

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Saulius Raugelė

*BIOLOGINIŲ VOŽTUVŲ TRANSPLANTATŲ APRUOŠIMO METODŲ
EFEKTYVUMO PALYGINIMAS EKSPERIMENTE
(eksperimentinis darbas)*

*Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, medicina – 06 B*

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2008–2012 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas

prof. habil. dr. Vytautas Jonas Sirvydis

(Vilniaus universitetas , biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Turinys

Sutrumpinimai	4
1. Įvadas	5
2. Darbo tikslas, uždaviniai, naujumas, praktinė reikšmė	7
3. Literatūros apžvalga	9
<i>Šiuolaikiniai vožtuvų pakaitalai ir idealaus širdies vožtuvo protezo sąvoka</i>	9
<i>Vožtuvų kalcifikacija, priežastys, mechanizmai ir reguliacija, prevencijos metodai</i>	12
<i>Audinių inžinerija ir širdies vožtuvai</i>	20
<i>Audinių deceliulizacija</i>	26
<i>Biologinių audinių apdorojimo metodų apibendrinimas</i>	32
4. Tyrimų metodikos	36
5. Rezultatai	50
6. Rezultatų aptarimas	75
7. Išvados	85
8. Literatūra	86

Sutrumpinimai

Ala – L-alaninas

Ao – aorta

AoS – aortos sienelė

AoV – aortos vožtuvas

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio] -1 –propanosulfonatas

CMC – kritinė micelių koncentracija (critical micelle concentration – angl.)

DEO – natrio deoksicholinė rūgštis

DKA – dirbtinė kraujo apytaka

DNR – dezoksiribonukleino rūgštis

ECM – ekstraląstelinis matiksas

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidis

EDTA – etilendiamintetracto rūgštis

GAG – glikozaminoglikanai

Glu – glutaraldehidas

HE – hematoksilinas ir eozinas

NHS – N-hidroksisukciimidis

Norv – L-norvalinas

PA – plaučių arterija

PAS – plaučių arterijos sienelė

PAV – plaučių arterijos vožtuvas

RNR – ribonukleino rūgštis

SDS – natrio dodecilsulfatas

1. ĮVADAS

Kasmet daugeliui žmonių prireikia širdies operacijos dėl įgytos ar įgimtos vožtuvų ydos. Per metus daugiau nei 300 000 pacientų atliekamos širdies vožtuvų operacijos. Esant tokiam poreikiui, vystosi dirbtinių vožtuvų pramonė, kuriami nauji modeliai, gamybai ir apdorojimui naudojamos naujos medžiagos.

Šiuo metu naudojami du pagrindiniai protezų tipai: mechaniniai ir biologiniai. Mechaniniai protezai ilgalaikiai, tačiau reikalaujantys antikoagulantų terapijos visą likusį gyvenimą ir išlieka tromboembolinių ar kraujavimo komplikacijų rizika. Biologiniai protezai šiuo požiūriu modernesni, nereikia kraujo krešumą mažinančių vaistų, paties vožtuvo funkcija artima natūraliam žmogaus širdies vožtuvui. Tačiau pacientų aktyvi imuninė sistema greitai paveikia bioprotezą (kalkėja, suyra), ir tai labai apriboja jo funkciją. Tai ypač greitai nutinka jauno amžiaus pacientams. Apdorojant cheminėmis medžiagomis pailginti protezų funkcionavimo trukmės nepasisėkė, galiojimo laikotarpis siekia 15–20 metų. Todėl mokslininkai, kurdami širdies vožtuvus, pradėjo taikyti audinių inžineriją.

Audinių inžinerija širdies vožtuvų chirurgijoje apibrėžiama kaip veiksmų ir manipuliacijų visuma, kai naudojant ląstelių kultūras sukuriama naujos struktūros, galinčios tinkamai atlikti numatytas funkcijas bei prisitaikyti prie metabolinių pokyčių. Tokie sukurti vožtuvai būtų idealus pasirinkimas pacientams. Protezas taptų imunologiškai nereaktyvus, tai būtų gyva, visą likusį paciento gyvenimą atsinaujinanti struktūra.

Taikant įvairius audinių inžinerijos būdus, sukurta daugybė įmanomų karkasų vožtuvams gaminti ir pačių biologinių vožtuvų. Tačiau tik deceliulizacijos sritis pritaikyta praktikoje, atliktos operacijos implantuojant aceliulinius ir naujai ląstelėmis apaugintus protezus. Skirtingų mokslininkų pateikiami rezultatai labai įvairūs, eksperimentuose gauti geri artimi rezultatai ne visada pasitvirtina praktikoje. Nėra vieningos nuomonės, ar šis metodas saugus.

Lietuvoje kasmet apie 500 pacientų atliekamos vožtuvų operacijos, daugiausia dėl aortos vožtuvo ligų. Kaip ir kitose šalyse, nemažą dalį sudaro pacientai iki 60-65 metų. O tai reiškia, kad šiai amžiaus grupei, vadovaujantis šių dienų širdies chirurgijos gairėmis, nerekomenduojama implantuoti biologinių protezų. Pasitelkdami pastarųjų metų mokslo laimėjimus, norime ištirti naujausių technologijų galimybes, siekdami patobulinti jas, surasti geresnes medžiagas audinių apdorojimui bei išbandyti eksperimentiniuose modeliuose.

2. DARBO TIKSLAS, UŽDAVINIAI, NAUJUMAS, PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Darbo tikslas:

Ištirti širdies biologinių vožtuvų apdorojimo būdus, skirtus sumažinti ar panaikinti audinių kalkėjimą po implantacijos, bei patikrinti efektyvumą eksperimentiniuose modeliuose.

Uždaviniai:

- 1. Cheminių medžiagų parinkimas ir aortos vožtuvo transplantato apdorojimo jomis protokolų sukūrimas.*
- 2. Cheminio apdorojimo efektyvumo patikrinimas eksperimentiniame modelyje be sąlyčio su kraujotakos sistema (su smulkiaisiais eksperimentiniais gyvūnais).*
- 3. Cheminio apdorojimo efektyvumo patikrinimas eksperimentiniame modelyje esant tiesioginiam sąlyčiui su kraujotakos sistema (su stambiaisiais eksperimentiniais gyvūnais).*
- 4. Aortos ir plaučių arterijos vožtuvinių transplantatų apdorojimo detergentais ir kitomis medžiagomis protokolų sukūrimas ir taikymas in vitro, pašalinant ląstelines struktūras (deceliulizacija).*
- 5. Nuląstelintų (deceliulizuotų) vožtuvinių transplantatų patikrinimas eksperimentiniame modelyje in vivo.*
- 6. Skirtingų apdorojimo metodų rezultatų palyginimas.*

Naujumas ir originalumas:

Biologinių protezų trumpaamžiškumas – pagrindinė kliūtis jų platesniam naudojimui, o jų apdorojimas įvairiomis medžiagomis siekiant pailginti funkcionavimo trukmę – tema, gvildenama nuo pat biologinių vožtuvų atsiradimo. Tobulinami įvairūs cheminio apdorojimo būdai, keičiant cheminių medžiagų koncentraciją, pritaikant detoksikacijos metodus po apdorojimo;

lygiagrečiai atsirado nauja mokslo kryptis – audinių inžinerija. Šios krypties taikinyje ląstelinės audinių struktūros, kurios tampa ankstyvo vožtuvų suirimo priežastimi.

Šiame moksliniame darbe plėtojama audinių apdorojimo cheminėmis medžiagomis tyrimo kryptis, taikant visiškai naujas medžiagas: alaniną, norvaliną. Buvo patobulintas karbodiimido naudojimo apdorojimui protokolas. Tyrimo metu in vitro ir in vivo eksperimentiniuose modeliuose gauti geri artimi rezultatai.

Eksperimentiniame darbe pavyko patobulinti ir audinių inžinerijos būdu apruošiamus vožtuvus. Tyrimo metu atradome, kad net 2 iš mūsų naujai pasiūlytų apdorojimo protokolų efektyviai sumažina kalkėjimą. Įvertinę visus duomenis, galime teigti, kad vienas iš pastarųjų dviejų gerai apsaugo biologinių protezų audinius artimu laikotarpiu.

Praktinė reikšmė:

Mokslinio eksperimentinio darbo metu įrodytas karbodiimido ir kitų cheminių medžiagų kombinacijos efektyvumas. Taip pat geri artimi rezultatai gauti atlikus deceliulizaciją originaliais metodais. Tai galimos alternatyvos šiuo metu taikomiems vožtuvų apdorojimo būdams.

Jau šiuo metu sukurti metodai patentuoti, nes yra originalūs. Esant teigiamiems ikiklinikiniams tyrimams, tikėtina naujoves įdiegti, kuriant vožtuvus įprastinėms vožtuvų protezavimo operacijoms ar perkateterinėms technologijoms.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

Šiuolaikiniai vožtuvų pakaitalai ir idealaus širdies vožtuvo protezo sąvoka

Širdies ir kraujagyslių ligos – viena dažniausių mirties priežasčių pasaulyje. Į šią ligų grupę įeina ir įgytos širdies vožtuvų ydos. Pasaulinės sveikatos organizacijos (WHO) duomenimis 2005 metais pasaulyje dėl šios priežasties mirė daugiau nei 17 milijonų pacientų [1]. Dėl širdies vožtuvų ydų sukeltų komplikacijų mirė papildomai daugiau nei 26000 pacientų [2].

Pasaulyje per metus daugiau nei 300000 pacientų operuojami širdies vožtuvai, skaičiuojant nuo 2003 metų, o ateityje šis skaičius gali padidėti iki 850000 [3]. Taip pat per 10 metų po protezavimo iki 30% pacientų kyla mažesnių ar didesnių komplikacijų dėl protezų, kai kuriais atvejais net atliekamas pakartotinis protezavimas [4,5].

Šiuo metu atliekant vožtuvų protezavimo operacijas naudojami dviejų tipų protezai: mechaniniai ir biologiniai.

Mechaniniai protezai

Pastarieji protezai pasižymi ilgaamžiškumu, patikimumu, tačiau organizme jie tampa svetimkūniu. Mechaninių širdies vožtuvų burės pagamintos iš pirolitinės anglies, o karkasas dengtas sintetiniu pluoštu, t.y. audiniai svetimi organizmui, trombogeniški, didesnis pavojus pritraukti infekciją.

Tromboembolinių komplikacijų profilaktikai reikia visą gyvenimą vartoti antikoagulantus, nuolatos tikrinantis kraujo krešumo rodiklius. Vartojant antikoagulantus, padidėja kraujavimo pavojus dėl perdozavimo arba tos pačios tromboembolinės komplikacijos dėl nepakankamo įsotinimo vaistu [6]. Minėtų vaistų vartojimas kenkia nėštumo metu vaisiui, be to pats vožtuvas santykinai susiaurina aortos žiedo angą, sudarydamas mažesnę pratakumą nei natyvinio vožtuvo.

Biologiniai protezai

Biologiniai protezai modernesni, nereikia kraujo krešumą mažinančių vaistų, geresnės reologinės ir hemodinaminės savybės, paties vožtuvo funkcija ir anatomija artima natyviniam. Savo ruožtu pastarieji gali būti karkasiniai (fiksuoti prie sintetinio karkaso) ir bekarkasiai (tik iš donoro audinių, be jokio kieto karkaso). Bioprotezai gaminami iš kiaulių širdies vožtuvų, jaučio kaklo venų vožtuvų, jaučio perikardo arba iš mirusių donorų žmonių. Kiauliniam ksenotransplantatui naudojamas aortos vožtuvas (visas arba atskiros burės), kuris dažniausiai apdorojamas mažos koncentracijos glutaraldehydu ir pagal kompanijos sukurtą technologiją papildomai įvairiomis cheminėmis medžiagomis [7–10].

Jaučio kaklo venų vožtuvai apruošiami pagal numatytą technologiją kartu su pačia kaklo vena ir dažniausiai naudojami įgimtoms širdies ydoms gydyti [11].

