalcifikācija – darbojas roku rokā. To

apstiprina vairāki pētījumi, kas demonstrē, ka kalcifikācija bieži sākas paaugstināta sprieguma un deformācijas zonās [90, 142, 166], tālāk audu kalcifikācija veicina deformējamības mazināšanos un rigiditātes pieaugumu, kas izraisa fleksijas sprieguma palielināšanos un veicina turpmāku bojājumu veidošanos. Kaut gan, runājot par modernajām bioprotēzēm, kalcifikācija vairs netiek minēta kā galvenais disfunkcijas cēlonis, uzsvars vairāk tiek likts uz mehānisku faktoru izraisītiem bojājumiem [178].

6.2. Nanomateriālu atbilstība vārstuļu mehāniskajām īpašībām

Polimēru materiāla matrices audu inženierijā ar dažādām sekmēm tiek izmantotas jau ilgstoši [141]. Dažādi polimēri, gan dabīgi, gan sintētiski, un to kombinācijas ir tikuši pielietoti dažādiem audu inženierijas mērķiem [31, 91, 153]. Dažāda tipa polimēru matrices ir pielietotas agrāk arī sirds vārstuļu lapiņu audu inženierijai [110, 129, 141]. Mūsu pārbaudītie polimēru materiāli ir labi zināmi un, piemēram, PCL ir ticis izmantots ķirurģijā jau vairākas dekādes, tā bioloģiskās īpašības, ieskaitot biodegradāciju, ir labi zināmas un aprakstītas [122, 186]. Taču, līdz šim nav tikušas aprakstītas PCL, PUR un želatīna mehānisko īpašību izmaiņas pirms un pēc ilgstošas kultivācijas ar fibroblastu šūnām.

PCL ir labi piemērots materiāls audu inženierijai, lai radītu audus, kuriem jāiztur liela mehāniska slodze, piemēram, skrimšļus, kaulus un arī sirds vārstuļu materiālu, jo tā biodegradācijas ātrums *in vivo* ir samērā lēns [186]. Ir nodemonstrēts, ka PCL fagocitoze sākas pēc tam, kad tā molekulmasa ir kļuvusi mazāka par 3000 nefermentatīvas hidrolīzes ceļā šķeļot estersaites, kas *in vivo* notiek pēc ~ 6 mēnešiem [122]. Kaut arī eksperimentāli iegūtie rezultāti liecina par graužoša sprieguma samazināšanos par ~25 % pēc 6 nedēļām kultūrā *in vitro*, no praktiskā skatupunkta tam nav būtiskas nozīmes, jo fizioloģiskos apstākļos vārstuļa noslogojums nekad nesasniegtu apmērus, kādi tika pārbaudīti, un jo vairāk tādēļ, ka materiāla elastības modulis pirms un pēc kultūras ar šūnām nemainījās.

Želatīns kaut arī ļoti plaši izmantots, vēl joprojām ir diezgan vāji aprakstīts materiāls, ko iegūst no dabīgā kolagēna. Tomēr tas ir ļoti populārs modernajā biomedicīnas sfērā un tiek plaši pielietots kā zāļu un šūnu transportieris/matrice [79, 91]. Tā mehāniskās un bioloģiskās īpašības ir plaši pētītas [91, 173]. Manis veiktajā

pētījumā pēc 6 nedēļām kultūrā želatīns nezaudēja savu mehānisko izturību, bet gan ieguva lielāku deformējamību, kuras iemeslus grūti izskaidrot bez ultrastruktūras pētījumiem. Praktiski pielietojot želatīna nanošķiedru materiālus tas varētu radīt sarežģījumus, izraisot vārstuļa lapiņu, kas radītas tikai no šī materiāla pārlieku stiepšanos un iespējams pat lapiņu prolapsu.

Ņemot vērā aortas vārstuļa lapiņu anizotropijas nozīmīgumu vārstuļa optimālai funkcionēšanai, kā tas tika apspriests sadaļā 6.1., neviens no pārbaudītajiem nanošķiedru materiāliem nav ideāli piemērots tā aizstāšanai. Kaut arī PUR salīdzinoši vislabāk atbilst natīvā vārstuļa garenvirzienam, kuram visnozīmīgākais ir materiāla izturīgums un stingrība, tas ir pārāk rigīds, lai varētu nodrošināt radiālajam virzienam nepieciešamo materiāla padevīgumu. Savukārt želatīnam piemīt izteikts materiāla padevīgums un deformējamība, taču iztrūkst mehāniskās izturības. Kā iespējams risinājums varētu kalpot kombinēts nanošķiedru materiāls, kas ir izgatavots elektrovērpšanas ceļā no želatīna un PUR, kurā šo polimēru šķiedras būtu izvietotas savstarpēji perpendikulāri. Respektīvi, PUR šķiedras būtu galvenokārt izvietotas garenvirzienā, savukārt, želatīna šķiedras radiālā virzienā.

6.3. Bioprotēžu stentu mehānisko īpašību potenciālais nozīmīgums vārstuļu protēžu ilgmūžībai

Pētījuma rezultāti liecina par to, ka vecākās, 2. paaudzes, bioprotēzes tika radītas ar salīdzinoši padevīgākiem fiksējošajiem karkasiem nekā modernās bioprotēzes. Jāatzīmē, ka arī abu agrīnāko bioprotēžu deformējamība ir savstarpēji ievērojami atšķirīga 3,87% *Medtronic Intact* un 8,7% *Carpentier Edwards (CE) Standard*. Ievērojami atšķiras arī materiāli, kas izmantoti šo protēžu ražošanā: *Medtronic* vārstulim fiksējošā stenta pamatā ir karkass no polimēru materiāla, savukārt, CE vārstuļa karkass ir no īpaša metālu sakausējuma – *Elgiloy*. Taču abu šo vārstuļu attālie rezultāti ir vienlīdzīgi labi [43, 44, 71], kas ļauj domāt, ka arī 3,87% ir pieņemams deformējamības rādītājs. Salīdzinot ar natīvas aortas saknes mehāniskajām īpašībām, CE vārstuļa karkass ir pat padevīgāks. Savukārt visi jaunākās paaudzes vārstuļu stenti ir salīdzinoši rigīdāki, ar zemāku stenta padevību salīdzinājumā ar agrīnās paaudzes bioprotēžu vidējo un natīvas aortas saknes deformējamību. Taču arī šo moderno protēžu attālie rezultāti ir ļoti labi [113, 172, 183]. Tādēļ jo grūtāk atbildēt uz jautājumu, kāda

būtu nepieciešamā vārstuļa karkasa minimālā deformējamība. Ja šis jautājums no tehniskā viedokļa nav pārāk nozīmīgs radot standarta bioprotēzes, tad pavisam citu nozīmīgumu tas iegūst radot jaunas stentprotēzes, jo tās savā pozīcijā aortas fibrozā gredzena līmenī notur tikai fiksējošā stenta radiālais spēks. Šī iemesla dēļ stentprotēžu stentam vienlaicīgi jābūt pietiekami rigīdam, lai tas noturētu vārstuli implantācijas pozīcijā un pietiekami padevīgam, lai tas neradītu mehāniskus bojājumus vārstuļa lapiņām. Pētījumā tika testēta viena jaunākās paaudzes stentprotēze – *ATS Enable*, kura tikai pavisam nesen ir ienākusi medicīnas preču tirgū un ir paredzēta implantācijai aortā standarta ķirurģiskā ceļā. Šīs protēzes stents ir izgatavots no nitinola, un tā radiālā deformējamība ir 3%, kas ir pat vairāk kā modernajām standarta bioprotēzēm. Par šo vārstuli gan pašlaik ir zināmi tikai agrīnie rezultāti [99, 136]. Taču, ņemot vērā, ka trans-katetra vārstuļu protēžu lauks ļoti strauji attīstās [171], parādās aizvien jaunas stentprotēzes, kuru stenti ir gatavoti no dažādiem materiāliem, ieskaitot nerūsējošo tēraudu. Šie stenti subjektīvi šķiet ļoti rigīdi, jo tiem ir jāsauglabā pareiza vārstuļa ģeometriskā konfigurācija izteikti kalcinētā aortas saknē kā arī jānofiksē protēze pareizā anatomiskajā pozīcijā. Attiecīgi lielas bažas rada šo protēžu ilgmūžība, vai tās nepiedzīvos pirmās paaudzes bioprotēzēm līdzīgu likteni. Tieši šīs protēzes, izvērtējot to sniegumu ilgtermiņā, daļēji spēs sniegt atbildi, vai stenta deformējamībai ir klīniska nozīme.

6.4. Pētījuma trūkumi un ierobežojumi

Galvenais pētījuma trūkums ir tas, ka tas tika veikts *in vitro* kontrolētas, relatīvi nemainīgas vides apstākļos. Attiecīgi, dati par materiālu biodegradāciju, kas iegūti no kultivēšanas ar COS-7 šūnām nevar tikt ekstrapolēti uz *in vivo* situāciju, kur vides apstākļi ir ļoti dinamiski, kur materiāls tiktu pakļauts dažādiem gan mehāniskiem, gan bioloģiskiem faktoriem. Līdzīgi, kaut arī kultivēšana ar COS-7 šūnām ļauj spriest par materiāla biosaderību ar šīm konkrētajām šūnām, tā neļauj izdarīt drošus vispārinātus spriedumus par pārbaudīto materiālu potenciālo biosaderīgumu *in vivo* vai par biosaderību ar citām šūnu līnijām.

Pētījums par bioprotēžu karkasu mehāniskajām īpašībām tika veikts tikai ar vienu katra parauga protēzi, kaut arī atkārtotos eksperimentos. Lai arī bioprotēžu

fiksējošie karkasi ir tie, kuru ražošanu ir iespējams visprecīzāk standartizēt, pastāv iespēja, ka pārbaudot vairākus katras protēzes eksemplārus tiktu atklāta nozīmīga rādītāju variabilitāte, kuras izvērtēšana konkrētajā pētījumā netika veikta. Bioprotēžu skaitu, kas bija pieejams pētījumam diktēja ne tikai finansiālie apsvērumi, bet arī fakts, ka, piemēram, divas vecākās bioprotēzes *CE Standart* un *Medtronic Intact* bija saglabājušās tikai vienā eksemplārā, kā arī *ATS Enable* no ražotāja tika laipni piedāvāta tikai vienā eksemplārā. Līdzīga problēma attiecināma uz bioprotēžu lapiņu pētījumiem, kuriem bija pieejamas pa trim no katras bioprotēzes, kas kopā sniedz 9 lapiņas no katras bioprotēzes. Tas dotajā pētījumā bija pietiekami, lai iegūtu statistiski nozīmīgus rezultātus, galvenokārt pateicoties salīdzinoši nelielajai iegūtu rezultātu variabilitātei starp atsevišķu bioprotēžu paraugiem.

7. SECINĀJUMI

Secinājumi I:

Aortas vārstuļa un bioprotēžu lapiņu mehānisko īpašību noteikšana

Sirds aortas vārstuļa bioprotēžu lapiņu mehāniskās īpašības nozīmīgi atšķiras no natīvajiem cūkas aortas vārstuļa lapiņu audiem. To mehāniskās īpašības ir dažādas, ko nosaka to dažādie fiksācijas apstākļi un izmantotais biomateriāls.

Visām pārbaudītajām bioprotēzēm piemīt natīvajiem vārstuļu audiem līdzīga nelineāra sprieguma-deformācijas attiecība un anizotropija.

Secinājumi II:

Aortas saknes un bioprotēžu fiksējošo karkasu mehānisko īpašību noteikšana

Pārbaudītās agrīnās paaudzes bioprotēzes ir ar padevīgākiem fiksējošajiem karkasiem salīdzinājumā ar modernajām protēzēm.

Minimālās bioprotēžu fiksējošā karkasa deformējamības vērtības ir 1,2% kseno-aortālajām un 3,0% ksenoperikardiālajām bioprotēzēm.

Secinājumi III:

Polimēru nanošķiedru materiālu izmantošanas iespēju izvērtēšana vārstuļu lapiņu audu inženierijas mērķiem

No nanošķiedru materiāliem pēc mehāniskajām īpašībām vislabāk radiālajam aortas vārstuļa lapiņu virzienam atbilst želatīns un garenvirzienam – poliuretāns. Lai visprecīzāk modelētu natīvo vārstuļu lapiņu mehāniskās īpašības, ieteicams kombinēts materiāls ar savstarpēji perpendikulāri izvietotām želatīna un poliuretāna šķiedrām.

Ilgstošā kultūrā ar COS-7 šūnām tika pierādīta pārbaudīto polimēru nanošķiedru materiālu biosaderība.

Pārbaudītie materiāli ir pielietojami sirds vārstuļu lapiņu audu inženierijas nolūkiem, pateicoties to biosaderībai un pietiekami lēnajai biodegradācijai.

8. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

- A. Rekomendējamās aortas vārstuļa lapiņu aizvietojošā materiāla mehānisko īpašību robežas ir apkopotas tabulā 8.1.

Jāņem vērā, ka nav iespējams apgalvot, ka bioprotēzes, kas neatbilst šiem kritērijiem, būtu pakļautas ātrākai degradācijai, jo tas netika pētīts. Iespējams tikai apgalvot, ka bioprotēzes, kuru lapiņu mehāniskās īpašības iekļaujas noteiktajās robežās, būs ar apmierinošu kalpošanas laiku, vismaz cik tas ir atkarīgs no protēžu lapiņu materiāla.

8.1. tabula

Rekomendētās aortas vārstuļa bioprotēžu lapiņu materiāla mehāniskās īpašības

Elastības modulis, MPa			
	Min	Optimāli	Max
Garenvirzienā	9,0	9,7	29,5
Radiāli	0,8	1,0	15,8
Graujošais spriegums, MPa			
	Min	Optimāli	Max
Garenvirzienā	2,3	2,3	8,9
Radiāli	0,4	0,5	5,2
Graujošā deformācija, %			
	Min	Optimāli	Max
Garenvirzienā	28,7	44,8	64,9
Radiāli	53,0	95,6	95,6

- B. Rekomendējamās aortas vārstuļa bioprotēžu fiksējošo karkasu mehāniskās īpašības, kas balstītas uz bioprotēžu un aortas saknes pētījumiem, ir apkopotas tabulā 8.2.

8.2. tabula

**Rekomendējamās aortas vārstuļa bioprotēžu fiksējošo karkasu
mehāniskās īpašības**

Radiālā deformējamība, %		
Min	Optimāli	Max
[*] 1,2	7,1	8,7
[#] 3,0		

* ksenoaortālām bioprotēzēm

ksenoperikarda bioprotēzēm

- C. Lai visprecīzāk modelētu natīvo vārstuļu lapiņu mehāniskās īpašības, ieteicams kombinēts materiāls ar savstarpēji perpendikulāri izvietotām želatīna un poliuretāna šķiedrām. Želatīna šķiedras nodrošinātu radiālajam virzienam tik svarīgo deformējamību, savukārt, poliuretāna šķiedras nodrošinātu garenvirzienam svarīgo mehānisko izturību.

9. PERSPEKTĪVIE TURPMĀKO PĒTĪJUMU VIRZIENI

Sirds vārstuļu bioprotēžu izstrāde ir pielietojamās zinātnes joma, kurā pašreiz ir ļoti daudz inovāciju, kas skar gan jaunu protēžu veidu, gan to ievades ceļu, gan jaunu materiālu izstrādi. Šī pētījuma rezultāti vistiešākajā veidā stimulē turpmākos pētījumus tieši jaunu protēžu un to struktūrkomponentu izstrādē. Kā galvenais perspektīvais nākotnes pētījumu virziens būtu jāmin autologa audu inženierijas ceļā radīta sirds vārstuļu aizvietotāja izstrāde. Iestrādes šādiem pētījumiem jau manāmas šinī darbā, jo praktiskajās rekomendācijās tiek definēts ideālais materiāls, kas būtu piemērots vārstuļa viru radīšanai audu inženierijas ceļā. Nākotnes pētījumi vistiešākajā mērā būtu saistāmi ar šāda kompozīta materiāla radīšanu un tā padziļinātu izpēti, izvērtējot gan tā reālās mehāniskās īpašības, gan biosaderību, gan šūnu infiltrēšanās spēju tajā u.c. Viennozīmīgi perspektīva ir arī citu jaunradīto polimēru nanošķiedru materiālu pārbaude, kultivējot ar cilmes šūnām, izvērtējot šūnu infiltrāciju atkarībā no materiāla porainības un šķiedru diametra. Šie ir aspekti, no kuriem vistiešākajā veidā ir atkarīgs audu inženierijas metožu sekmīgums, un kas netika pētīti pašreizējā darbā.

10. LITERATŪRASSARAKSTS

1. Zvidriņš P. Latvijas Demogrāfijas Attīstības Prognozes: 1998. – 2025. gads. Informatīvais Materiāls. – Rīga: LU Demogrāfijas centrs, 1999.
2. Akins C. W., Daggett W. M., Vlahakes G. J. et al. Cardiac Operations in Patients 80 Years Old and Older // *The Annals of thoracic surgery*, 1997; 64 (3): 606-614; discussion 614–605.
3. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice G., Society of Cardiovascular A., Society for Cardiovascular A. et al. Acc/Aha 2006 Guidelines for the Management of Patients with Valvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients with Valvular Heart Disease): Developed in Collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists: Endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons // *Circulation*, 2006; 114 (5): e84–e231.
4. Arcidiacono G., Corvi A., Severi T. Functional Analysis of Bioprosthetic Heart Valves // *Journal of biomechanics*, 2005; 38 (7): 1483–1490.
5. Bach D. S., Kon N. D., Dumesnil J. G. et al. Ten-Year Outcome after Aortic Valve Replacement with the Freestyle Stentless Bioprosthesis // *The Annals of thoracic surgery*, 2005; 80 (2): 480–487.
6. Badylak S. F. Xenogeneic Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Reconstruction // *Transplant immunology*, 2004; 12 (3): 367–377.
7. Bairati A., DeBiasi S. Presence of a Smooth Muscle System in Aortic Valve Leaflets // *Anatomy and embryology*, 1981; 161 (3): 329–340.
8. Barnes C. P., Sell S. A., Boland E. D. et al. Nanofiber Technology: Designing the Next Generation of Tissue Engineering Scaffolds // *Advanced drug delivery reviews*, 2007; 59 (14): 1413–1433.
9. Bashey R. I., Bashey H. M., Jimenez S. A. Characterization of Pepsin-Solubilized Bovine Heart-Valve Collagen // *The Biochemical journal*, 1978; 173 (3): 885–894.

10. Bellhouse B. J., Bellhouse F., Abbott J. A., Talbot L. Mechanism of Valvular Incompetence in Aortic Sinus Dilatation // Cardiovascular research, 1973; 7 (4): 490–494.
11. Bengtsson L., Haegerstrand A. Endothelialization of Mechanical Heart Valves in Vitro with Cultured Adult Human Cells // The Journal of heart valve disease, 1993; 2 (3): 352–361.
12. Bernacca G. M., Straub I., Wheatley D. J. Mechanical and Morphological Study of Biostable Polyurethane Heart Valve Leaflets Explanted from Sheep // Journal of biomedical materials research, 2002; 61 (1): 138–145.
13. Björk V. O. A New Tilting Disc Valve Prosthesis // Scandinavian Cardiovascular Journal, 1969; 3 (1): 1–10.
14. Bonow R. O., Carabello B. A., Chatterjee K. et al. 2008 Focused Update Incorporated into the Acc/Aha 2006 Guidelines for the Management of Patients with Valvular Heart Diseasea Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients with Valvular Heart Disease) Endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons // Journal of the American College of Cardiology, 2008; 52 (13): e1–e142.
15. Borger M. A., Ivanov J., Armstrong S. et al. Twenty-Year Results of the Hancock II Bioprosthesis // The Journal of heart valve disease, 2006; 15 (1): 49–55; discussion 55–56.
16. Brewer R. J., Deck J. D., Capati B., Nolan S. P. The Dynamic Aortic Root. Its Role in Aortic Valve Function // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1976; 72 (3): 413–417.
17. Bridgewater B., Gummert J., Kinsman R., Walton P. Towards Global Benchmarking: The Fourth Eacts Adult Cardiac Surgical Database Report 2010 // Henley-on-Thames, Oxfordshire, UK: Dendrite Clinical Systems, 2010;
18. Broom N. The Stress/Strain and Fatigue Behaviour of Glutaraldehyde Preserved Heart-Valve Tissue // Journal of biomechanics, 1977; 10 (11): 707–724.
19. Broom N., Thomson F. J. Influence of Fixation Conditions on the Performance of Glutaraldehyde-Treated Porcine Aortic Valves: Towards a More Scientific Basis // Thorax, 1979; 34 (2): 166–176.