Jaučio perikardo vožtuvai ruošiami iš trijų atskirų perikardo lopelių, kurie apdorojami glutaraldehydu ir fiksuojami ant karkaso. Kaip ir kiauliniai vožtuvai, papildomai apdorojami įvairiais chemikalais, siekiant susilpninti antigeniškumą, sumažinti kalkėjimą ir pailginti funkcionavimo trukmę [7].

Donoriniai žmogaus vožtuvai gaunami žmogui mirus ir jam pačiam iki mirties arba artimiesiems davus sutikimą. Išpreparuojami ir paruošiami aortos ir plaučių arterijos vožtuviniai transplantatai, kurie toliau arba užšaldomi, arba talpinami į specialią mitybinę terpę [12, 13].

Pirmasis bandymas panaudoti biologinius vožtuvus kardiouchirurgijoje aprašomas Gordonu Murray 1956 m., kai į nusileidžiančią aortą buvo įsiūtas lavono aortos vožtuvas. Svarbu pastebėti, kad pastaroji operacija atlikta praėjus vos 5 metams po mechaninių vožtuvų atsiradimo. 1962 m. seras Donaldas Rossas ir seras Brianas Barret-Boyes, nepriklausomai vienas nuo kito, panaudojo alotransplantantus. Tai laikoma biologinių vožtuvų naudojimo pradžia. Vėliau progresuojant industrijai ir atsiradus biologiniams vožtuvams iš gyvulių, alotransplantatai tapo mažiau naudojami. Tam įtakos turėjo didesnė kaina, ribotas donorų kiekis, transportavimo ir kitos problemos.

Pastaryjū protezų veikimo trukmę riboja jų kalkėjimas ar degradavimas, suirimas. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad pacientų, ypač jauno amžiaus, aktyvi imuninė sistema greitai paveikia bioprotezą, ir tai labai apriboja jo funkciją. Todėl mokslininkai pradėjo ieškoti alternatyvių būdų sukurti efektyvų, ilgai veikiančią biologinį protezą. Pradžioje bandyta tobulinti apdorojimą cheminėmis medžiagomis. Sukurta daug įvairių apdoravimo chemikalais protokolų, sukurtos trys biologinių protezų kartos, kurios skiriasi apdoravimo būdais, ir kiekviena vožtuvus gaminanti kompanija rinkoje siūlo savo originalų būdą. Tačiau apskritai pailginti protezų funkcionavimo trukmės nepasisekė. Funkcionavimo trukmė apie 15–20 metų, per kuriuos vožtuvus dažniausiai suyra ar kalkėja [14].

Visi minėti vožtuvų tipai dažniausiai naudojami aortos vožtuvo protezavimui, tačiau apvertus kita puse, tinkami ir dviburio, ir triburio vožtuvo protezavimui; pastarieji keičiami daug rečiau, nes pirmiausia operacijos metu bandoma atlikti plastiką, išsaugant bures. Tai daroma dėl geresnių tolimų rezultatų.

Koks turėtų būti idealus širdies vožtuvo protezas

Dar prieš pradėdant plisti įprastiniam vožtuvų protezavimui, vienas iš širdies chirurgijos pionierių Dwightas E. Harkenas 1950-aisiais metais suformulavo ir paskelbė „Ten Commandments“ – pagrindinius teiginius, koks turėtų būti idealus širdies vožtuvo pakaitalas [15]. Išvardintos tokios savybės: netrombogeniškas, atsparus infekcijai, galintis augti ir regeneruoti, neantigeniškas, ilgaamžis, patogus implantuoti, netoksiškas aplinkiniams audiniams, reologinės ir hemodinaminės savybės artimos natyviniam vožtuvui, tyliai veikiantis. Iki šių dienų visi šie teiginiai išlieka aktualūs, tik papildomi atsižvelgiant į naujų technologijų ir ekonomikos progresą. Vožtuvas turi būti radiologiškai aptinkamas, anomiškai panašus į natyvinį vožtuvą, pigus, galimas implantuoti perkateteriniu būdu [16].

Iš esmės dauguma teiginių būdingi biologiniam protezui, tačiau iki šiol nėra tokio vienintelio idealaus, atitinkančio visus reikalavimus. Besivystančios

šiuolaikinės technologijos ir mokslas vis labiau priartina gaminamus bioprotezus prie idealo.

Todėl remdamiesi praktika kitų sričių, kuriose buvo įdiegta audinių inžinerija, mokslininkai ėmėsi naudoti audinių inžineriją kurdami širdies vožtuvus [17–19].

Vožtuvų kalkėjimas, priežastys, mechanizmai ir reguliacija, prevencijos metodai

Priežastys

Tiriant biologinių vožtuvų kalkėjimą, atlikti in vivo eksperimentai su mažaisiais eksperimentiniais gyvūnais, kurių medžiagų apykaita ir augimas greiti (pelės, žiurkės, triušiai) [20–22], implantuojant apdorotų audinių gabaliukus į paodį, ir su dideliais eksperimentiniais gyvūnais (avys, kiaulės) [23, 24], kur implantuoti apruošti vožtuviniai transplantatai. Abiejuose eksperimentiniuose modeliuose implantuoti audiniai kalkėja panašiai kaip ir žmonių organizmuose, tik eksperimentuose tai vyksta daug greičiau. Mažųjų gyvuliukų modelis pigesnis ir rezultatai gaunami greičiau, kalkėjimas greitesnis bei ryškesnis, tuo tarpu didelių gyvūnų atveju tyrimas platesnis, ilgiau trunkantis, įvertinamos hemodinaminės pasekmės.

Manoma, kad bioprotezų kalkėjimą lemiantys faktoriai yra šie: recipiento amžius, medžiagų apykaita ir imuninė sistema, transplantato struktūra ir apruošimo būdas, transplantatą veikiantys mechaniniai faktoriai. Mikroeklementai, nuo kurių prasideda kalkėjimas – tai fosforas ląstelių membranose ir amino rūgštys. Vietose, kur yra pastarosios medžiagos, prasideda kalkėjimas, tačiau neatmestinas ir savaiminis pirminis kolageno skaidulų kalkėjimas dėl deformacijos, cheminių medžiagų poveikio. Biologinio vožtuvo kalkėjimo pasekmė – pastarojo stenozė ar plyšimas.

Gerai žinoma, jog jaunų pacientų imuninė sistema labai aktyvi, jų medžiagų apykaita greita, todėl ir bioprotezų kalkėjimas bei suirimas žymiai greitesni. Apytikriai per 10 metų bioprotezo disfunkcija išryškėja daugiau nei

10 % recipientų, kurių amžius per 60 metų [25]. Jei pacientas dar jaunesnis arba vaikas, šis santykis labai pasikeičia, kartais bioprotezai suyra ar sutrinka funkcija per kelis metus ar mėnesius [26]. Jei audinio paviršiuje likę antigeninių struktūrų, imuninė sistema nedelsiant reaguoja, sukeldama uždegimą, struktūros vientisumo pažeidimą ir vėliau atsirandantį suirimą ar kalkėjimą.

Kalkėjimą įtakoiantys faktoriai ir reguliacijos mechanizmai

Manyta, kad audinių kalkėjimas yra savarankiškas, nevaldomas ir nekontroliuojamas procesas, tačiau atlikti bandymai rodo, kad kaip ir kai kurie fiziologiniai procesai kaulų susidaryme, taip ir degeneraciniai pakitimai audiniuose vyksta pagal tam tikrus mechanizmus [27–29].

Audinių, kraujagyslių ir vožtuvų kalkėjimą sukeliantys faktoriai ir reguliaciniai mechanizmai susiję ir panašūs, tačiau yra ir ypatumų. Vožtuvų burių pakitimus sąlygoja endotelinių ir intersticinių ląstelių funkcija, ECM pokyčiai, mechaninis stresas, uždegiminiai faktoriai, angiogenezės ir augimo mediatoriai. Veikiamos šių faktorių, vožtuvų ląstelės tampa osteoblastų tipo ląstelėmis, kurios linkusios kaupti kalcį ir kalkėti.

Genetinis faktorius. Pastebėta, kad pacientams, turintiems įgimtą dviburį aortos vožtuvą (pasireiškimo dažnis 1–2% populiacijos), dažniau pasireiškia kalkėjimas, be to, šeimos nariams, turintiems normalų vožtuvą, jis kalkėja taip pat gana anksti. Tai susiję su NOTCH-1 mutacija. Šis genas reguliuoja osteogenezę, slopindamas RUNX2 aktyvumą, fermentą, svarbų osteoblastų funkcijai; nelikus slopinimo, pasireiškia kalcio kaupimas audiniuose [30].

Audinių ląstelių funkcija. Endotelio ląstelės atlieka savotiško barjero tarp kraujo ir vidinių sluoksnių funkciją. Kraujagyslių vidų išklojančios ląstelės skiriasi nuo vožtuvų endotelio, pastarosioms tenka atlaikyti kraujo tėkmę iš skilvelio dideliu spaudimu, o aortos pusėje, diastolėje, jas veikia tempimo jėgos. Įvairiais tyrimais įrodyta priklausomybė tarp ląstelių disfunkcijos ir vožtuvo ligų [31]. Azoto oksidas (NO), išskiriamas šių ląstelių, –

vienas iš svarbiausių faktorių. NO išskyrimas kontroliuoja homeostazę, stabdo lygiųjų raumenų ląstelių kontrakciją ir proliferaciją, slopina trombocitų bei uždegiminių ląstelių agregaciją [32]. Be to, *in vitro* tyrimo metu įrodyta, kad vožtuvo burių kalcinatus veikiant NO, mažinamas tolimesnis kalkėjimas [33]. Kaip minėta anksčiau, NO slopina lygiųjų raumenų ląstelių augimą, proliferaciją ir vartimą osteoblastais, veikiant į transformacinį augimo faktorių (TGF β) [34], tuo tarpu esant azoto oksido išskyrimo sutrikimui, nepakankamai slopinant TGF β 1, proliferuoja I tipo kolagenas.

Kurį laiką buvo manoma, kad intersticinės ląstelės skirtos tik audinių ECM baltymų gamybai ir struktūrai palaikyti, tačiau pastarųjų metų tyrimai parodė, kad šios ląstelės išskiria tiek uždegimą skatinančius, tiek mažinančius faktorius [35]. Lygiųjų raumenų α -aktino teigiamos ląstelės yra savotiškai sužadinti miofibroblastai, galintys diferencijuotis į osteoblastus panašias ląsteles, tuo tarpu α -aktino neigiamos ląstelės diferencijuojasi į kaulus sudarančias ląsteles [36].

Ekstraląstelinis matriksas. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad ECM standumas tiesiogiai susijęs su ląstelių kalkėjimu: kuo matriksas kietesnis, tuo labiau ląstelės linkusios suformuoti kalcinatus. Šį procesą sukelia TGF β 1, stimuliuodamas lygiųjų raumenų α -aktiną [37]. Vožtuvo audinių standumas kinta susitraukiant endotelio ląstelėms [38], o intersticinių ląstelių susitraukimą sukelia TGF β 1. Be to, nustatytas ryšys tarp TGF β 1 ir proteolitinių fermentų katepsinų. Katepsinai G, S, K ir V randami stenozuotuose vožtuvuose. G porūšis tiesiogiai susijęs su uždegimo sukėlimu sąveikoje su TGF β 1, V porūšis ypač pasireiškia endotelio ląstelių pažeidimo metu. Tad mažinant šių proteazių aktyvumą audiniuose, gali būti įmanoma sumažinti audinių pažeidimą [39].

Kaulų formavimąsi reguliuojantys fermentai. Tai didelė grupė baltymų, kurie, manoma, dalyvauja kaulinio audinio formavimesi. Trumpai peržvelgsime svarbiausius komponentus.

Į šią grupę įeina TGF β fermentų šeima, ją sudaro daugiau nei 20 fermentų, kurie veikia ne tik kaulų susiformavimą, bet ir ektopinę kalcifikaciją.