20. Butcher J. T., Nerem R. M. Porcine Aortic Valve Interstitial Cells in Three-Dimensional Culture: Comparison of Phenotype with Aortic Smooth Muscle Cells // *The Journal of heart valve disease*, 2004; 13 (3): 478–485; discussion 485–476.
21. Butcher J. T., Penrod A. M., Garcia A. J., Nerem R. M. Unique Morphology and Focal Adhesion Development of Valvular Endothelial Cells in Static and Fluid Flow Environments // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2004; 24 (8): 1429–1434.
22. Cacciola G., Peters G., Baaijens F. A Synthetic Fiber-Reinforced Stentless Heart Valve // *Journal of biomechanics*, 2000; 33 (6): 653–658.
23. Cacciola G., Peters G., Schreurs P. A Three-Dimensional Mechanical Analysis of a Stentless Fibre-Reinforced Aortic Valve Prosthesis // *Journal of biomechanics*, 2000; 33 (5): 521–530.
24. Carapetis J. R., Steer A. C., Mulholland E. K., Weber M. The Global Burden of Group A Streptococcal Diseases // *The Lancet infectious diseases*, 2005; 5 (11): 685–694.
25. Caves J. M., Kumar V. A., Wen J. et al. Fibrillogenesis in Continuously Spun Synthetic Collagen Fiber // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2010; 93 (1): 24–38.
26. Chen C. S., Mrksich M., Huang S. et al. Geometric Control of Cell Life and Death // *Science*, 1997; 276 (5317): 1425–1428.
27. Chen J.-P., Chang G.-Y., Chen J.-K. Electrospun Collagen/Chitosan Nanofibrous Membrane as Wound Dressing // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008; 313 183–188.
28. Chew S. Y., Hufnagel T. C., Lim C. T., Leong K. W. Mechanical Properties of Single Electrospun Drug-Encapsulated Nanofibres // *Nanotechnology*, 2006; 17 (15): 3880–3892.
29. Christie G. Computer Modelling of Bioprosthetic Heart Valves // *European journal of cardio-thoracic surgery*, 1992; 6 (Supplement 1): S95–S101.
30. Christie G. W. Anatomy of Aortic Heart Valve Leaflets: The Influence of Glutaraldehyde Fixation on Function // *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 1992; 6 Suppl 1 S25–32; discussion S33.
31. Chung S., King M. W. Design Concepts and Strategies for Tissue Engineering Scaffolds // *Biotechnology and applied biochemistry*, 2011; 58 (6): 423–438.

32. Cimini M., Rogers K. A., Boughner D. R. Smoothelin-Positive Cells in Human and Porcine Semilunar Valves // *Histochemistry and cell biology*, 2003; 120 (4): 307–317.
33. Cole W., Chan D., Hickey A., Wilcken D. Collagen Composition of Normal and Myxomatous Human Mitral Heart Valves // *Biochem J*, 1984; 219: 451–460.
34. Cole W. G., Chan D., Hickey A. J., Wilcken D. E. Collagen Composition of Normal and Myxomatous Human Mitral Heart Valves // *The Biochemical journal*, 1984; 219 (2): 451–460.
35. Collins J. M., Ayala P., Desai T. A., Russell B. Three---Dimensional Culture with Stiff Microstructures Increases Proliferation and Slows Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells // *Small*, 2010; 6 (3): 355–360.
36. Cornwell K. G., Lei P., Andreadis S. T., Pins G. D. Crosslinking of Discrete Self---Assembled Collagen Threads: Effects on Mechanical Strength and Cell–Matrix Interactions // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007; 80 (2): 362–371.
37. Cortese B., Gigli G., Riehle M. Mechanical Gradient Cues for Guided Cell Motility and Control of Cell Behavior on Uniform Substrates // *Advanced Functional Materials*, 2009; 19 (18): 2961–2968.
38. Cotrufo M., De Feo M., De Santo L. S. et al. Risk of Warfarin During Pregnancy with Mechanical Valve Prostheses // *Obstetrics & Gynecology*, 2002; 99 (1): 35–40.
39. Cribier A., Eltchaninoff H., Bash A. et al. Percutaneous Transcatheter Implantation of an Aortic Valve Prosthesis for Calcific Aortic Stenosis First Human Case Description // *Circulation*, 2002; 106 (24): 3006–3008.
40. Daebritz S. H., Fausten B., Hermanns B. et al. Introduction of a Flexible Polymeric Heart Valve Prosthesis with Special Design for Aortic Position // *European journal of cardio-thoracic surgery*, 2004; 25 (6): 946–952.
41. Daebritz S. H., Sachweh J. S., Hermanns B. et al. Introduction of a Flexible Polymeric Heart Valve Prosthesis with Special Design for Mitral Position // *Circulation*, 2003; 108 (10 suppl 1): II-134–II-139.
42. De Hart J., Peters G., Schreurs P., Baaijens F. A Three-Dimensional Computational Analysis of Fluid–Structure Interaction in the Aortic Valve // *Journal of biomechanics*, 2003; 36 (1): 103–112.

43. De La Fuente A., Sánchez J. R., Fernández J. L. et al. The Medtronic Intact Bioprosthesis: Clinical and Hemodynamic Performance over 13 Years // *Artificial organs*, 2002; 26 (10): 851–855.
44. De la Fuente A., Sánchez R., Imizcoz A. et al. Intact Medtronic and Carpentier Edwards Sav: Clinical and Hemodynamic Outcomes over 13 Years // *Cardiovascular surgery*, 2003; 11 (2): 139–144.
45. Deck J. D. Endothelial Cell Orientation on Aortic Valve Leaflets // *Cardiovascular research*, 1986; 20 (10): 760–767.
46. DECK J. D., THUBRIKAR M. J., SCHNEIDER P. J., NOLAN S. P. Structure, Stress, and Tissue Repair in Aortic Valve Leaflets // *Cardiovascular research*, 1988; 22 (1): 7–16.
47. Della Rocca F., Sartore S., Guidolin D. et al. Cell Composition of the Human Pulmonary Valve: A Comparative Study with the Aortic Valve--the Vesalio Project. *Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingegnoso Obtinebitur* // *The Annals of thoracic surgery*, 2000; 70 (5): 1594–1600.
48. Discher D. E., Janmey P., Wang Y.-l. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate // *Science*, 2005; 310 (5751): 1139–1143.
49. Drury J. L., Mooney D. J. Hydrogels for Tissue Engineering: Scaffold Design Variables and Applications // *Biomaterials*, 2003; 24 (24): 4337–4351.
50. Duan Y., Wang Z., Yan W. et al. Preparation of Collagen-Coated Electrospun Nanofibers by Remote Plasma Treatment and Their Biological Properties // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2007; 18 (9): 1153–1164.
51. Ellsmere J. C., Khanna R. A., Michael Lee J. Mechanical Loading of Bovine Pericardium Accelerates Enzymatic Degradation // *Biomaterials*, 1999; 20 (12): 1143–1150.
52. Ennker J., Albert A., Ennker I. Stentless Aortic Valves. Current Aspects // *HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia*, 2012; 4 (2): 77–83.
53. Fann J. I., Miller D. C., Moore K. A. et al. Twenty-Year Clinical Experience with Porcine Bioprostheses // *The Annals of thoracic surgery*, 1996; 62 (5): 1301–1311; discussion 1311–1302.
54. Filip D. A., Radu A., Simionescu M. Interstitial Cells of the Heart Valves Possess Characteristics Similar to Smooth Muscle Cells // *Circulation research*, 1986; 59 (3): 310–320.

55. Flomenbaum M. A., Schoen F. J. Effects of Fixation Back Pressure and Antimineralization Treatment on the Morphology of Porcine Aortic Bioprosthetic Valves // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1993; 105 (1): 154–164.
56. Galbraith C. G., Sheetz M. P. Forces on Adhesive Contacts Affect Cell Function // Current opinion in cell biology, 1998; 10 (5): 566–571.
57. Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K. M. Transmembrane Crosstalk between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton // Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001; 2 (11): 793–805.
58. Gosline J. M. Hydrophobic Interaction and a Model for the Elasticity of Elastin // Biopolymers, 1978; 17 (3): 677–695.
59. Gross L., Kugel M. A. Topographic Anatomy and Histology of the Valves in the Human Heart // The American journal of pathology, 1931; 7 (5): 445–474.
60. Gulbins H., Goldemund A., Anderson I. et al. Preseeding with Autologous Fibroblasts Improves Endothelialization of Glutaraldehyde-Fixed Porcine Aortic Valves // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2003; 125 (3): 592–601.
61. Harken D. E. Heart Valves: Ten Commandments and Still Counting // The Annals of thoracic surgery, 1989; 48 (3): S18–S19.
62. Haziza F., Papouin G., Barratt-Boyes B. et al. Tears in Bioprosthetic Heart Valve Leaflets without Calcific Degeneration // The Journal of heart valve disease, 1996; 5 (1): 35–44.
63. He W., Ma Z., Yong T. et al. Fabrication of Collagen-Coated Biodegradable Polymer Nanofiber Mesh and Its Potential for Endothelial Cells Growth // Biomaterials, 2005; 26 (36): 7606–7615.
64. Hoerstrup S. P., Kadner A., Breyman C. et al. Living, Autologous Pulmonary Artery Conduits Tissue Engineered from Human Umbilical Cord Cells // The Annals of thoracic surgery, 2002; 74 (1): 46–52.
65. Hoerstrup S. P., Kadner A., Melnitchouk S. et al. Tissue Engineering of Functional Trileaflet Heart Valves from Human Marrow Stromal Cells // Circulation, 2002; 106 (12 suppl 1): I-143–I-150.
66. Hoerstrup S. P., Sodian R., Daebritz S. et al. Functional Living Trileaflet Heart Valves Grown in Vitro // Circulation, 2000; 102 (suppl 3): Iii-44–Iii-49.