Tai specifiniai citokinai, aktyviai veikiantys daugelį ląstelių (monocitus, epitelį, neuronus ir kt.) ir daug įvairių virsmų (apoptozę, proliferaciją, diferenciaciją, adheziją, chemotaksį ir kt.), taip pat stimuliuoja osteoblastų diferenciaciją ir slopina mezenchiminių ląstelių diferenciaciją į mioblastus [40]. Be to, pastarieji fermentai dalyvauja susidarant širdies vožtuvams embriogenezėje ir jau gyvenimo eigoje aktyvuoja šarminę fosfatazę bei osteokalciną, skatinančius vožtuvų kalkėjimą [41]. Kaip jau anksčiau minėta, vienas iš svarbiausių šios grupės atstovų – TGF β 1. Fermentas, prisijungęs prie specifinių receptorių, daro įtaką daugeliui svarbių procesų (ląstelių augimui, diferenciacijai, proliferacijai, apoptozei) [42]. Manoma, kad šio fermento susikaupimą ECM lemia endotelinių ląstelių pažeidimas, po to kylantis uždegimas, vėliau stimuliuojami įvairūs procesai: intersticinių ląstelių diferenciacijavimas į osteoblastus panašias ląsteles, α -aktino išskyrimas iš lygiųjų raumenų ląstelių, miofibroblastų diferenciacija, apoptozė ir kalcinātų formavimas ECM [43,44]. Visi minėti procesai dar labiau paspartinami esant mechaniniam stresui. Padidėjęs TGF β 1 kiekis patologinio proceso metu sukelia ir endotelio ląstelių pažeidimą, susilpninama ar visai suardoma jo kaip apsauginio barjero funkcija, dėl to lengvai prasiskverbia uždegiminės ląstelės iš kraujo [45], savaimė skatina tolimesnį išsiskyrimą fermentų ir kolageno I bei III (pagrindiniai kaulų ir kremzlių susidarymo elementai), kurie randami pažeistuose vožtuvuose [46].

Kaulų formavimosi metu grupė įvairių fermentų aktyvuoja Wnt baltymus, kurie stimuliuoja kaulų formavimąsi ir kalkėjimo procesus [47]. Wnt – tai baltymų grupė, reguliuojanti ląstelių vystymąsi ir žūtį. Žinoma, kad pastarieji baltymai dalyvauja embriogenezėje, susidarant būsimų širdies vožtuvų klostėms. Taip pat žinoma, kad pastaroji sistema yra viena iš svarbiausių sistemų kaulų ir kalkėjimo susidaryme ir reguliacijoje [48]. Wnt baltymus aktyvuoja kita kaulų susidarymą stimuliuojančių fermentų grupė – BMP2. Aterosklerozės pažeistų žmogaus kraujagyslių sienelėse galima rasti padidėjusį šių baltymų kiekį. Dažniausiai šį baltymą išskiria miofibroblastai. Esant padidėjusiai koncentracijai, fibroblastai gali diferencijuotis į

osteoblastus arba sukelti kraujagyslės sienelės lygiųjų raumenų ląstelių apoptozę, kuri neišvengiamai baigiasi sienelės kalkėjimu.

Osteopontinas – baltymas, stabdantis audinių kalkėjimą. Prisijungęs prie osteoklastų, aktyvuoja šias ląsteles ir prasideda kaulinio audinio rezorbcija. Tyrimų metu nustatyta, kad rezorbuojasi ne tik natyvinis kaulinis audinys, bet ir ektoziniai kalkėjimo židiniai, pastebėta, kad osteopontino labiau padaugėja apie osteoklastus, kai žiurkėms į paodį implantuojami vožtuvų gabalėliai.

Matrikso Gla baltymai. Tai taip pat grupė kaulėjimą lemiančių fermentų: g-karboboglutaminė rūgštis, osteokalcinas ir kiti. Jie gaminami įvairiuose audiniuose, daugiausia kauliniame ir kraujagyslių sienelės audiniuose. Osteokalcinas gaminamas osteoblastuose, vykstant karboksilinimui prisijungia prie hidroksiapatitų kaule, stiprindamas mineralizaciją. Ir priešingai – stabdant jo išsiskyrimą, stabdoma ląstelių diferenciacija į kaulines, mažėja kalkėjimas, eksperimentuose tokiu būdu sukeliama netgi osteopenija [49].

Uždegimas, oksidacinis stresas ir infekcija. Aterosklerozės vystymosi metu serume padaugėja kai kurių uždegimą stimuliuojančių baltymų: C reaktyvus baltymo, interleukino 6, tumor nekrozės faktoriaus alfa. Kai kurie faktoriai gaminami kraujagyslių endotelio ląstelėse, lygiųjų raumenų ląstelėse, makrofaguose. O pastarieji, dažnai randami aterosklerotinėse plokštelėse, sukelia ląstelių diferenciaciją į kaulines ir kalkėjimą.

Yra teorija, patvirtinta eksperimentais, kad apie aterosklerozės pažeistas vietas padaugėja superoksido ar peroksido, lyginant su sveikais audiniais. Lygiagrečiai šiam reiškiniui sumažėja antioksidanto – katalazės ir NADPH oksidazės.

Ilgą laiką buvo populiari teorija, kad vožtuvų kalkėjimui turi įtakos *Chlamydia pneumoniae*. Dalis mokslininkų atmetė tokias prielaidas, tačiau dalis atliko eksperimentus, pasėdami mikrokultūras, ir gavo savaime kalkėjančių dalelių augimą, jos pavadintos nanobakterijomis. Pastarosios randamos aortos vožtuvo kalcinatuose, kaklo arterijų sienelėse. Tačiau vien

šių duomenų nepakanka, kad galima būtų teigti, jog bakterijos yra kalkėjimo sukėlėjai.

Aterosklerozė. Ji taip pat daro įtaką ne tik kraujagyslių siaurėjimui, kalkėjimui, bet ir širdies vožtuvams. Gerai žinoma mažo tankio lipoproteinų svarba plokštelių formavimuisi ir didelio tankio lipoproteinų apsauginė funkcija. Be to, hiperlipidemija stabdo ląstelių kitimą į osteoblastų tipo ląsteles, sukeldama mineralų iš kaulų rezorbciją, tai gerai žinomas reiškinys moterims postmenopauziniu laikotarpiu. Taip pat mažo tankio lipoproteinai stimuliuoja monocitų kolonizaciją sukeliančius fermentus, kurie savo ruožtu veikia ląstelių kitimą į osteoklastus ir kaulų mineralų rezorbciją [50].

Kalkėjimo prevencija

Remdamiesi literatūra, galime išskirti keletą kryptių kalcifikacijai stabdyti ar išvengti: specifinių vaistų vartojimas sistemškai ar lokaliai veikiant implantatą, implantato apdorojimas chemikalais ar galimų antigeninių struktūrų pašalinimas nuo audinio paviršiaus.

Dažniausias tyrėjų pasirinktas eksperimentinis modelis – paodinės implantacijos smulkiems gyvūnėliams; tai suteikia galimybę greitai ir gausiai atlikti eksperimentus, kitas, labiau priartintas prie realių sąlygų modelis – su stambiaisiais gyvūnais, implantuojant į hemodinaminę sistemą, tai brangus, tačiau patikimesnis metodas, parodantis ne tik struktūrinius, bet ir funkcinis pakitimus.

Specifinių vaistų vartojimas, ypač sistemškai, gal ir efektyvus, tačiau turintis daug pašalinių poveikių. Pavyzdžiui, kalcifikaciją stabdančio preparato (difosfonatų, tokių kaip etano-1-hidroksi-1, 1 bisfosfonatas), vartojimas efektyviai sustabdo bioprotezo kalcifikaciją, tačiau eksperimente pastebėta, kad taip pat mažina ir kaulų formavimąsi, kalkėjimą, lėtina augimą [51]. Vengiant sisteminio poveikio, buvo sugalvotos specialios sistemos, išskiriančios vaistus lokaliai ir implantuojamos kartu su protezu. Tokiu būdu maksimalus vaisto poveikis būtų tik protezo vietoje, išvengiant sisteminio poveikio [52]. Paprasčiausias šios sistemos pritaikymas – tai anksčiau minėtų

bifosfanatų naudojimas nesirezorbuojančiuose polimeruose: metileno vinilacetate, polidimetilsiloksane. Šis metodas, nors ir pasitvirtino eksperimentuose, nenaudojamas praktikoje, tuo tarpu cheminis ar kitoks apdorojimas tiek eksperimentuose, tiek praktikoje populiarūs. Trumpai apžvelgsime chemines medžiagas, kuriomis apruošiami audiniai, siekiant slopinti kalkėjimą.

Hidroksiapatitų susidarymo inhibitoriai

Statinai – grupė sistemiškai veikiančių vaistų, kurie praktikoje įrodė efektyvumą prieš mažo tankio lipidus, stabilizuojant aterosklerotines plokšteles, kartu mažinant metalo proteinazių ir makrofagų aktyvumą, stabilizuoja endotelinių ląstelių funkciją ir paviršių, stabdo jau prasidėjusį audinių kalkėjimą, nors ir nedaug, tačiau sumažina vožtuvų kalkėjimą.

Bifosfanatai – peroraliniai vaistai, skirti koreguoti kaulų rezorbciją gydant osteoporozę. Šie vaistai eksperimentuose parodė gerą efektą stabdant kraujagyslių kalkėjimą. Be to, sukelia makrofagų apoptozę, stabdo putliųjų ląstelių susidarymą bei jų gebėjimą „ryti“ mažo tankio lipidus. Eksperimentuose įrodytas efektas taikant kaip sisteminį vaistą ar kaip turintį lokalų poveikį bioprotezams [51,52].

Trivalenčių metalų jonai – audinius (kiaulės vožtuvą ar jaučio perikardą) apdorotus glutaraldehydu, papildomai apruošus geležies ar aliuminio druskomis ($FeCl_3$ and $AlCl_3$), gaunamas geras antikalciifikacinis efektas eksperimentuose, implantuojant audinius į paodį. Manoma, kad šių druskų metalai pakaitiniu būdu jungiasi prie fosfatų audiniuose, savotiškai neleidami susiformuoti kalcio fosfatams, be to, abu jonai inaktyvuoja šarminę fosfatazę, kuri yra esminis kaulų ar kalcinātų susidarymo fermentas. Kai kurių tyrimų metu nustatytas aliuminio chlorido teigiamas poveikis elastino skaidulų kalcinavimui [53].

Kalcio apykaitos inhibitorius

Amino oleino rūgštis – 2-a-amino-oleino rūgštis kovalentine jungtimi jungiasi

prie audinių aldehidų radikalų savo amino grupėmis ir mažina kalcio prisijungimą bei patekimą į vožtuvo bures. Efektyvumas pabrėžtinai tik vožtuvo būrėse, ši technologija įdiegta į praktiką ir naudojama bioprotezų gamyboje [53,54].

Medžiagos, pašalinančios kalkėjantį substratą

Etanolis – etanoliu papildomai apdorojant prieš tai glutaraldehidu paveiktus kiaulės vožtuvus, gaunamas geras efektas eksperimentuose tiek implantuojant į paodį, tiek avims į širdį [55]. 80% etanolis suardo, pašalina membranų fosfolipidus, neleidžia persiformuoti kolageniui, pakeičia audinių ląstelių medžiagų apykaitos savybę pasisavinti lipidus. Ši medžiaga naudojama eksperimentiniuose modeliuose kartu su metalų jonais [56].

Deceliulizacija; apdorojimas surfaktantais, detergentais – šio metodo esmė – pašalinti visas galimai antigenines ir kalcifikuojančias struktūras nuo audinio, paliekant matricą. Nelikus ląstelių struktūrų, nelieta substrato kalcinaty formavimuisi, tai sėkmingai įrodyta eksperimentuose ir pritaikyta praktikoje [57].

Medžiagos, stabilizuojančios audinius

Glutaraldehydas – apruošto chemikalais audinio pakitusi struktūra yra svarbus kalkėjimo faktorius. Stabilizuojant apdorojamų audinių struktūrą, dažniausiai naudojamas glutaraldehydas. Pastarasis stabilizuoja fosforu prisotintas kolageno ir elastino struktūras, kurios po implantacijos papuola į aplinką su dideliu ekstraląstelinio kalcio kiekiu, tokiu būdu šiose vietose susidaro kalcio fosfatai. Be to, minėti pakenkimai dažniausiai prasideda tose vietose, kur mechaninė įtampa ir judėjimas didžiausi. Pastebėta, kad apdorojant didelės koncentracijos (nuo 0,6% iki 3%) glutaraldehidu, skirtingai nei mažos koncentracijos (<0,6%), audiniai mažiau kalkėja, tačiau praranda savo elastines savybes [58-60].