67. Hubbell J. A., Massia S. P., Desai N. P., Drumheller P. D. Endothelial Cell-Selective Materials for Tissue Engineering in the Vascular Graft Via a New Receptor // *Nature Biotechnology*, 1991; 9 (6): 568–572.
68. Hyde J., Chinn J., Phillips Jr R. Polymer Heart Valves // *The Journal of heart valve disease*, 1999; 8 (3): 331–340.
69. Iung B., Baron G., Butchart E. G. et al. A Prospective Survey of Patients with Valvular Heart Disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease // *European heart journal*, 2003; 24 (13): 1231–1243.
70. Iung B., Baron G., Butchart E. G. et al. A Prospective Survey of Patients with Valvular Heart Disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease // *European heart journal*, 2003; 24 (13): 1231–1243.
71. Jamieson W., Miyagishima R., Burr L. et al. Carpentier-Edwards Porcine Bioprostheses: Clinical Performance Assessed by Actual Analysis // *The Journal of heart valve disease*, 2000; 9 (4): 530–538.
72. Jansson K., Bengtsson L., Swedenborg J., Haegerstrand A. In Vitro Endothelialization of Bioprosthetic Heart Valves Provides a Cell Monolayer with Proliferative Capacities and Resistance to Pulsatile Flow // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2001; 121 (1): 108–115.
73. Kalejs M., Stradins P., Lacis R. et al. St Jude Epic Heart Valve Bioprostheses Versus Native Human and Porcine Aortic Valves - Comparison of Mechanical Properties // *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 2009; 8 (5): 553–556.
74. Kalejs M., Stradins P., Zarova L. et al. Aortic Valve Replacement in Latvia Influenced by an Ageing Population and Transcatheter Procedures - an Update // *Acta Chirurgica Latviensis*, 2011; 11 (-1): 94–97.
75. Kanke Y., Bashey R., Mori Y., Angrist A. Some Preliminary Observations on the Mucopolysaccharide and Glycoprotein Formation in Bovine Heart Valves // *Life Sciences*, 1970; 9 (19): 1081–1089.
76. Kastelic J., Baer E. Deformation in Tendon Collagen // *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 1980; 34 397–435.
77. Kasyanov V., Ozolanta I., Purinya B. et al. Compliance of a Biocomposite Vascular Tissue in Longitudinal and Circumferential Directions as a Basis for Creating Artificial Substitutes // *Mechanics of composite materials*, 2003; 39 (4): 347–358.

78. Kirali K., Guler M., Tuncer A. et al. Fifteen-Year Clinical Experience with the Biocor Porcine Bioprostheses in the Mitral Position // *The Annals of thoracic surgery*, 2001; 71 (3): 811–815.
79. Kumari A., Yadav S. K., Yadav S. C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010; 75 (1): 1–18.
80. L'heureux N., Pâquet S., Labbé R. et al. A Completely Biological Tissue-Engineered Human Blood Vessel // *The FASEB Journal*, 1998; 12 (1): 47-56.
81. Langanki D., Ogle M., Cameron J. et al. Evaluation of a Novel Bioprosthetic Heart Valve Incorporating Anticalcification and Antimicrobial Technology in a Sheep Model // *The Journal of heart valve disease*, 1998; 7 (6): 633–641.
82. Lanir Y. Constitutive Equations for Fibrous Connective Tissues // *Journal of biomechanics*, 1983; 16 (1): 1–12.
83. Lansac E., Lim H. S., Shomura Y. et al. A Four-Dimensional Study of the Aortic Root Dynamics // *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 2002; 22 (4): 497–503.
84. Lee T. C., Midura R. J., Hascall V. C., Vesely I. The Effect of Elastin Damage on the Mechanics of the Aortic Valve // *Journal of biomechanics*, 2001; 34 (2): 203–210.
85. Legarra J. J., Llorens R., Catalan M. et al. Eighteen-Year Follow up after Hancock II Bioprosthesis Insertion // *The Journal of heart valve disease*, 1999; 8 (1): 16–24.
86. Lehmann S., Walther T., Kempfert J. et al. Mechanical Strain and the Aortic Valve: Influence on Fibroblasts, Extracellular Matrix, and Potential Stenosis // *The Annals of thoracic surgery*, 2009; 88 (5): 1476–1483.
87. Lehmann S., Walther T., Leontjev S. et al. Mid-Term Results after Epic Xenograft Implantation for Aortic, Mitral, and Double Valve Replacement // *The Journal of heart valve disease*, 2007; 16 (6): 641–648; discussion 648.
88. Leipzig N. D., Shoichet M. S. The Effect of Substrate Stiffness on Adult Neural Stem Cell Behavior // *Biomaterials*, 2009; 30 (36): 6867–6878.
89. Levy-Mishali M., Zoldan J., Levenberg S. Effect of Scaffold Stiffness on Myoblast Differentiation // *Tissue Engineering Part A*, 2009; 15 (4): 935–944.
90. Levy R. J., Schoen F. J., Levy J. T. et al. Biologic Determinants of Dystrophic Calcification and Osteocalcin Deposition in Glutaraldehyde-Preserved Porcine

- Aortic Valve Leaflets Implanted Subcutaneously in Rats // *The American journal of pathology*, 1983; 113 (2): 143–150.
91. Li M., Mondrinos M. J., Gandhi M. R. et al. Electrospun Protein Fibers as Matrices for Tissue Engineering // *Biomaterials*, 2005; 26 (30): 5999–6008.
 92. Libby P., Braunwald E. B. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. – 8th ed. – Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008.
 93. Lindqvist A. Beat-to-Beat Agreement of Non-Invasive Finger Artery and Invasive Radial Artery Blood Pressure in Hypertensive Patients Taking Cardiovascular Medication // *Clinical physiology*, 1995; 15 (3): 219–229.
 94. Lo C.-M., Wang H.-B., Dembo M., Wang Y.-I. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate // *Biophysical journal*, 2000; 79 (1): 144–152.
 95. Lutolf M., Hubbell J. Synthetic Biomaterials as Instructive Extracellular Microenvironments for Morphogenesis in Tissue Engineering // *Nature biotechnology*, 2005; 23 (1): 47–55.
 96. Ma Z., Kotaki M., Inai R., Ramakrishna S. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds // *Tissue engineering*, 2005; 11 (1-2): 101–109.
 97. Mackay T., Wheatley D., Bernacca G. et al. New Polyurethane Heart Valve Prosthesis: Design, Manufacture and Evaluation // *Biomaterials*, 1996; 17 (19): 1857–1863.
 98. Marron K., Yacoub M. H., Polak J. M. et al. Innervation of Human Atrioventricular and Arterial Valves // *Circulation*, 1996; 94 (3): 368–375.
 99. Martens S., Ploss A., Sirat S. et al. Sutureless Aortic Valve Replacement with the 3f Enable Aortic Bioprosthesis // *The Annals of thoracic surgery*, 2009; 87 (6): 1914–1917.
 100. Matthews J. A., Wnek G. E., Simpson D. G., Bowlin G. L. Electrospinning of Collagen Nanofibers // *Biomacromolecules*, 2002; 3 (2): 232–238.
 101. Mavrilas D., Missirlis Y. An Approach to the Optimization of Preparation of Bioprosthetic Heart Valves // *Journal of biomechanics*, 1991; 24 (5): 331–339.
 102. Mayne A. S., Christie G. W., Smaill B. H. et al. An Assessment of the Mechanical Properties of Leaflets from Four Second-Generation Porcine Bioprostheses with Biaxial Testing Techniques // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 1989; 98 (2): 170–180.

103. McManus M. C., Boland E. D., Simpson D. G. et al. Electrospun Fibrinogen: Feasibility as a Tissue Engineering Scaffold in a Rat Cell Culture Model // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007; 81 (2): 299–309.
104. Merryman W. D., Youn I., Lukoff H. D. et al. Correlation between Heart Valve Interstitial Cell Stiffness and Transvalvular Pressure: Implications for Collagen Biosynthesis // *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2006; 290 (1): H224–231.
105. Messier R. H., Jr., Bass B. L., Aly H. M. et al. Dual Structural and Functional Phenotypes of the Porcine Aortic Valve Interstitial Population: Characteristics of the Leaflet Myofibroblast // *The Journal of surgical research*, 1994; 57 (1): 1–21.
106. Mirnajafi A., Raymer J. M., McClure L. R., Sacks M. S. The Flexural Rigidity of the Aortic Valve Leaflet in the Commissural Region // *Journal of biomechanics*, 2006; 39 (16): 2966–2973.
107. Misfeld M., Sievers H. H. Heart Valve Macro- and Microstructure // *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*, 2007; 362 (1484): 1421–1436.
108. Missirlis Y. F., Armeniades C. D. Ultrastructure of the Human Aortic Valve // *Acta anatomica*, 1977; 98 (2): 199–205.
109. Missirlis Y. F., Chong M. Aortic Valve Mechanics--Part I: Material Properties of Natural Porcine Aortic Valves // *Journal of bioengineering*, 1978; 2 (3–4): 287–300.
110. Mol A., Smits A. I., Bouten C. V., Baaijens F. P. Tissue Engineering of Heart Valves: Advances and Current Challenges // *Expert review of medical devices*, 2009; 6 (3): 259–275.
111. Morsi Y. S., Birchall I. E., Rosenfeldt F. L. Artificial Aortic Valves: An Overview // *The International journal of artificial organs*, 2004; 27 (6): 445–451.
112. Mulholland D. L., Gotlieb A. I. Cell Biology of Valvular Interstitial Cells // *The Canadian journal of cardiology*, 1996; 12 (3): 231–236.
113. Myken P. S. Seventeen-Year Experience with the St. Jude Medical Biocor Porcine Bioprosthesis // *The Journal of heart valve disease*, 2005; 14 (4): 486–492.
114. Nimni M. E. The Molecular Organization of Collagen and Its Role in Determining the Biophysical Properties of the Connective Tissues // *Biorheology*, 1980; 17 (1-2): 51–82.