Tačiau yra ir kita šios technologijos pusė, kuri kaip tik skatina protezų dėvėjimąsi. Pažeidžiamos burių jungiamojo audinio ląstelės, pastarosios nepašalinamos iš audinio, sutrikdomas intraląstelinio kalcio pašalinimas, todėl kalkėjimo procesas anksčiausiai jose ir prasideda. Ląstelių membranoje gausu

fosforo junginių, tokių kaip fosfolipidai, ypač fosfatidilserinas, be to, fosforo gausu amino rūgštyse. Normali ekstraląstelinio kalcio koncentracija yra maždaug 1 mg/ml; esant sveikoms ląstelės membranoms, pastarosios kalcio kanalais šalina kalcio jonus iš ląstelės ir tada kalcio koncentracija citoplazmoje būna nuo 1000 iki 10000 kartų mažesnė. Kalcis, esantis ekstraląsteliniame skystyje, reaguoja su ląstelių membranų fosforo likučiais, sudarydamas kalcinatus, pastarieji didėja, žeidžia audinius ir bioprotezų funkciją.

Kitos stabilizuojančios medžiagos

Siekiant išvengti nepageidaujamų glutaraldehido poveikių audiniams, eksperimentuose tyrinėtos ir kitos medžiagos, panašiai veikiančios audinius, pvz., acilazidas [53]. Epoksi junginiai eksperimentuose davė gerus rezultatus, išsaugant natūralias audinių savybes ir struktūrą [61]. Kai kurios alternatyvių medžiagų technologijos iš dalies buvo taikytos praktikoje, tačiau plataus pritaikymo nesulaukė. Štai, pavyzdžiui, fotooksidacijos proceso metu audiniai laikomi specialioje šviesai jautrioje medžiagoje – dažuose ir apšvitinami tam tikro ilgio bangos šviesa, kurią sugeria minėti dažai; jie jungdamiesi prie audinių apsaugo nuo vėlesnio kalkėjimo. Šio proceso mechanizmas nėra iki galo ištirtas [62]. Nors eksperimentuose gauti rezultatai iš pradžių atrodė priimtini, tačiau dėl neatsargiai parinkto eksperimentinio modelio vėliau išryškėjo visi trūkumai (tokie kaip burių plyšimai dėl vožtuvo protezo konstrukcijos) ir pastarasis bioprotezas negalėjo būti toliau gaminamas [63].

Audinių inžinerija ir širdies vožtuvai

Audinių inžinerijos metodai, apžvalga

Nuo pat biologinių protezų naudojimo pradžios tapo aiškus jų trūkumas – trumpaamžiškumas. Atrasta daugybė apdorojimo cheminėmis medžiagomis technologijų, tačiau nė viena nepailgino bioprotezo funkcionavimo ilgiau nei 20 metų. Pavienės kompanijos skelbia gerus rezultatus iki 25 metų, tačiau atitinkamai vyresnis ir pacientų amžius. Taigi išlieka aktuali problema

parenkant vožtuvą jauniems pacientams.

Atsižvelgdami į Harkeno suformuluotus teiginius, mokslininkai pritaikė audinių inžinerijos metodus kaip alternatyvą esamiems cheminiams apdoravimo būdams. Šiuo būdu kuriamas vožtuvas naudojant natūralius audinius ir ląsteles. Tam būtinas karkasas, biologinis – gaunamas deceliulizacijos būdu iš žmogaus ar kiaulės vožtuvo, ar sintetinis – kuris po implantacijos atkartoja erdvinę vožtuvo struktūrą ir įvairios ląstelės užpildo atitinkamas karkaso vietas, o pats karkasas pamažu rezorbuojasi. Tokiu būdu gaunamas bioprotezas anatomiškai identiškas natyviniam vožtuvui, o papildomai naudojant recipiento ląsteles – ir neimunogeniškas bei galintis augti.

Audinių inžinerija kaip disciplina ir kaip terminas atsirado pakankamai seniai. 1987 metų spalį Washington National Science Foundation renginyje Fungas pirmasis panaudojo šį terminą.

Audinių inžinerija širdies vožtuvų chirurgijoje apibrėžiama kaip veiksmų ir manipuliacijų visuma, kai naudojant ląstelių kultūras sukuriama naujos struktūros, galinčios visiškai atlikti numatytas funkcijas bei prisitaikyti prie metabolinių pokyčių. Tokie sukurti vožtuvai būtų idealus pasirinkimas pacientams. Protezas taptų imunologiškai neantigeniškas gyvas audinys ir atsinaujinanti struktūra visą likusį paciento gyvenimą.

Pirmieji širdies vožtuvų audinių inžinerijos pavyzdžiai buvo eksperimentai su sėjamosiomis ląstelėmis ant nejudrių karkasų. Šis metodas tinkamas ir palyginti sėkmingas kraujagysliniuose transplantatuose [64], tačiau visiškai netiko širdies vožtuvams. Sintetinės medžiagos (karkasai) netiko ne dėl tromboembolijos rizikos, bet dėl medžiagos pavarginimo, dažniausiai susijusio su mikroįtrūkimais, plazmos baltymų netekimo ir tolesnio kalkėjimo. Dėl šių esminių problemų pagrindiniu karkasu ilgą laiką buvo glutaraldehyde fiksuotas biologinės kilmės matriksas. Dėl liekamojo gliutaraldehido toksiškumo apdoroti vožtuvo audiniai ilgai neapauga ląstelėmis. Dėl ne visiškai aiškių priežasčių jie nesukelia tromboembolijos ir lieka iš esmės neveiklūs, sąlyginai „mirę“.

Galbūt pirmasis širdies vožtuvų audinių inžinerijos pavyzdys pristatytas Vienos universitete 1991 m., kai Grimmas su bendradarbiais ant glutaraldehidu apdoroto jaučio perikardo užaugino endotelines ląsteles [65]. Išlaikyti ir auginti ląsteles ant toksiško paviršiaus tapo įmanoma inaktyvavus aldehidą su L-gliutamino rūgštimi. Dėl nežinomų priežasčių ši technologija niekada nebuvo pritaikyta, o paskutinis straipsnis šia tema buvo išspausdintas 1993 m.

Metodai, kuriuos taikė mokslininkai visame pasaulyje, gali būti skirstomi į šias sritis: ksenogeninių audinių deceliulizacija, implantuojant tik karkasą, arba apauginimas ląstelėmis ir implantavimas; sintetinių, biologiškai suderinamų besirezorbuojančių karkasų naudojimas. Trečiasis ir mažiausiai populiarus būdas – karkaso ir struktūros gaminimas, naudojant polimerizaciją ir ląstelių įterpimą.

Karkasai

Biologiškai besirezorbuojantis karkasas

Biologiškai besirezorbuojantys karkasai gali būti naudojami atkurti įvairiems audiniams ir organams: odai, kaulams, kraujagyslėms, sausgyslėms, šlapimo pūslėi, makščiai, raumenims, kepenims, kasai. Idėja paremta paprastu principu: tam tikros ląstelės pasėjamos specialioje akytoje medžiagoje – karkase, tuomet implantuojama į kūną tikintis, kad susiformuos reikiamas organas su atitinkama savo struktūra. Karkasai gaminami iš specialių polimerinių medžiagų, turinčių savybę rezorbuotis laikui einant. Be to, priklausomai nuo medžiagos, galima nustatyti reikalingą rezorbcijos laiką, atsižvelgiant kokiam audiniui sukurti bus naudojamas. Taip pat privalumas yra tai, kad į polimerą galima įterpti augimą skatinančių medžiagų [66]. Poliglikolinė r. (PGA), polilaktinės r. (PLA), PLGA (polimeras iš PGA su PLA), polihidroksialkanoatas (PHA), PGA su polihidroksibutiratu – polimerinės besirezorbuojančios medžiagos sėkmingai išbandytos eksperimentuose.

Galbūt seniausias ir pats sėkmingiausias šio metodo pritaikymas yra odos transplantatas, sukurtas 1970-ųjų pabaigoje. Naudojant šį metodą, buvo

pradėta transplantatų pramoninė gamyba, ir manoma, kad tai vienas iš nedaugelio, bet sėkmingiausias produktas.

Pradiniai karkasai, skirti širdies vožtuvams, buvo paimti iš odos: polilaktinės ir poliglikolio rūgšties ir jų kopolimerų. Vėliau šių medžiagų iš dalies buvo atsisakyta naudoti širdies vožtuvams, kadangi jos buvo per standžios, be to, pradėtos naudoti naujesnės kartos, tokios kaip polihidroksialkonatas.

Natūralūs besirezorbuojantys karkasai, pavyzdžiui, plonųjų žarnų pogleivinis sluoksnis, taip pat buvo naudojami vožtuvų inžinerijoje. Daugeliu atvejų audinių inžinerijos būdu sukurti vožtuvų protezai buvo implantuoti į plaučių arteriją, o ne į aortą, kadangi besirezorbuojantis karkasas negalėtų atlaikyti aortos spaudimo iki susiformuos nauji audiniai.

Praktikoje įdiegti tik pavieniai atvejai, kai karkaso vietoje naudojama plonųjų žarnų stroma. Tokia implantacija atlikta pacientams, sergantiems prieširdžių sienelės vėžiniais susirgimais.

Kolageninės struktūros karkasai

Šio metodo principas pagrįstas pastebėjimais, kad ląstelės, įterptos į kolageno gelį, suglaudina pastarąjį, šalindamos vandenį ir padidindamos tankį [67].

Tai atliekama sumaišant ištirpintą skaidulinį kolageną su atitinkamomis ląstelėmis. Po to, kai kolageno ir ląstelių mišinys yra neutralizuojamas, tirpus kolagenas vėl suformuoja skaidulas ir susidaro gelis. Ląstelės pradeda sąveikauti su kolageno skaidulomis, pašalindamos vandenį, sutraukia matiksą. Kai gelis baigiamas sutraukti, kolageno skaidulos lygiuojasi suspaudimo kryptimi, taip gaunamas kompaktiškas, lygus kolageninis karkasas.

Vienas iš ankstyvųjų šios technologijos pritaikymų buvo kraujagyslių suformavimas. Tai atliekama naudojant tiesų tuščiaavidurį vamzdelį su strypu centre, tuščias tarpas – spindis pripildomas kolageno ir ląstelių mišinio. Kai mišinys tampa geliu, skaidulos pradeda trauktis cirkuliariai iš abiejų pusių,

atšokdamos nuo centrinio strypo ir vidinio vamzdelio paviršiaus. Besiformuojančio tuščiavidurio vamzdelio kolageninės skaidulos traukiasi, juosia ir lygiuojasi apskritimu kaip kraujagyslės adventicija.

Šie karkasai nėra tinkami kurti vožtuvus žmogui, juos labiau tinka naudoti eksperimentuose su gyvūnais. Tačiau pats technologijos principas naudojamas su kitomis sintetinėmis medžiagomis gauti triburį, panašų į aortos vožtuvą.

Aceliuliniai karkasai

Pirmuosius darbus naudodami ir patentuodami šį metodą paskelbė dar 1984 m. Brendelis ir Duhamelis (Arizonos universitetas) [68] bei Klementas ir kiti [69] iš Toronto 1987 m. Šiuo būdu gauti karkasai gali būti taikomi įvairiose srityse tiek vožtuvams, tiek kraujagyslėms, kaulams, dantims, raiščiams ir odai suformuoti. Nuo to laiko širdies vožtuvų deceliulizacija išbandyta daugelyje šalių. JAV ir Kanadoje eksperimentavo Vesely'is ir Noseworthy'is [70] bei Wilsonas su kolegomis [71], Hilbertas [72]. Europoje šį metodą populiarino Dohmenas iš Berlyno [73,74], Steinhoffas su kolegomis Rostoke (Vokietija) [75], Stock'as su kolegomis Jenoje (Vokietija) [76], Haverichas su kolegomis Hanoveryje (Vokietija) [77], Weigelis ir kiti Vienoje (Austrija) [78], Gittenberger-de Groot su kolegomis Leidene (Nyderlandai) [79], Fisheris su kolegomis Lidse (Jungtinė Karalystė) [80], Spina, Gerosa su kolegomis Paduvoje (Italija) [81]. Azijoje šį metodą tyrė Hong [82] ir Ye su kolegomis [83] Šanchajuje (Kinija) bei Wu ir kiti Pekine (Kinija) [84].

Teorinė prielaida, jog ksenogeninių audinių antigeniškumas yra dėl ląstelių struktūrų ar pačių ląstelių likučių ant karkaso, pagrindžiama tuo, kad kiaulės aortos vožtuvus reikia apdoroti glutaraldehidu prieš implantuojant, o žmogaus alotransplantato vožtuvų nereikia. Žinoma, kad imuninis-histologinis suderinamumas tarp rūšių neįmanomas, tuo tarpu žmogaus audiniai suderina mesni net imant juos iš kito individo. Kiaulių ląstelių paviršiuje yra gal- α^{1-3} epitopas, o žmonių – ne [85]. Taigi praktikoje, naudojant žmogaus alotransplantatus, retai kada atsižvelgiama į

suderinamumą su recipientu, tačiau net ir tokiomis aplinkybėmis transplantantas funkcionuoja ilgiau. Turint mintyje visas šias teorijas, siūlymas naudoti nuląstelintus kiaulės vožtuvus atrodo pagrįstas, teoriškai neturi likti antigeninių struktūrų. Plėtojant toliau šią technologiją, galima tobulinti vožtuvą, apauginant jį recipiento ląstelėmis iki implantacijos, tada šeimininko organizmas atpažins implantą kaip nuosavą audinį, nekils imuninės reakcijos, kita vertus – naujai besidauginančios ląstelės tikėtina kolonizuos seną kiaulės aceliulinį karkasą.

Grįžtant prie technologijos, pagrindinis principas – suardyti ląstelių membranas lizės būdu hipertoniniuose ar hipotoniniuose tirpaluose, po to likusias struktūras suardyti įvairiais detergentais, fermentais. Sėti ar nesėti ląsteles prieš implantavimą – diskutuotina tema.

Biologiniai deceliulizuoti ir receliulizuoti karkasai

Tai alo- ar ksenotransplantatai, kurie pradiniam etape įvairiomis technologijomis deceliulizuojami. Eksperimentais *in vitro* patvirtinta galimybė ant jų paviršių priauginti endotelines ląsteles bei fibroblastus [86].

Tokie modifikuoti-receliulizuoti vožtuviniai transplantatai eksperimentuose *in vivo* implantuoti avims, kiaulėms, o po 3–6 mėn eksplantavus įsitikinta pastarųjų nepakenkta struktūra ir funkcija. Remdamiesi gautais rezultatais, kai kurie mokslininkai pradėjo naudoti šiuos transplantatus ligoniams Rosso operacijos metu.

Biologiniai deceliulizuoti ir nereceliulizuoti karkasai

Tai alo- ar ksenotransplantatai, kurie nuląsteliami naudojant chemines medžiagas ir po to nebetęsiami tolimesni vožtuvo apdorojimo darbai, minimalizuojant galimą pakenkimą audiniams. Manoma, kad karkaso paviršiuje lieka nedaug imunologiškai nereikšmingų epitopų ir po implantacijos įvyks spontaninė receliulizacija ir ląstelių migracija recipiento ląstelėmis tiek paviršiuje, tiek audinio viduje. Ši teorija patvirtinta eksperimentuose *in vivo*, manoma, kad į karkasą migruoja kamieninės kaulų čiulpų ląstelės.

Taip pat 2000 m Dohmeno vadovaujama mokslininkų grupė

anksčiausiai atliko tokio tipo vožtuvų implantaciją žmonėms [87].

Tačiau reikia turėti mintyje, kad deceliulizuoti ir papildomai neapdoroti transplantatai savyje gali turėti retrovirusų, prionų, todėl tikėtina zoonozijų rizika.

Audinių deceliulizacija

Bendrybės

Biologiniai karkasai, gauti deceliulizavus audinius ar organus, sėkmingai panaudoti ikiklinikiniuose eksperimentuose su gyvūnais bei pritaikyti ir naudojami žmonėms [88,89]. Pašalinus ląsteles iš audinių, lieka karkasą sudarantys struktūriniai ir funkciniai baltymai, šis konstruktas-karkasas dar vadinamas ekstraceliuliniu matriksu (ECM). ECM struktūra, recipiento audinių reakcija, gijimas labai priklauso nuo donoro, iš kurio paimtas audinys, rūšies, deceliulizavimo būdo ir netgi nuo sterilizacijos prieš implantavimą.

Kseno- ir alogeniniai ląstelių ir ląstelių struktūrų antigenai recipiento organizme atpažįstami kaip svetimi ir kyla uždegiminė reakcija su audinių atmetimu ar be atmetimo. O deceliulizuotų audinių ECM gana gerai toleruojami tarp skirtingų rūšių recipientų. Šiuolaikinis mokslas audinių inžinerijos ir regeneracinės medicinos srityje plačiai tiria ir naudoja ECM iš įvairių audinių [90,91]. Pagrindinis nuląstelinimo tikslas – tiksliai ir efektyviai pašalinti ląstelių ir branduolių struktūras, minimaliai arba visai nepakenkiant ECM architektonikos, funkcionalumo ir gyvybingumo. Visiškai išvengti pakenkimo nepavyksta, bet kuriame nuląstelinimo etape įmanoma suardyti unikalią 3D struktūrą, svarbu, kad tai būtų minimalūs pakitimai, tolimesnėje eigoje galimai regeneruosiantys.

Nuląstelinimui dažniausiai taikoma kelių metodų kombinacija: fizikinių ir cheminių. Fizikiniai – tai poveikis įvairiomis ultragarso bangomis, mechaninis apdorojimas, slėgis, užšaldymas ir atšildymas. Taikant šiuos metodus, suardoma ląstelės membrana, skalavimu ir plovimu pašalinami organoidai, bet to nepakanka visiškai deceliulizacijai, todėl papildomai

reikalinga taikyti cheminius metodus. Dažniausiai naudojamas audinių apdorojimas fermentais (tripsinas), detergentais. Kaip ir mechaninės priemonės, šie metodai suardo membranas ir tarpląstelines bei ekstraląstelines jungtis. Kuo mažiau agresyvus apdorojimas, tuo mažiau pakenktas ECM gaunamas.

Deceliulizacijos būdai

Kaip jau anksčiau minėta, efektyviai deceliulizacijai atlikti gali būti taikoma įvairių būdų kombinacija. Pradiniu etapu svarbu suardyti ląstelės membraną, toliau būtina pašalinti ląstelės struktūrinius elementus, siekiant atskirti ECM, tačiau to nepakanka, nes dažniausiai lieka branduoliai ar jų dalys, todėl taikant chemines medžiagas suardomi pastarieji. Ne mažiau svarbus etapas – visų dalių pašalinimas, atliekamas plaunant įvairiais tirpalais. Visi minėti etapai gali būti kartojami keletą kartų įvairia trukme. Baigus labai svarbu inaktyvuoti chemines medžiagas, kad neliktų toksinų, kurie žalotų ECM. Norint įsitikinti, kad metodas yra tinkamas, būtinas nuląstelinimo efektyvumo įvertinimas, kuris atliekamas įvairiais būdais. Panagrinėkime kiekvieną nuląstelinimo būdą atskirai.

1. Fizikiniai metodai

Kaip jau minėta anksčiau, pagrindiniai fizikiniai metodai yra audinių atšaldymas, audinių apdorojimas slėgiu, ultragarsu ar mechaniškai. Atšaldymas naudojamas sausgyslių, raiščių [90,92] ir nervinio audinio [90] deceliulizacijai. Šąlant susidaro intraląsteliniai kristalai, kurie suplėšo membraną, sukelia lizę. Tačiau svarbu neviršyti temperatūros kritimo galimų ribų, kad nesužalotume ECM ir užtikrintume struktūrinių elementų pašalinimą.

Tiesioginio slėgio taikymas efektyvus tik audiniams, kurių ECM yra netankus (plaučiai, kepenys). Mechaninis poveikis taip pat efektyvus atskiriant nereikalingus audinių sluoksnius ir išlaikant natūralią 3D formą organų, kurie sudaryti iš kelių ar daugiau audinių rūšių sluoksnių (plonosios žarnos, šlapimo pūslė).

Mechaniniam poveikiui naudojami įvairūs prietaisai: magnetiniai plaktuvai, maišymo prietaisai, ultragarsą skleidžiantys aparatai. Juose, taikant kartu ir chemines medžiagas, užtikrinamas reikiamas proceso efektyvumas. Deja, nėra tyrimų, apibrėžiančių labiausiai efektyvų bangų dažnį ar plakimo greitį, tačiau yra aišku, kad visas minėtas priemonės naudojant optimaliu režimu, atsižvelgiant į audinių tankį, gaunamas reikiamas efektas.

2. Cheminiai būdai

2.1. Apdorojimas šarmais ar rūgštimis

Paveikiant audinius šarmais ar rūgštimis, suardomos ląstelių membranos, citoplazminės ir branduolių struktūros, turinčios RNR ar DNR. Pavyzdžiui, acto rūgštis, paraacto rūgštis, amonio hidrochloridas efektyviai suardo organoidus, jų ir ląstelės membranas [90], tačiau kartu suardomi svarbūs junginiai, tokie kaip mukopolisacharidai-glikozaminoglikanai (GAG). Tyrimais nustatyta, kad saugiausia naudoti yra paraacto rūgštis, apdorojant audinius maža koncentracija 0,1%, išlaikoma ECM struktūra, išsaugomos kolageno skaidulos, išsaugomi natyviniai GAG (hialurono r., chondroitinsulfatas A, dermatano sulfatas [93]. Taip pat aprašytas ir antimikrobinis poveikis, tai svarbu sterilizuojant audinius prieš implantavimą [90,94].

2.2. Detergentai

Tai cheminės medžiagos, dar vadinamos muilais, kurių molekulės turi ir hidrofilinę, ir hidrofobinę grupę, todėl šios medžiagos veikia kaip tirpiklis. Pagrindinis veikimo principas – įsiterpti į ląstelės ar organoidų membranas, suardyti jas ir, esant reikiamai koncentracijai, ištirpinti, denatūruoti sudedamąsias dalis. Visi detergentai klasifikuojami pagal jų hidrofiliinės grupės sudėtį.

2.2.1. Nejoniniai detergentai

Šių medžiagų hidrofiliinė grupė neturi krūvio. Nejoniniai detergentai labai populiarūs įvairiuose deceliulizacijos protokoluose dėl jų švelnaus poveikio audinių struktūroms. Pastarieji išardo membranose chemines jungtis, jungiančias riebalines molekules, riebalines ir baltymų molekules, tačiau

išsaugomos jungtys tarp baltymų, taip geriau išsaugoma ECM struktūra ir funkcionalumas [95].

Triton X-100 – populiariausia medžiaga šioje grupėje, audinių apdorojimo trukmė įvairuoja nuo kelių valandų iki kelių savaitių [96-98]. Tačiau efektyvumas nevienodas, pastebėta, kad deceliulizuojant širdies vožtuvus, geriausias efektas gaunamas burėse po 24 valandų apdorojimo, bet ląstelinės struktūros išlieka miokarde ir aortos sienoje. Tačiau kartu iš ECM beveik visai pašalinami ir GAG, mažėja laminino, fibronektino kiekis burėse. Šios medžiagos poveikis nevienodas skirtingiems audiniams, pavyzdžiui, sausgyslių audiniuose GAG išlieka ir po 4 dienų ekspozicijos šia medžiaga. Taigi, nors ir poveikis švelnus, tačiau efektas priklauso nuo audinio tipo, koncentracijos ir kitų metodų, taikomų kartu.