115. Nkomo V. T., Gardin J. M., Skelton T. N. et al. Burden of Valvular Heart Diseases: A Population-Based Study // *The Lancet*, 2006; 368 (9540): 1005–1011.
116. O'brien M., Goldstein S., Walsh S. et al. The Synergraft Valve: A New Acellular (Nonglutaraldehyde-Fixed) Tissue Heart Valve for Autologous Recellularization First Experimental Studies before Clinical Implantation // *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1999; 4 (Supplement 1): 194–200.
117. Olsson M., Janfjall H., Orth-Gomer K. et al. Quality of Life in Octogenarians after Valve Replacement Due to Aortic Stenosis. A Prospective Comparison with Younger Patients // *European heart journal*, 1996; 17 (4): 583–589.
118. Otto C. M., Lind B. K., Kitzman D. W. et al. Association of Aortic-Valve Sclerosis with Cardiovascular Mortality and Morbidity in the Elderly // *The New England journal of medicine*, 1999; 341 (3): 142–147.
119. Pek Y. S., Wan A. C., Ying J. Y. The Effect of Matrix Stiffness on Mesenchymal Stem Cell Differentiation in a 3d Thixotropic Gel // *Biomaterials*, 2010; 31 (3): 385–391.
120. Pelham R. J., Wang Y.-I. Cell Locomotion and Focal Adhesions Are Regulated by Substrate Flexibility // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997; 94 (25): 13661–13665.
121. Pinchuk L. A Review of the Biostability and Carcinogenicity of Polyurethanes in Medicine and the New Generation Of'biostable'polyurethanes // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1995; 6 (3): 225–267.
122. Pitt C. G., Chasalow F., Hibionada Y. et al. Aliphatic Polyesters. I. The Degradation of Poly (ϵ ---Caprolactone) in Vivo // *Journal of Applied Polymer Science*, 1981; 26 (11): 3779–3787.
123. Powell H., Boyce S. Fiber Density of Electrospun Gelatin Scaffolds Regulates Morphogenesis of Dermal–Epidermal Skin Substitutes // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008; 84 (4): 1078–1086.
124. Powell H. M., Supp D. M., Boyce S. T. Influence of Electrospun Collagen on Wound Contraction of Engineered Skin Substitutes // *Biomaterials*, 2008; 29 (7): 834–843.
125. Purinya B., Kasyanov V., Volkolakov J. et al. Biomechanical and Structural Properties of the Explanted Bioprosthetic Valve Leaflets // *Journal of biomechanics*, 1994; 27 (1): 1–11.

126. Rabkin-Aikawa E., Farber M., Aikawa M., Schoen F. J. Dynamic and Reversible Changes of Interstitial Cell Phenotype During Remodeling of Cardiac Valves // *The Journal of heart valve disease*, 2004; 13 (5): 841–847.
127. Reneker D. H., Yarin A. L., Fong H., Koombhongse S. Bending Instability of Electrically Charged Liquid Jets of Polymer Solutions in Electrospinning // *Journal of Applied physics*, 2000; 87: 4531–4542.
128. Reul H., Vahlbruch A., Giersiepen M. et al. The Geometry of the Aortic Root in Health, at Valve Disease and after Valve Replacement // *Journal of biomechanics*, 1990; 23 (2): 181–191.
129. Rippel R. A., Ghanbari H., Seifalian A. M. Tissue-Engineered Heart Valve: Future of Cardiac Surgery // *World journal of surgery*, 2012; 36 (7): 1581–1591.
130. Rizzoli G., Bottio T., Thiene G. et al. Long-Term Durability of the Hancock II Porcine Bioprosthesis // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2003; 126 (1): 66–74.
131. Roberts W. C., Ko J. M. Frequency by Decades of Unicuspid, Bicuspid, and Tricuspid Aortic Valves in Adults Having Isolated Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis, with or without Associated Aortic Regurgitation // *Circulation*, 2005; 111 (7): 920–925.
132. Rousseau E. P., Sauren A. A., van Hout M. C., van Steenhoven A. A. Elastic and Viscoelastic Material Behaviour of Fresh and Glutaraldehyde-Treated Porcine Aortic Valve Tissue // *Journal of biomechanics*, 1983; 16 (5): 339–348.
133. Sacks M. S. A Method for Planar Biaxial Mechanical Testing That Includes in-Plane Shear // *Journal of biomechanical engineering*, 1999; 121 (5): 551–555.
134. Sacks M. S., Schoen F. J. Collagen Fiber Disruption Occurs Independent of Calcification in Clinically Explanted Bioprosthetic Heart Valves // *Journal of biomedical materials research*, 2002; 62 (3): 359–371.
135. Sacks M. S., Yoganathan A. P. Heart Valve Function: A Biomechanical Perspective // *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*, 2007; 362 (1484): 1369–1391.
136. Sadowski J., Kapelak B., Pfitzner R., Bartuś K. Sutureless Aortic Valve Bioprosthesis' 3f/Ats Enable'--4.5 Years of a Single-Centre Experience // *Kardiologia polska*, 2009; 67 (8A): 956–964.
137. Sako E. Y. Newer Concepts in the Surgical Treatment of Valvular Heart Disease // *Current cardiology reports*, 2004; 6 (2): 100–105.

138. Sartore S., Franch R., Roelofs M., Chiavegato A. Molecular and Cellular Phenotypes and Their Regulation in Smooth Muscle // Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology, 1999; 134 235–320.
139. Sauren A., Kuijpers W., Van Steenhoven A., Veldpaus F. Aortic Valve Histology and Its Relation with Mechanics—Preliminary Report // Journal of biomechanics, 1980; 13 (2): 97–104.
140. Sauren A., Van Hout M., Van Steenhoven A. et al. The Mechanical Properties of Porcine Aortic Valve Tissues // Journal of biomechanics, 1983; 16 (5): 327–337.
141. Schmidt D., Stock U. A., Hoerstrup S. P. Tissue Engineering of Heart Valves Using Decellularized Xenogeneic or Polymeric Starter Matrices // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007; 362 (1484): 1505–1512.
142. Schoen F., Levy R., Nelson A. et al. Onset and Progression of Experimental Bioprosthetic Heart Valve Calcification // Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1985; 52 (5): 523–534.
143. Schoen F. J. Aortic Valve Structure-Function Correlations: Role of Elastic Fibers No Longer a Stretch of the Imagination // The Journal of heart valve disease, 1997; 6 (1): 1–6.
144. Schoen F. J. Evolving Concepts of Cardiac Valve Dynamics: The Continuum of Development, Functional Structure, Pathobiology, and Tissue Engineering // Circulation, 2008; 118 (18): 1864–1880.
145. Schoen F. J., Levy R. J. Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress toward Understanding and Prevention // The Annals of thoracic surgery, 2005; 79 (3): 1072–1080.
146. Schoen F. J., Levy R. J. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Perspectives. Providence, Ri, April 28-May 2, 1999. Tissue Heart Valves: Current Challenges and Future Research Perspectives // Journal of biomedical materials research, 1999; 47 (4): 439–465.
147. Schoen F. J., Levy R. J., Piehler H. R. Pathological Considerations in Replacement Cardiac Valves // Cardiovascular Pathology, 1992; 1 (1): 29–52.
148. Senthilnathan V., Treasure T., Grunkemeier G., Starr A. Heart Valves: Which is the Best Choice? // Cardiovascular surgery, 1999; 7 (4): 393–397.

149. Shapira O. M., Kelleher R. M., Zelingher J. et al. Prognosis and Quality of Life after Valve Surgery in Patients Older Than 75 Years // *Chest*, 1997; 112 (4): 885–894.
150. Shinoka T., Breuer C. K., Tanel R. E. et al. Tissue Engineering Heart Valves: Valve Leaflet Replacement Study in a Lamb Model // *The Annals of thoracic surgery*, 1995; 60 S513–S516.
151. Shinoka T., Ma P. X., Shum-Tim D. et al. Tissue-Engineered Heart Valves. Autologous Valve Leaflet Replacement Study in a Lamb Model // *Circulation*, 1996; 94 (9 Suppl): II164–168.
152. Singh J. P., Evans J. C., Levy D. et al. Prevalence and Clinical Determinants of Mitral, Tricuspid, and Aortic Regurgitation (the Framingham Heart Study) // *The American journal of cardiology*, 1999; 83 (6): 897–902.
153. Smith I., Liu X., Smith L., Ma P. Nanostructured Polymer Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009; 1 (2): 226–236.
154. Soler-Soler J., Galve E. Worldwide Perspective of Valve Disease // *Heart*, 2000; 83 (6): 721–725.
155. Stewart B. F., Siscovick D., Lind B. K. et al. Clinical Factors Associated with Calcific Aortic Valve Disease. Cardiovascular Health Study // *Journal of the American College of Cardiology*, 1997; 29 (3): 630–634.
156. Stock U., Vacanti J., Mayer Jr J., Wahlers T. Tissue Engineering of Heart Valves- Current Aspects // *The Thoracic and cardiovascular surgeon*, 2002; 50 (03): 184–193.
157. Stradins P., Kalejs M., Koris A. et al. Changes in Valve Replacement Surgery in Latvia – Influence of an Ageing Population. // *Acta Chirurgica Latviensis*, 2007; 7 16–19.
158. Stradins P., Lacis R., Ozolanta I. et al. Comparison of Biomechanical and Structural Properties between Human Aortic and Pulmonary Valve // *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 2004; 26 (3): 634–639.
159. Sun W., Sacks M. S., Sellaro T. L. et al. Biaxial Mechanical Response of Bioprosthetic Heart Valve Biomaterials to High in-Plane Shear // *Journal of biomechanical engineering*, 2003; 125 (3): 372–380.