2.2.2. Joniniai detergentai

Šių medžiagų hidrofiliinė grupė turi arba teigiamą krūvį (katijonai), arba neigiamą krūvį (anijonai). Medžiagos efektyviai ištirpdo ir ląstelės membraną, ir branduolines struktūras, ir denatūruoja baltymų molekules rišančias jungtis. Dažniausiai naudojamos medžiagos – natrio dodecilsulfatas (SDS) ir natrio deoksicholinė rūgštis (DEO), populiarios šių medžiagų kombinacijos su triton X-200 [100-102].

SDS, kaip ir kitos šios grupės medžiagos, gerai pašalina ląstelines struktūras, tačiau nėra tokia efektyvi ardant branduolines struktūras ir citoplazminius baltymus. Be to, labiau žalojama natyvinė baltymų struktūra, suardant GAG, netenkama kolageno vientisumo.

DEO efektyviai suardo ir šalina ląstelių struktūras, organoidus ir dar labiau pažeidžia baltymus, lyginant su SDS.

Dėl savo agresyvaus poveikio šios medžiagos naudojamos mažomis koncentracijomis ir dažniausiai kombinuojamos su kitais detergentais (zwitterionic ar nejoniniais) ir kitais būdais (mechaniniais).

2.2.3. Mišrūs (angl. Zwitterionic) detergentai

Šie detergentai turi abiejų kitų grupių savybes. Pastarieji geriau

denatūruoja baltymus nei nejoniniai, geriausias pavyzdys – 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio] –1 –propanosulfonatas (CHAPS), kuris naudojamas kraujagyslių deceliulizacijai. CHAPS apdorota arterija išlaiko normalią histologinę kolageno ir elastino struktūrą, tačiau sumažina likusio ECM atsparumą spaudimui ir apkrovai. Panašūs rezultatai gaunami naudojant triton X-100 ir hipotoninį/hipertoninį tirpalus. Šios grupės medžiagos retai naudojamos izoliuotai, norint gauti reikiamą efektą, taikomos įvairios kombinacijos. Visumoje šio tipo detergentai naudojami kitų organų deceliulizacijai. [103-105].

2.3. Hipotoninis ir hipertoninis tirpalai

Apdorojant audinius ar organus hipertoniniu ir hipotoniniu tirpalu, gaunama ląstelių lizė [90,106,107]. Šio metodo pavyzdys galėtų būti protokolas, kai 11 valandų audinys mirkomas hipotoniniame tirpale (10 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA), po to pakartotinai 11 valandų hipertoniniame tirpale (50 mM Trizma HCl, 1 M NaCl, 10 mM EDTA). Gaunama ląstelių lizė, tačiau iš audinio nepašalinami organoidai ir ląstelių struktūrų likučiai. Visiškos deceliulizacijos efektui užtikrinti papildomai naudojami arba detergentai, arba fermentai, tirpdantys minėtas struktūras, ypač tai svarbu naikinant DNR, kuri linkusi prisijungti prie ECM baltymų.

2.4. Chelatai

Chelatas – cheminis junginys, turintis trimatę struktūrą, kurios viduje yra daugiavalenčio metalo jonas. Šios medžiagų grupės geriausi pavyzdžiai: etilendiamintetraacetatas (EDTA) ir etilenglikol O,O'-bis (2-aminoetil) N,N,N',N' tetraacto rūgštis (EGTA). Ląstelėms jungiantis prie kolageno ir fibronektino, dalyvauja divalenti metalų jonai (Ca ir Mg), kurie būna ant ląstelių struktūrų likučių jungčių, chelatai prisijungia katijonus, nesusidaro jungtys ir palengvinamas ląstelių struktūrų pašalinimas iš audinių. Dažniausiai chelatai naudojami kombinuojant su fermentais (tripsinu) [108-115].

2.5. Fermentai

Šiai grupei priklauso proteazės, nukleazės ir kalcį surišantys chelatai.

Tripsinas, ko gero, populiariausia proteazė, naudojama deceliulizacijai, šis fermentas skaldo baltymų jungtis. Fermentas geriausiai veikia pasiekus 37°C, kai pH 8. Nukleazės, tiek endonukleazė, tiek egzonukleazės, suardo DNR ar RNR jungtis, suardydamos molekulės struktūrą [113-115].

Fermentų poveikis audiniams nustatinėtas daugelio tyrėjų, vienais atvejais gautas geras rezultatas deceliulizuojant plaučių arterijos vožtuvą, kitais – norimas rezultatas negautas.

Nepaisant sėkmingų rezultatų, taip pat pastebėtas ir pašalinis žalojantis poveikis ECM: suardomas vientisumas, elastino skaidulos, mažėja GAG kiekis, tačiau kolageno skaidulos lieka mažai pakenktos. Nors ir žymiai sumažėja elastingumas, tačiau po apdorojimo endotelinės ląstelės ant karkaso paviršiaus auga gerai. Ši technologija pasižymi dideliu efektyvumu, tačiau būtina ekspozicijos tirpaluose kontrolė.

2.6. Proteazių inhibitoriai

Deceliulizacijos proceso metu, nesvarbu, kokia technologija taikoma, yrant ląstelėms išsiskiria proteazės, kurios savaime gali pakenkti ECM. Todėl naudojami proteazių inhibitoriai: fenilmetilsulfonilfluoridas, aprotoninas, leupeptinas. Kitas būdas inaktyvuoti proteazes – naudoti buferinį tirpalą, kurio pH 7–8; kaip ir kiti fermentai, šie gali būti kontroliuojami keičiant temperatūrą ir apdorojimo numatytomis medžiagomis trukmę.

2.7. Antibiotikai

Bet kokio nuląstelėjimo proceso metu labai svarbi sterilizacija, tai pakankamai sunku užtikrinti, ypač kai apdorojimo trukmė ilga, tuomet ECM kontaminacijos tikimybė didelė. Kiekviename originaliame protokole įtrauktas originalus apdorojimas antibiotikais, vienais atvejais tai tik vienas vaistas, kitais – visas spektras, užtikrinantis ir antibakterinę, ir priešgrybelinę apsaugą. Dažniausiai naudojami preparatai penicilinas, streptomocinas, amfotericinas B [116,117].

3. Deceliulizacijos efekto patikrinimas

Nors yra daugybė būdų [118-122] deceliulizacijos efektyvumui nustatyti, pagrindinis ir pradinis metodas – histologinis tyrimas, dažant

hematoksilinu ir eozinu, tai lyg apžvalginis tyrimas audinių būklei įvertinti, nustatyti, ar išliko branduolinės struktūros. Kiti histologiniai tyrimai, dažant Masson Trichome, Movat Pentachrome, Safrin O naudojami nustatyti citoplazminėms ir ekstraląstelinėms molekulėms bei struktūroms. Imunohistocheminiai metodai skirti nustatyti ląstelinių baltymų buvimą, pavyzdžiui, aktinui ir vimentinui.

Deceliulizacijos efektyvumas patikrinamas ne tik nustatant ląstelines struktūras, bet ir patvirtinant DNR nebuvimą. Imunofluorescentiniai tyrimai, kai audiniai dažomi DAPI ar Hoechst, nustato DNR ar RND buvimą, šios molekulės švyti mėginiuose, taip pat gali būti atliekamas DNR zondo tyrimas kokybiniam įvertinimui. Kiekybiniam DNR nustatymui atliekami mėginiai su PicoGreen.

Pasirinktinai papildomai galima atlikti grandininę polimerazės reakciją ar elektroninę mikroskopiją, branduolių ar citoplazminių elementų likučiams nustatyti. Tiriant pašalintų elementų likučius, įsitikiname nuląstelavimo efektyvumu, tačiau ne mažiau svarbu įsitikinti likusių struktūrų kokybe. Ji įvertinama nustatant ECM sudėtines dalis: fibronektiną ir lamininą, GAG, elastines skaidulas, kolageno skaidulas. Visi šie elementai būtini sėkmingam ląstelių prisitvirtinimui ant karkaso ir augimui.

Įvertinus cheminę struktūrą, rekomenduojama įvertinti ir mechaninį karkaso patvarumą, tamprumą, vožtuvų sandarumą. Būtina įsitikinti dėl esamų elementų sąsajų ir funkcionalumo.

Biologinių audinių apdorojimo metodų apibendrinimas

Cheminis apdorojimas

Nors apdorojimas taikomas visam vožtuviniam transplantatui, tačiau atskiros medžiagos turi skirtingą poveikį aortos vožtuvui ir aortos sienelei. Pavyzdžiui, alfa oleino rūgštis geriau veikia bures nei sienelę. O apdorojant metalų jonais, gaunamas atvirkštinis efektas. Norint užtikrinti tinkamą

apdorojimą visoms anatomicinėms sritims, bandoma taikyti mišrų apdorojimą, naudojant priešingai veikiančias medžiagas. Pavyzdžiui, eksperimentuose su avimis geri rezultatai gauti implantus apdorojant etanoliu, kuris veikia bures, kartu su aliuminio jonais, kurie geriau veikia aortą [123], o po apdoravimo glutaraldehidu papildomai naudojamas diaminas vienodai geram efektui užtikrinti [124]. Kiaulės aortos vožtuvus apdorojant karbodiimidu [125], kalcifikacijos profilaktikai užtikrinti papildomai taikytas fotooksidacijos efektas [126,127]. Aprašyti Zilla eksperimentai [128] su paodiniais implantais, kai mišrų glutaraldehido ir alfa oleino rūgšties apdorojimą papildė karbodiimidas.

Aceliuliniai karkasai ir deceliulizacija

Aceliuliniai karkasai labai patraukli ir populiari medžiaga tyrinėjimui ir dėl mechaninių, ir dėl biologinių savybių. Žmogaus aortos vožtuvo alotransplantatai yra įsiuvami neatsižvelgiant į audinių suderinamumą ir tampa aceliuliniais per kelis mėnesius. Alotransplantatas gali išsilaikyti iki 20 metų iš esmės kaip negyvas audinys, nenaudojant jokio specialaus apdoravimo chemikalais. Pastebėtina, kad pastarieji funkcionuoja ilgiau negu glutaraldehidu apdorojamas kiaulės ksenotransplantatas; tokį patvarumo pagrindą sudaro vožtuvo specifinė struktūra [129,130]. Manoma, kad specifinės kolageno jungtys, elastino sluoksniai, prisitaikymas prie nevienodos apkrovos, anizotropija suteikia vožtuvui unikalų ilgaamžiškumą. Nuo pat pradžių buvo manoma, kad kiaulės ksenotransplantatas savo struktūrine sandara teoriškai yra geresnis už perikardinį vožtuvą [131] ir todėl išsilaiko daug ilgiau. Ši nuomonė paneigta, sukūrus ypač geros konstrukcijos perikardinį vožtuvą (Carpentier-Edwards) [132,133], kuris daug patvaresnis už glutaraldehidu apdorojamus kiaulės vožtuvus.

Faktiškai nebuvo neigiamus rezultatus įrodančių straipsnių iki tol, kol Hilbertas, dirbantis NIH laboratorijose, atliko įvairių nuląstelinimo protokolų lyginamąjį tyrimą eksperimentuose su avimis [134]. Jis pakartojo daugelio tyrinėtojų aprašytus protokolus ir implantavo 2 serijas tokių vožtuvų į avių plaučių arteriją. Po 20 savaičių vožtuvai buvo išimti ir histologiškai ištirti.

Beveik visais atvejais pastebėtas audinių išvešėjimas ir infiltracija uždegiminėmis ląstelėmis, taip pat makroskopiškai matoma aneurizminė dilatacija. Kitas toks tyrimas atliktas Stock'o [135], kuris taip pat mini panašias komplikacijas, nepaisant to, kad, skirtingai nei Hilberto eksperimentuose, ant vožtuvų buvo pasėtos ląstelės prieš implantuojant.

Galima hipotetiškai teigti, kad eksperimentai su avimis buvo pasmerkti nesėkmei ir kad deceliulizuotas ksenotransplantas turėtų gerai funkcionuoti žmogaus organizme. Pastaruosius dešimtmečius atliekant eksperimentus su avimis, paaiškėjo, kad avių organizmas į implantus reaguoja gausiu ir greitai fibroziniu peraugimu, tai vyksta daug greičiau nei žmogaus organizme. [136]. Avis, kaip eksperimentinis gyvūnas, pasižymi bene stipriausia imunine sistema, todėl ir reakcija neadekvačiai greita ir ryški.

Galbūt tai buvo priežastis, kodėl CryoLife Synergraft panaudojo be ilgalaikių atokiųjų rezultatų eksperimentuose su gyvūnais, o jų audinių apdorojimo būdas mažai kuo skyrėsi nuo kitų. Rezultatai po implantacijos pacientams greitai tapo katastrofiški [137]. Iš principo rezultatai nesiskyrė nuo Stock'o su kolegomis [135] gautų ir aprašytų eksperimentuose su avimis. Išlieka nežinomi mechanizmai, skatinantys ląsteles pakisti, peraugti jungiamuoju audiniu, susitraukti.

Nors jo pirmasis klinikinis naudojimas buvo nesėkmingas, šio metodo šalininkų tai neatbaido. Dohmenas, Konertzas su kolegomis iš Berlyno sukūrė savitą deceliulizuotą vožtuvo protezę ir panaudojo klinikoje pacientams. Jų teigimu, rezultatai labai geri, netgi teigia pradėję implantuoti recipientų ląstelėmis apaugintus vožtuvus.

Tikėtina, kad nėra apdorojimo metodo, kuris 100% pašalintų visas struktūras ir išsaugotų ECM su savo sudedamosiomis dalimis. Todėl manoma, kad jei po deceliulizacijos lieka labai minimalūs kiekiai ląstelių struktūrų, toks karkasas yra saugus implantuoti. Vis daugiau kompanijų taiko moksliskai pagrįstus deceliulizacijos metodus karkasams gaminti ir naudoti praktikoje. Pastarąjį dešimtmetį sukurti įvairūs karkasai: odos (Alloderms, LifeCell, Corp.), kiaulių plonųjų žarnų pogleivio (SurgiSISs, Cook Biotech, Inc.;

Restores, DePuy Orthopaedics, Inc.), kiaulės šlapimo pūslės (ACell, Inc.), kiaulės širdies vožtuvų (Synergrafts, CryoLife, Inc., Matrix P, Matrix P plus, AutoTissue GmbH) ir kiti. Ne visi pagaminti karkasai pasiteisino, dalis pripažinti netinkamais naudoti dėl su vožtuvu susijusių komplikacijų. Tai dar kartą patvirtina faktą, kad šios technologijos perspektyvios, tačiau reikalauja detalių tyrimų ir išbandymų.

Kamieninės ląstelės ir kitos ateities perspektyvos

Išsamią apžvalgą apie ląsteles, naudojamas širdies audinių inžinerijoje, yra pateikę Flanaganas ir Panditas [138]. Tirdami ląstelių širdies vožtuve fenotipą, nemažai nuveikė Yacoubas [139,140], Gerosa [141] ir Boughneris [142]. Tačiau kokias ląsteles naudoti karkasams užsėti, lieka neaišku. Diskutuojama apie du pagrindinius ląstelių tipus: mezenchimines ir cirkuliuojančias endotelines kamienines ląsteles. Šios ląstelės gali būti pasėjamos tiek ant aceliulinių, tiek ant besirezorbuojančių biologinių karkasų.

Pradėjus naudoti kamienines ląsteles mokslui, dauguma tyrinėtojų tikėjo, kad pastarosios bus „protingesnės“ ir gerai kolonizuos karkasus. Tačiau pastebėta, kad embrioninės kamieninės ląstelės, perkeltos į nesveikas širdis, ne visada atkuria pažeistą audinį, o greičiau suformuoja kalkines sąnašas ar teratomas [143]. Nėra įrodymų, ar nediferencijuotos kamieninės ląstelės elgsis daug protingiau karkasuose. Tačiau tai išlieka ateities perspektyva kaip naujos technologijos galimybė kartu naudojant aceliulinius karkasus.

Taigi net ir taikant šiuolaikinius vožtuvų apdorojimo būdus, nepavyko gauti netrombogeniško, nekalcifikuojančio, mechaniškai patvaraus, artimo natūraliai anatomicinei struktūrai širdies vožtuvo pakaitalo. Pastaruoju laikotarpiu mokslininkai, taikydami naujausius audinių inžinerijos metodus, bando sukurti karkasą, ant kurio būtų galima auginti ląsteles. Gautas vožtuvas galėtų augti kartu su pacientu, ląstelės regeneruotų tiek matrikse, tiek paviršiuose, ir tai leistų užtikrinti netrombogeniškumą [144].

4. TYRIMŲ METODIKOS

Moksliniam eksperimentiniam darbui gauti Bioetikos komiteto leidimai (2007-07-12 Nr. 0159 ir 2009-10-14 Nr. 0193) atlikti eksperimentus su smulkiais ir stambiais eksperimentiniais gyvūnais. Visi veiksmai atlikti nesuteikiant eksperimentiniams gyvūnams skausmo, vadovaujantis galiojančiais Geros laboratorinės praktikos su eksperimentiniais gyvūnais nuostatais ir Europos Sąjungos konvencijomis.

Eksperimentiniai modeliai sukurti taip, kad tiriamos medžiagos būtų išbandomos in vitro ir in vivo, nuosekliai. Eksperimentai suplanuoti ir atlikti nuosekliai didinant eksperimento apimtį (etapai išdėstyti schemeje). Tyrimui pasirinkti kiaulės širdies vožtuvų transplantatai (aortos ir plaučių arterijos vožtuvai kartu su kraujagyslių sienomis), kaip artimi žmogui anatomiškai ir funkciškai.

Tyrimui pasirinktos cheminės medžiagos, kurios savo savybėmis panašios į šiuo metu naudojamas medžiagas biologiniams protezams apdoroti arba originaliai parinktos.

Eksperimentų etapų schema:

- 1. Aortos ir plaučių arterijos apdorojimas cheminėmis medžiagomis, sumažinant audinių savybę kalcifikuoti – in vitro.*
- 2. Apdorotų audinių gabaliukų implantavimas Wistar žiurkėms į paodį – in vivo.*
- 3. Apdorotų vožtuvinių transplantatų implantavimas kiaulėms į nusileidžiančiąją aortą – in vivo.*
- 4. Vožtuvinių transplantatų nuląstelinimas (deceliulizacija) – in vitro.*
- 5. Vožtuvinių nuląstelintų transplantatų implantavimas į avių širdis – in vivo.*

Trečiame ir penktame etapuose eksperimentai vykdyti vadovaujantis geriausiais rezultatais gautais prieš tai buvusiuose etapuose.

1. Cheminių medžiagų parinkimas ir aortos vožtuvo transplantato apdorojimo jomis protokolų sukūrimas.

Eksperimento metu naudotos vyriškos lyties 20–30 kg kiaulės, kurioms premedikacijai suleista diazepamą 10 mg/kg ir ketaminą 15 mg/kg, atlikta heparinizacija (200vv/kg) bei eutanazija. Steriliomis sąlygomis išpreparuoti aortos ir plaučių arterijos vožtuviniai transplantatai. Tai atlikta iškerpant vožtuvus su 2–3 cm sienelės, pašalinant adventiciją, riebalinį audinį ir raumenis. Transplantatai laikomi šaltame fiziologiniame tirpale, kol pernešami į apdorojimo tirpalus.

Apdorojimui pasirinktos cheminės medžiagos:

- *glutaraldehydas 0,1% (Glu) su fosfatiniu buferiu,*
- *L-alaninas (Ala) 100 mM pH 7,6 su fosfatiniu buferiu,*
- *L-norvalinas (Norv) 100 mM pH 7,6 su fosfatiniu buferiu,*
- *karbodiimidis (EDC) 0,3 M su priedais N-hidroksisukcimi-*imidas* 0,1 M (NHS) ir poli(propileno glikol)bis 2-(aminopropil) eteris 0,1M (Jeffamin).*

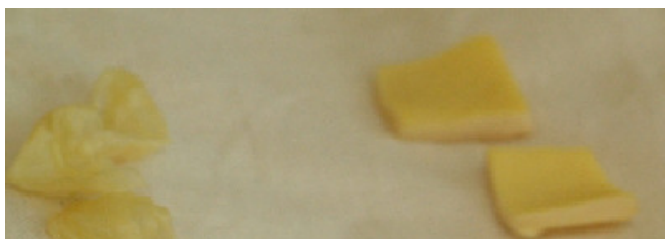
Visais atvejais audiniai apdoroti kambario temperatūroje, užtikrinant pastovų transplantatų sukimosi ratu specialiame maišytuve 50–70 kartų per minutę dažniu.

Apdorojimas su Glu truko 24 valandas, po ko audiniai buvo skalaujami šaltame fiziologiniame tirpale. Alanino ir norvalino grupėse pradinis audinių apdorojimas su Glu truko 24 valandas, po skalavimo šaltame fiziologiniame tirpale papildomai 24 valandas apdorota atitinkamai Ala ir Norv medžiagomis nuolatinio judėjimo sąlygomis. Paskutinėje grupėje pradinis apdorojimas EDC su NHS truko 24 valandas, taip pat naudotas skalavimas šaltu fiziologiniu skysčiu, po to 3 valandas skalauta jeffamine ir dar 24 valandas su Ala 100 mM pH 7,6 su fosfatiniu buferiu. Apdorojus cheminėmis medžiagomis audinius, pastarieji buvo laikomi šaltai 4°C fiziologiniame tirpale iki 24 valandų prieš implantavimą.

2. Cheminio apdoravimo efektyvumo patikrinimas eksperimentiniame modelyje be sąlyčio su kraujotakos sistema (su smulkiaisiais eksperimentiniais gyvūnais) (N=120 tik aortos vožtuvinio transplantato).

Eksperimentui naudotos Wistar veislės žiurkės, vyriškos lyties, 150–200 g svorio. Pusę paros iki eksperimento nešertos, tik girdytos. Nejautra sukeliama į pilvo ertmę suleidžiant ketamino (Bremer Pharma GmbH, Vokietija) ir antibiotikų 0,1 g reflino (Cephazolin, Ranbaxy Ireland Limited) infekcijos profilaktikai. Įvertinus nejautrą, nukirpti nugaros plaukai ir odos paviršius apdorotas cutasept. Atlikta po 3 odos pjūvius abipus stuburo, buku būdu išpreparuoti paodžio audiniai, paruošiant apie 1 cm² guolį. Anksčiau apdoroti audiniai (kaip aprašyta anksčiau) išimti iš laikymo tirpalų bei praplauti fiziologiniu skysčiu. Iš kiekvienos anatominės srities (vožtuvo, kraujagyslės sienelės) iškirptas 1 cm² gabalėlis (1 pav.), kuris įdėtas į paruoštą guolį (2 pav.). Oda ir paodis užsiūti pavienėmis adaptacinėmis 4/0 prolono siūlėmis.

1 pav. Implantuojamų audinių gabalėliai



2 pav. Audinių implantavimas į žiurkių paodį



Eksperimentiniai gyvūnai tolimesniam gydymui ir stebėjimui grąžinti į vivariumą. Po 60 dienų atlikta pakartotinė operacija, kurios metu sukelta nejautra anksčiau minėtu būdu, po to atlikta eutanazija, išimti anksčiau implantuoti audinių gabalėliai. Pastarieji išpreparuoti nuo aplinkinių audinių bei patalpinti sausai ir šaltai.

Prieš atliekant liekamojo kalcio kiekio nustatymą, audinių gabalėliai laikyti sausai 24 valandas, tyrimui naudotas Hitachi 175-50 (Japonija) spektrografas. Visi prietaiso nustatymai sureguliuoti pagal gamintojo rekomendacijas, naudota katodinė lempa, skleidžianti 240,7 mm bangas, esant 10 mA srovės stiprumui. Liepsną sudarė acetilenas ($2,94 \cdot 10^4$ Pa dujų slėgis) ir oras ($1,28 \cdot 10^4$ Pa dujų slėgis), tad audinių fragmentacija gauta naudojant sausą mineralizaciją, degimo temperatūra 800–850° C. Audinių likučiai ištirpinti HCl tirpale (1:1). Kalcio kiekis matuotas mg/g sausos audinio masės.