160. Swanson M., Clark R. E. Dimensions and Geometric Relationships of the Human Aortic Valve as a Function of Pressure // *Circulation research*, 1974; 35 (6): 871–882.
161. Tamura K., Fukuda Y., Ishizaki M. et al. Abnormalities in Elastic Fibers and Other Connective-Tissue Components of Floppy Mitral Valve // *American heart journal*, 1995; 129 (6): 1149–1158.
162. Taylor P. M., Allen S. P., Yacoub M. H. Phenotypic and Functional Characterization of Interstitial Cells from Human Heart Valves, Pericardium and Skin // *The Journal of heart valve disease*, 2000; 9 (1): 150–158.
163. Taylor P. M., Batten P., Brand N. J. et al. The Cardiac Valve Interstitial Cell // *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2003; 35 (2): 113–118.
164. Thomson R. C., Shung A. K., Yaszemski M., Mikos A. G. Polymer Scaffold Processing // *Principles of tissue engineering*, 2000; 251–262.
165. Thubrikar M., Deck J., Aouad J., Nolan S. Role of Mechanical Stress in Calcification of Aortic Bioprosthetic Valves // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 1983; 86 (1): 115–124.
166. Thubrikar M., Piepgrass W. C., Bosher L. P., Nolan S. P. The Elastic Modulus of Canine Aortic Valve Leaflets in Vivo and in Vitro // *Circulation research*, 1980; 47 (5): 792–800.
167. Tomasek J. J., Gabbiani G., Hinz B. et al. Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling // *Nature reviews Molecular cell biology*, 2002; 3 (5): 349–363.
168. Trantina-Yates A. E., Human P., Bracher M., Zilla P. Mitigation of Bioprosthetic Heart Valve Degeneration through Biocompatibility: In Vitro Versus Spontaneous Endothelialization // *Biomaterials*, 2001; 22 (13): 1837–1846.
169. Uhari M., Nuutinen E. M., Turtinen J. et al. Blood Pressure in Children, Adolescents and Young Adults // *Annals of medicine*, 1991; 23 (1): 47–51.
170. Vacanti J. P., Langer R. Tissue Engineering: The Design and Fabrication of Living Replacement Devices for Surgical Reconstruction and Transplantation // *The Lancet*, 1999; 354 S32–S34.
171. Vahanian A., Alfieri O., Andreotti F. et al. Guidelines on the Management of Valvular Heart Disease (Version 2012) the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (Esc) and

- the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (Eacts) // European heart journal, 2012; 33 (19): 2451–2496.
172. Valfrè C., Ius P., Minniti G. et al. The Fate of Hancock II Porcine Valve Recipients 25 Years after Implant // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2010; 38 (2): 141–146.
 173. van den Bosch E., Gielens C. Gelatin Degradation at Elevated Temperature // International journal of biological macromolecules, 2003; 32 (3): 129–138.
 174. van Geldorp M. W., Eric Jamieson W., Kappetein A. P. et al. Patient Outcome after Aortic Valve Replacement with a Mechanical or Biological Prosthesis: Weighing Lifetime Anticoagulant-Related Event Risk against Reoperation Risk // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2009; 137 (4): 881–886. e885.
 175. Varadarajan P., Kapoor N., Bansal R. C., Pai R. G. Clinical Profile and Natural History of 453 Nonsurgically Managed Patients with Severe Aortic Stenosis // The Annals of thoracic surgery, 2006; 82 (6): 2111–2115.
 176. Vesely I. The Evolution of Bioprosthetic Heart Valve Design and Its Impact on Durability // Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology, 2003; 12 (5): 277–286.
 177. Vesely I. The Role of Elastin in Aortic Valve Mechanics // Journal of biomechanics, 1998; 31 (2): 115–123.
 178. Vesely I., Barber J., Ratliff N. Tissue Damage and Calcification May Be Independent Mechanisms of Bioprosthetic Heart Valve Failure // The Journal of heart valve disease, 2001; 10 (4): 471–480.
 179. Vesely I., Boughner D., Song T. Tissue Buckling as a Mechanism of Bioprosthetic Valve Failure // The Annals of thoracic surgery, 1988; 46 (3): 302–308.
 180. Vesely I., Noseworthy R. Micromechanics of the Fibrosa and the Ventricularis in Aortic Valve Leaflets // Journal of biomechanics, 1992; 25 (1): 101–113.
 181. Vesely I., Noseworthy R. Micromechanics of the Fibrosa and the Ventricularis in Aortic Valve Leaflets // Journal of biomechanics, 1992; 25 (1): 101–113.
 182. Viidik T., Marshall D. G. Direct Inguinal Hernias in Infancy and Early Childhood // Journal of pediatric surgery, 1980; 15 (5): 646–647.
 183. Vohra H. A., Whistance R. N., Bolgeri M. et al. Mid-Term Evaluation of Sorin Soprano Bioprostheses in Patients with a Small Aortic Annulus ≤ 20 Mm // Interactive cardiovascular and thoracic surgery, 2010; 10 (3): 399–402.

184. Vyavahare N., Ogle M., Schoen F. J. et al. Mechanisms of Bioprosthetic Heart Valve Failure: Fatigue Causes Collagen Denaturation and Glycosaminoglycan Loss // Journal of biomedical materials research, 1999; 46 (1): 44–50.
185. Wissink M., Van Luyn M., Beernink R. et al. Endothelial Cell Seeding on Crosslinked Collagen: Effects of Crosslinking on Endothelial Cell Proliferation and Functional Parameters // ENDOTHELIALIZATION OF COLLAGEN MATRICES, 2000; 105–112.
186. Woodward S. C., Brewer P., Moatamed F. et al. The Intracellular Degradation of Poly (E---Caprolactone) // Journal of biomedical materials research, 1985; 19 (4): 437–444.
187. Writing Group M., Lloyd-Jones D., Adams R. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2010 Update: A Report from the American Heart Association // Circulation, 2010; 121 (7): e46–e215.
188. Zeugolis D. I., Paul G. R., Attenburrow G. Cross---Linking of Extruded Collagen Fibers - a Biomimetic Three---Dimensional Scaffold for Tissue Engineering Applications // Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009; 89 (4): 895–908.
189. Zhang R., Ma P. X. Poly (A-Hydroxyl Acids)/Hydroxyapatite Porous Composites for Bone-Tissue Engineering. I. Preparation and Morphology // 1999;
190. Zhang Y., Venugopal J., Huang Z.-M. et al. Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun Pcl-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts // Biomacromolecules, 2005; 6 (5): 2583–2589.
191. Zisch A. H., Lutolf M. P., Ehrbar M. et al. Cell-Demanded Release of Vegf from Synthetic, Biointeractive Cell Ingrowth Matrices for Vascularized Tissue Growth // The FASEB journal, 2003; 17 (15): 2260–2262.
192. Zund G., Breuer C., Shinoka T. et al. The in Vitro Construction of a Tissue Engineered Bioprosthetic Heart Valve // European journal of cardio-thoracic surgery, 1997; 11 (3): 493–497.

11. ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS

1. Kalejs M., Stradins P., Lacis R., et al. Search for Electrospun Nanofiber Materials Matching the Mechanical Properties of Native Aortic Valve // International Journal Of Materials, Mechanics And Manufacturing, 2013; 1 (3): 261–264.
2. Stradins P., Kalejs M., Priedite V., et al. Fibroblast Growth on Nanofiber Material Matrices and Changes to Their Mechanical Properties // International Journal Of Materials, Mechanics And Manufacturing, 2013; 1 (4): 328–331.
3. Kasyanov V., Moreno-Rodriguez R. A., Kalejs M., et al. Age-Related Analysis of Structural, Biochemical and Mechanical Properties of the Porcine Mitral Heart Valve Leaflets // Connect Tissue Res, 2013; 54 (6): 394–402.
4. Kalejs M., Lacis R., Kasyanov V., et al. Comparison of Radial Deformability of Stent Posts of Different Aortic Bioprostheses // Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2013; 16 (2): 129–133.
5. Stradins P., Kalejs M., Lacis R., et al. Polymer Nanofiber Materials Matching Mechanical Properties of Native Aortic Valve // RSU Scientific Proceedings, 2012: 24–30.
6. Stradins P., Kalejs M., Priedite V., et al. Fibroblast Growth on Nanofiber Material Matrices and Changes to Their Mechanical Properties // RSU Scientific Proceedings, 2012: 31–35.
7. Kalejs M., Stradins P., Zarova L., et al. Aortic Valve Replacement in Latvia Influenced by an Ageing Population and Transcatheter Procedures – an Update // Acta Chirurgica Latviensis, 2011; 11: 94–97.
8. Kalejs M., Stradins P., Lacis R., et al. Deformability Comparison of Stents of Traditional Bioprostheses and Stentprostheses // RSU Scientific Proceedings, 2010: 260–266.
9. Kalejs M., Ferrari E., von Segesser LK. Towards No-Scar Cardiac Surgery - Minimally Invasive Access Through Umbilicus for Aortic Valve Replacement // Eur J Cardiothorac Surg, 2009; 36 (4): 773–775.
10. Vergnat M., Henaine R., Kalejs M., et al. A New Self-Expanding Aortic Stent Valve With Annular Fixation: In Vitro Haemodynamic Assessment // Eur J Cardiothorac Surg, 2009; 35 (6): 970–975.

11. Abdel-Sayed P., Kalejs M., von Segesser L. K. A New Training Set-Up for Trans-Apical Aortic Valve Replacement // *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2009; 8 (6): 599–601.
12. Kalejs M., Stradins P., Lacis R., et al. St Jude Epic Heart Valve Bioprotheses Versus Native Human and Porcine Aortic Valves – Comparison of Mechanical Properties // *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2009; 8 (5): 553–556.
13. Kalejs M., von Segesser L. K. Rapid Prototyping of Compliant Human Aortic Roots for Assessment of Valved Stents // *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2009; 8 (2): 182–186.
14. Stradins P., Kalejs M., Koris A., et al. Changes in Valve Replacement Surgery in Latvia – Influence of an Ageing Population // *Acta Chirurgica Latviensis*, 2007; 7: 16–19.
15. Stradins P., Kalejs M., Koris A., et al. Heart Valve Surgery in Elderly Patients // *RSU Scientific Proceedings*, 2007: 160–165.

12. ZIŅOJUMI PAR DARBA REZULTĀTIEM

1. Martins Kalejs, Peteris Stradins, Romans Lacis, Iveta Ozolanta, Modra Murovska, Vladimir Kasyanov. Search for Electrospun Nanofiber Materials Matching the Mechanical Properties of Native Aortic Valve. 2013 International Conference on Nano and Materials Engineering. April 8–9, 2013, Bangkok, Thailand.
2. Peteris Stradins, Martins Kalejs, Viktorija Priedite, Romans Lacis, Iveta Ozolanta, Modra Murovska, Vladimir Kasyanov. Fibroblast Growth on Nanofiber Material Matrices And Changes to Their Mechanical Properties. 2013 International Conference on Nano and Materials Engineering. April 8–9, 2013, Bangkok, Thailand.
3. Mārtiņš Kalējs, Pēteris Stradiņš, Ainārs Rudzītis, Inga Narbute, Andis Dombrovskis, Eva Strīķe, Milāna Zabunova, Marina Bērziņa, Ginta Kamzola, Kristīne Būmeistere, Elīna Poikāne, Aleksandra Lāce, Aļona Grāve, Romans Lācis, Andrejs Ērglis. Konvencionāla un transkatetra aortas vārstuļa implantācija pēc 80 gadu vecuma – intrahospitālie rezultāti. RSU zinātniskā konference, Rīga, 21.–22. marts 2013.
4. Pēteris Stradiņš, Mārtiņš Kalējs, Ainārs Rudzītis, Inga Narbute, Andis Dombrovskis, Eva Strīķe, Milāna Zabunova, Marina Bērziņa, Ginta Kamzola, Kristīne Būmeistere, Elīna Poikāne, Aleksandra Lāce, Aļona Grāve, Romans Lācis, Andrejs Ērglis. Transkatetra aortas vārstuļa implantācija Latvijā – agrīnie rezultāti. RSU zinātniskā konference, Rīga, 21.–22. marts 2013.
5. Martins Kalejs, Peteris Stradins, Viktorija Priedite, Romans Lacis, Iveta Ozolanta, Modra Murovska, Vladimir Kasyanov. Mechanical Properties of Various Bioprostheses and the Native Human and Porcine Aortic Valves – Implications for a New Prosthetic Material Design. 22nd World Congress – World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, September 8–11, 2012, Vancouver, Canada.
6. Martins Kalejs, Peteris Stradins, Viktorija Priedite, Romans Lacis, Iveta Ozolanta, Modra Murovska, Vladimir Kasyanov. Search for a Nanofiber Material Matrix Matching the Mechanical Properties of Native Aortic Valve. 22nd World Congress – World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, September 8–11, 2012, Vancouver, Canada.

7. Peteris Stradins, Martins Kalejs, Ainars Rudzitis, Inga Narbute, Andis Dombrovskis, Eva Strike, Milana Zabunova, Marina Berzina, Kristine Bumeistere, Elina Poikane, Aleksandra Lace, Alona Grave, Romans Lacis, Andrejs Erglis. TAVI in Latvia – the Initial Two Years. 4th Joint Scandinavian Conference in Cardiothoracic Surgery, August 16–18, 2012, Vilnius, Lithuania.
8. Martins Kalejs, Peteris Stradins, Viktorija Priedite, Romans Lacis, Iveta Ozolanta, Modra Murovska, Vladimir Kasyanov. Search for an Ideal Nanofiber Material Matrix for Aortic Valve Tissue Engineering. 4th Joint Scandinavian Conference in Cardiothoracic Surgery, August 16–18, 2012, Vilnius, Lithuania.
9. Martins Kalejs, Peteris Stradins, Romans Lacis, Iveta Ozolanta, Vladimir Kasyanov. Mechanical Properties of Bioprostheses Leaflets Compared to Human Aortic Valve. 5th Biennial Meeting on Heart Valve Biology and Tissue Engineering, May 18–20, 2012, Mykonos, Greece.
10. Martins Kalejs, Peteris Stradins, Viktorija Priedite, Romans Lacis, Iveta Ozolanta, Vladimir Kasyanov. Polymer Nanofiber Materials Matching the Mechanic Properties of Native Aortic Valve. 5th Biennial Meeting on Heart Valve Biology and Tissue Engineering, May 18–20, 2012, Mykonos, Greece.
11. M. Kalējs, P. Stradiņš, L. Žarova, R. Kolītis, U. Strazdiņš, E. Striķe, R. Lācis, A. Ērglis. Aortas vārstuļa protezēšana Latvijā: novecojošās populācijas un transkatetra procedūru ietekme. RSU zinātniskā konference, Rīga, 29.–30. marts 2012.
12. P. Stradiņš, M. Kalējs, V. Priedīte, R. Lācis, I. Ozolanta, M. Murovska, V. Kasjanovs. Fibroblastu augšana uz nanošķiedru materiālu matricēm un to izraisītās izmaiņas materiāla mehāniskajās īpašībās. RSU zinātniskā konference, Rīga, 29.–30. marts 2012.
13. Peteris Stradins, Ainars Rudzitis, Martins Kalejs, Eva Strike, Inguna Krustina, Milana Zabunova, Ilze Zandarte, Marina Berzina, Aleksandra Lace, Alona Grave, Inga Narbute, Ilja Zakke, Romans Lacis, Andrejs Erglis. Transcatheter Aortic Valve Implantation – Comparative Analysis of Transfemoral and Transapical Methods. Nordic–Baltic Congress of Cardiology (NBCC), Riga, Latvia, June 16–18, 2011.
14. Martins Kalejs, Romans Lacis, Vladimir Kasyanov, Iveta Ozolanta, Philippe Abdel Sayed, Peteris Stradins, Ludwig Karl von Segesser. Comparison of Radial

- Deformability of Stent Posts of Different Aortic Bioprostheses, Nordic–Baltic Congress of Cardiology (NBCC), Riga, Latvia, June 16–18, 2011.
15. Peteris Stradins, Ainars Rudzitis, Martins Kalejs, Eva Strike, Inguna Krustina, Milana Zabunova, Ilze Zandarte, Marina Berzina, Aleksandra Lace, Alona Grave, Inga Narbutė, Ilja Zakke, Romans Lacis, Andrejs Erglis. Transcatheter Aortic Valve Implantation – Comparative Analysis of Transapical and Transfemoral Approaches. RSU zinātniskā konference, Rīga, 14.–15. aprīlis 2011.
 16. Martins Kalejs, Peteris Stradins, Romans Lacis, Vladimirs Kasjanovs, Iveta Ozolanta, Philippe Abdel Sayed, Ludwig Karl von Segesser. Comparison of the Elastic Properties of the Stents of Traditional Bioprostheses and Modern Transcatheter Valves. RSU zinātniskā konference, Rīga, 19. marts 2010.
 17. Martins Kalejs, Mathieu Vergnat, Philippe A. Sayed, Peteris Stradins, Ludwig K. von Segesser. Quantitative Analyses of Stent Elasticity for Commissural Attachments. 5th Biennial Meeting of the Society for Heart Valve Disease, Berlin, 27–30 June 2009.
 18. Kalejs M., Stradins P., Lacis R. Racionāla sirds vārstuļu protēzes izvēle sievietei reproduktīvā vecumā Latvijā. Latvijas Ārstu kongress, Rīga, 19.–21. jūnijs 2009.
 19. Kalejs M., Stradins P., Lacis R., Ozolanta I., Kasjanov V. St. Jude Epic Heart Valve Bioprostheses vs Native Human and Porcine Aortic Valves – Differences in Biomechanical Properties. 57^C ESCVS International Congress. 2008, Barcelona, Spain.
 20. Kalejs M., Stradins P., Lacis R., Ozolanta I., Kasjanov V. St. Jude EPIC Heart Valve Bioprostheses vs Native Human and Porcine Aortic Valves – Differences in Biomechanical Properties. London Heart Valve Symposium. 2008, London, United Kingdom.
 21. Kalejs M., Stradins P., Lacis R., Ozolanta I., Kasjanov V. Mechanical Properties of St. Jude Epic Heart Valve Bioprostheses – Comparison With Native Valves. 14th Nordic-Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics. 2008, Riga, Latvia.
 22. P. Stradins, A. Koris, M. Kalejs, L. Zarova, R. Lacis. Sirds vārstuļu protēžu pielietojums dažādās pacientu vecuma grupās. RSU zinātniskā konference, Rīga, 2007.
 23. P. Stradins, I. Ozolanta, R. Lacis, M. Kalejs, R. Kolitis, V. Ose, L. Feldmane, V. Kasjanov. Biomechanical and Structural Properties of the Human Pulmonary

Valve. The Heartland Series, Aortic Valve and Root Symposium 1, 2007. Lincoln, Nebraska, USA.

24. Peteris Stradins, Romans Lacis, Iveta Ozolanta, Uldis Strazdins, Martins Kalejs, Velta Ose, Ralfs Kolitis, Vladimir Kasyanov. Human Pulmonary Valve Versus Aortic Valve – Biomechanical and Ultrastructural Properties, and Considerations for Its Suitability as Autograft for Aortic Valve Replacement. The 60th Annual Scientific Meeting of The Japanese Association for Thoracic Surgery. 2007, Sendai, Japan.

13. PIELIKUMI

13.1. PROTOKOLS COS-7 ŠŪNU KULTIVĒŠANAI UZ NANOŠĶIEDRU MATERIĀLIEM

MATERIĀLI

1. Standarta aprīkojums šūnu kultivēšanai (laminārs, CO₂ inkubators, mikroskops, dezinfekcijas līdzekļi)
2. Pipetors, 5 ml, 10 ml seroloģiskās pipetes
3. Pipetes līdz 1000 µl un līdz 200 µl ar uzgaļiem
4. 25 cm³ šūnu kultūru flakoni
5. Sagatavota barotne COS-7 šūnu kultivēšanai – uzglabā pie 4 °C
6. 0,25% Tripsīna – PBS šķīdums – uzglabā pie 4 °C
7. 8 iedobju šūnu kultūru plates
8. 15 ml sterili stobriņi
9. *Watman* filtrapapīrs
10. Skalpelis
11. Marķieris
12. Stikla konteiners šķidrajiem atkritumiem.

DARBA GAITA

Darba gaita sadalāma divos posmos – 1. posmā sagatavo nanošķiedru materiālus, 2. posmā – veic šūnu kultūru uzsēšanu un kultivēšanu.

1. posms.

1. Uz tīra darba galda novieto kartona loksni, kas pasargā virsmu no bojājumiem ar skalpeli. Uz kartona izklāj piemērota lieluma filtrapapīru, uz kura uzmanīgi izklāj nanošķiedru plēves sagatavi.

2. Ar skalpeli sagriež nanošķiedru plēvi 1 * 1cm gabaliņos. Sagrieztos gabaliņus ievieto katru savā kultūru plates iedobē vai citā piemērotā traukā (var mazā petri traukā).
3. Kultūru plati ar nanošķiedru matricēm marķē atbilstoši katrai iedobē esošajam materiālam (PUR, PCL, želatīns), nodod sterilizācijai ar gāzi un vēlāk saņem sterili iesaiņotu un gatavu darbam.

2.posms.

1. Reāģentus sasilda līdz istabas temperatūrai, tad ievieto termostatā uz 37 °C uz 10 minūtēm.
2. Ņem nepieciešamo daudzumu 3–4 dienas kultivētas COS-7 kultūras flakonū. Saskaņā ar COS-7 kultūras pārsēšanas protokolu veic priekšdarbus līdz solim, kad pārsējamās kultūras atlikumu izmet.
3. Šajā gadījumā atlikumu neizmet, bet pārvieto 15ml sterilos stobriņos un izmanto pārsēšanai uz nanošķiedru matricas.
4. Atver sterilo iesaiņojumu ar kultūru plati un nanošķiedru matricām.
5. Stobriņā ar COS-7 kultūras atlikumu pievieno vēl 5 tilpumus ar jau sagatavotu DMEM vidi (uz 1ml kultūras atlikuma pievieno 5 ml vides) un ar pipeti resuspendē šūnas.
6. Kultūru platē uz nanošķiedru matricas uzmanīgi un lēnām, sadalot pilienus pa visu matricu, sapilina 200 µl šūnu suspensijas. Pirms katras jaunas iedobes šūnas stobriņā uzmanīgi resuspendē.
7. Katrā iesētajā iedobē papildina barotni līdz 1 ml, uzmanīgi un lēnām lejot gar iedobes sienīņu. Platei uzliek vāciņu un liek inkubatorā uz eksperimentā paredzēto laiku.
8. Kultivējot platē maina vidi ik 4–5 dienas, uzmanīgi nosūcot veco vidi gar iedobes maliņu un svaigo pielejot pa 1 ml uz iedobi arī lēnām lejot gar iedobes sienīņu.
9. Pēc darba sakopj lamināro boksu (aizvāc izlietotās pipetes un šķidro atkritumu konteineru) un ieslēdz UV dezinfekcijai.

13.2. Protokols šūnu vitalitātes novērtēšanai fluorescences mikroskopā pēc kultivēšanas uz nanošķiedru materiāliem

MATERIĀLI

1. Standarta aprīkojums šūnu kultivēšanai (laminārs, dezinfekcijas līdzekļi)
2. Pipetors, 10 ml seroloģiskās pipetes
3. Pipete uz 1000 µl un uzgaļi
4. 15 ml stobriņš
5. Priekšmetstikliņi, segstikliņi
6. Fluorescentās krāsas koncentrāts (etīdija bromīds/akridīna oranžais)
7. PBS šķīdums
8. Pincete, šķēres, petri trauks
9. Papīra salvetes
10. Marķieris
11. Stikla kontainers šķidrajiem atkritumiem.
12. Fluorescences mikroskops ar filtru FITC

diapazonam. DARBA GAITA

1. Petri traukā ielej 20–30 ml PBS.
2. Atšķaida fluorescentās krāsas koncentrātu attiecībā 1:100 ar PBS stobriņā.
3. Pa vienai no plates iedobēm ņem materiālus un pa vienam apstrādā.
4. Pēc iespējas ievēro “augšas–apakšas” orientāciju. Ja orientāciju saglabāt neizdodas, matricas paraudziņu pārgriež uz pusēm un uz priekšmetstikliņa izvieto katru ar savu pusi uz augšu.
5. Ar pinceti izņem paraudziņu no plates iedobes un ievieto traukā ar PBS.

6. Priekšmetstikliņu marķē un ar nemarkēto galu ievieto traukā ar PBS, uzmanīgi uzvirza paraudziņu uz stikliņa. Paraudziņa izlīdzināšanu panāk ar pinceti vai piepalīdzot ar PBS šķīduma plūsmu, ko veido ar 1000 μ l pipeti.
7. Kad paraudziņš izlīdzināts, priekšmetstikliņa malu nosusina uz papīra salvetes, noņem lieko šķidrumu.
8. Uz paraudziņa uzpilda 200 μ l krāsas, pagaida 20-30 sekundes, malu nosusina ar papīra salveti. Uzliek segstikliņu un nosusina lieko šķidrumu vēlreiz. Paraugšs gatavs apskatīšanai mikroskopā.
9. Mikroskopu ieslēdz saskaņā ar tā lietošanas instrukciju. Uzliek fluorescences filtru FITC diapazonam un objektīvu 40 reizu palielinājumam.
10. Caurejošā gaismā atrod paraudziņa novietojumu un pārslēdz uz fluorescenci. Aplūko paraudziņu un gatavo digitālos attēlus.

13.3. ĒTIKAS KOMITEJAS ATĻAUJA



Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas
Attīstības biedrības
KLĪNISKĀS IZPĒTES ĒTIKAS KOMITEJA

Darbojas saskaņā ar SHK LKP noteikumiem

ATZINUMS Nr. 080110-4L

1. Doktoranta Mārtiņa Kalēja doktorantūras darbs „Sirds vārstuļu bioprotēžu komponentu mehānisko īpašību un strukturālie pētījumi.”
2. Protokola Nr.: nav
3. Pētnieka vārds, uzvārds, centra nosaukums un adrese:

Mārtiņš Kalējs – Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Pilsoņu iela 13, Rīga, LV-1002, Latvija, darba vadītājs doc. P.Stradiņš

4. Apstiprinātie dokumenti:
Doktoranta plānotā zinātniskā darbā (pētījuma) anotācija
Doktoranta M.Kalēja *Curriculum Vitae*

5. Ētikas komitejas atzinums: *pozitīvs*

6. Ētikas komitejas locekļi, kuri piedalījās balsošanā:

Ilze Aizsilniece – ģimenes ārste	Santa Purviņa – farmakologs
Dainis Krieviņš – asinsvadu ķirurgs	Juris Pokrotnieks - gastroenterologs
Valdis Pīrāgs – endokrinologs	Inga Štrāle – filologs
Andrejs Erglis - kardiologs	Pēteris Ersts - jurists
	Daina Biseniece – ķīmiķe

7. Ētikas komitejas sēdes datums: 2010. gada 10. janvārī.

Ētikas komitejas priekšsēdētājs:

Doc. Pēteris Stradiņš



Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Attīstības biedrība
Pilsoņu 13, Rīga, LV- 1002, Tel. +371 7611353; Fax. +371 67069946, E – pasts: etikas-komiteja@stradini.lv

14. PATEICĪBAS

Paldies mana promocijas darba zinātniskajam vadītājam *Dr. med.*, asociētajam profesoram Pēterim Stradiņam par atbalstu visā darba tapšanas gaitā.

Paldies mana darba zinātniskajiem konsultantiem profesoriem – *Dr. habil. med.* Romanam Lācim, *Dr. habil. med.* Ivetai Ozolantai un *Dr. habil. sc. ing.* Vladimiram Kašjanovam par atbalstu un neatsveramām konsultācijām un ieteikumiem darba tapšanas gaitā.

Īpašs paldies arī *Dr. med.* profesoram Ludwig Karl von Segesser no *Centre hospitalier universitaire vaudois – CHUV*, Lozannā, Šveicē bez kura atbalsta nebūtu iespējams veikt darba sadaļu par bioprotēžu fiksējošo karkasu deformējamības pētījumiem.

Paldies Rīgas Stradiņa universitātes, Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūta darbiniekiem par neatsveramu palīdzību darbā ar COS-7 šūnu kultūru, jo īpaši institūta vadītājai *Dr. med.*, asociētajai profesorei Modrai Murovscai un *M. Sc. biol.* Viktorijai Priedītei.

Promocijas darbs izstrādāts ar ESF līdzfinansēta projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”, vienošanās Nr. 2011/0056/1PD/1.1.2.1.2/11/IPIA/VIAA/006, atbalstu.

Pētījumi veikti ar sekojošu projektu finansiālu atbalstu:

- Valsts pētījumu programma „Jaunu profilakses, ārstniecības, diagnostikas līdzekļu un metožu, biomedicīnas tehnoloģiju izstrāde sabiedrības veselības uzlabošanai” projekts Nr. 1, apakšprojekts 1.4.
- „Jaunas starpnozaru zinātniskās grupas izveide uz nanotehnoloģijām bāzētu pieeju izstrādei šūnu bioloģijā ar pielietojumu medicīnā”;
Vienošanās Nr.2009/02221/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/074