Gauti rezultatai apdoroti statistikos programa SPSS, palyginti gautieji vidurkiai, naudojant Stjudento t-testą ir ANOVA, kai $p < 0,05$, manoma, kad vidurkiai skiriasi statistiškai patikimai.

3. Cheminio apdoravimo efektyvumo patikrinimas eksperimentiniame modelyje esant tiesioginiam sąlyčiui su kraujotakos sistema (su stambiaisiais eksperimentiniais gyvūnais) (N=20 tik aortos vožtuvinio transplantato) (gyvūnai, nejautra, operacinė technika, tyrimai)

Eksperimente naudoti vožtuviniai transplantatai (kraujagyslės sienelė su vožtuvu ir nedideliu raumeniniu sluoksniu), apdoroti cheminėmis medžiagomis, kaip aprašyta anksčiau. Prieš įsiuvimą perplauti fiziologiniu tirpalu, patalpinti į antibiotikų tirpalą.

Eksperimente naudoti vyriškos lyties paršeliai 20–30 kg. Premedikacijai suleista diazepamą 5 mg/kg ir ketaminą 10 mg/kg. Išpunktuotos, kaniuliuotos ausies vena ir arterija, stebėtas arterinis kraujo spaudimas, prijungus elektrodus – elektrokardiograma. Anestezijos indukcijai suleistas fentanilio 0,005mg/kg, propofolio 2,5mg/kg, tracrיום. Atlikta endotrachėjinė intubacija

7, 7,5 ar 8 dydžio vamzdeliu. Pradėta dirbtinė plaučių ventiliacija oru, palaikant normalius kraujo dujų rodiklius. Anestezija palaikyta isofluranu, fentaniliu, propofoliu. Infekcijos profilaktikai skirtas cefazolinas 1g operacijos pradžioje ir pooperaciniu periodu.

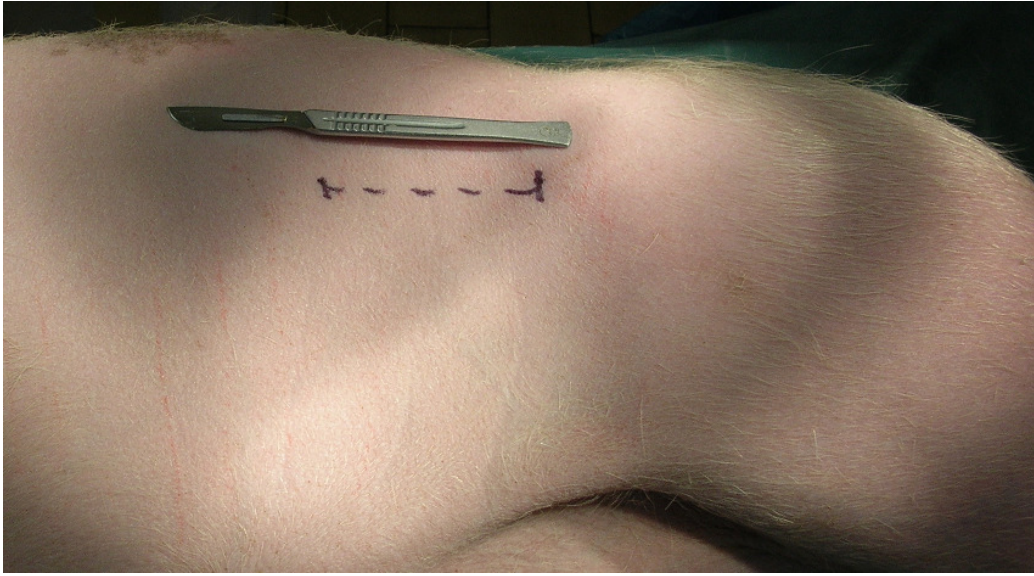
Operacinis plotas nuskustas bei paruoštas su cutasept, padengtas steriliais apklotais. Žemiau šonkaulių lanko iš kairės pusės (3 pav.) atliktas apie 10 cm odos pjūvis, įdėtas ir išplėstas plėstuvus, paodis ir raumenys išpreparuoti elektrokoaguliuojant iki pilvaplėvės. Pastaroji buku būdu atskirta nuo retroperitoninio tarpo. Patekus už pilvaplėvės, išpreparuota aorta žemiau a. renalis sin., esant reikalui perrištos juosmeninės arterijos (4 pav.). Heparinizuota (200 vv/kg), aorta perspausta aortiniais spaustukais žemiau inkstų arterijų ir perkirpta. Dviem ištisinėmis 4/0 prolono siūlėmis įsiūtas vožtuvinis transplantatas (5 pav.), atleisti spaustukai. Įsitikinus, kad nėra kraujavimo, audiniai susiūti pasluoksniui. Gyvuliukai stebėti, esant pakankamam raumenų tonusui ir kramtymo refleksui, ekstubuoti įsitikinus, kad gali savarankiškai vaikščioti, skirti nuskausminamieji ir pervežti į vivariumą. Tolimesnis gydymas ir stebėjimas tęstas vivariume 60 dienų.

Po numatyto laiko gyvuliukams atlikta pakartotinė operacija. Anestezijos indukcija ir palaikymas atlikti kaip aprašyta anksčiau. Operacinis plotas nuskustas bei paruoštas su antiseptiku. Kairėje pusėje buvusio rando vietoje atliktas pjūvis ir audiniai bei sąaugos preparuoti kaip aprašyta anksčiau, naudojant elektrokoaguliaciją. Išpreparuota aorta ties vožtuvinio transplantato įsiuvimo vieta, heparinizuota (200 vv/kg) (6 pav.).

Matuotas tiesioginis spaudimas iki transplantato ir už jo, apskaičiuotas spaudimų skirtumas. Atlikta eutanazija ir iškirptas implantatas. Pašalinti aplinkiniai audiniai, perkirptas išilgai, nufotografuotas vidinis paviršius. Audiniai iškirpti pagal anatomines sritis ir padalinti pusiau. Vienoje pusėje nustatinėtas liekamojo kalcio kiekis, kaip aprašyta anksčiau. Kita audinių pusė, skirta histologiniam ištyrimui, panardinta į 10% formalino tirpalą (formaldehide 36-38%, Lach-Nez, s.r.o., Čekija), laikyta porą dienų. Po to gabalėliai įlieti į parafiną, mikrotomu atlikti pjūviai. Liekamojo kalcio

kiekio vizualizavimui dažyta von Kossa būdu, kur kalcis matomas juodų taškelių pavidalu. Gauti rezultatai apdoroti statistikos programa SPSS, palyginti gautieji vidurkiai, naudojant Stjudento t-testą ir ANOVA, kai $p < 0,05$, manoma, kad vidurkiai skiriasi statistiškai patikimai.

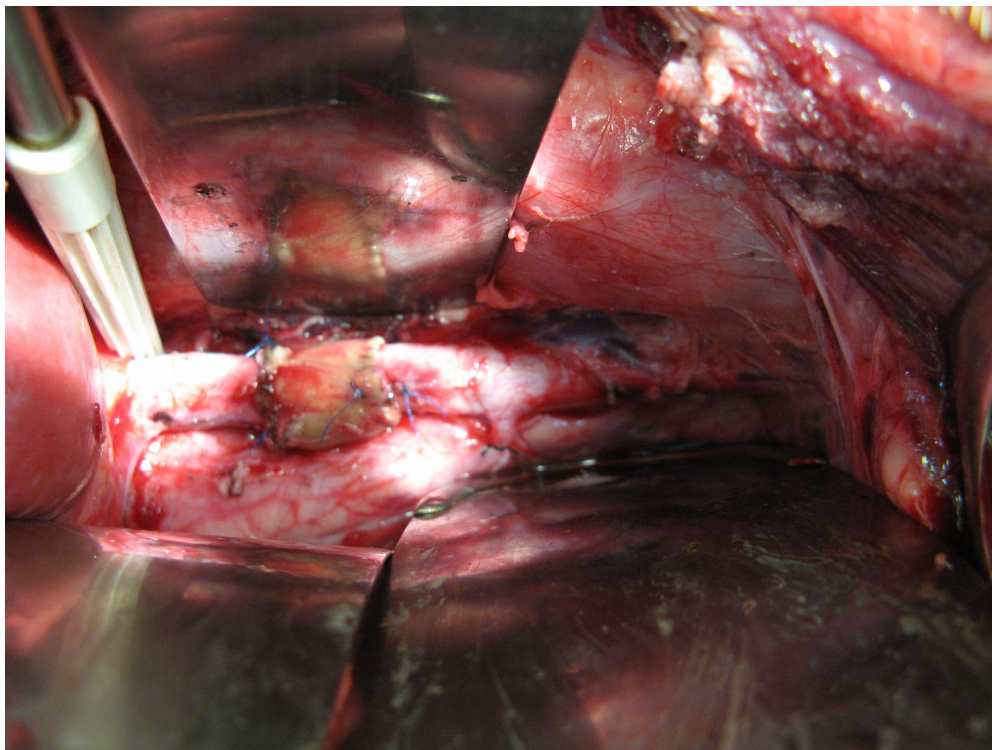
3 pav. Pjūvio vieta ir ilgis, operuojant pilvo aortą



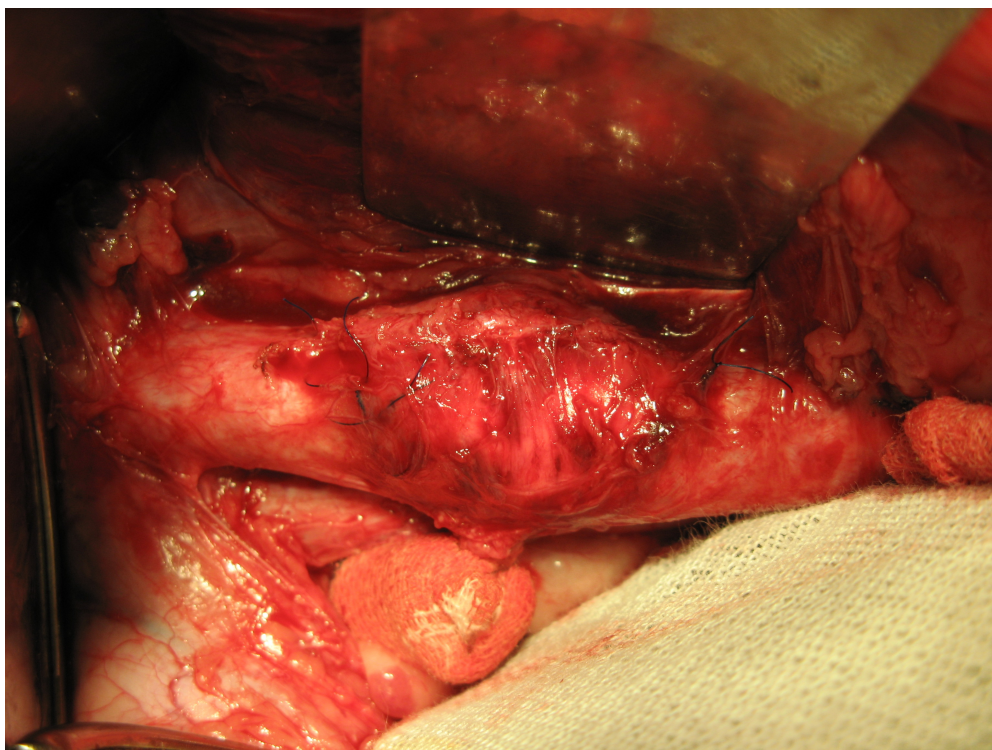
4 pav. Išpreparuota aorta retroperitoniniame tarpe, ligatūromis atskirtos juosmeninės arterijos, pasiruošta užspaudimui



5 pav. Įsiūtas vožtuvinis transplantatas, įsitikinama, ar nėra kraujavimo



6 pav. Vožtuvinio transplantato išpreparavimas po 60 dienų

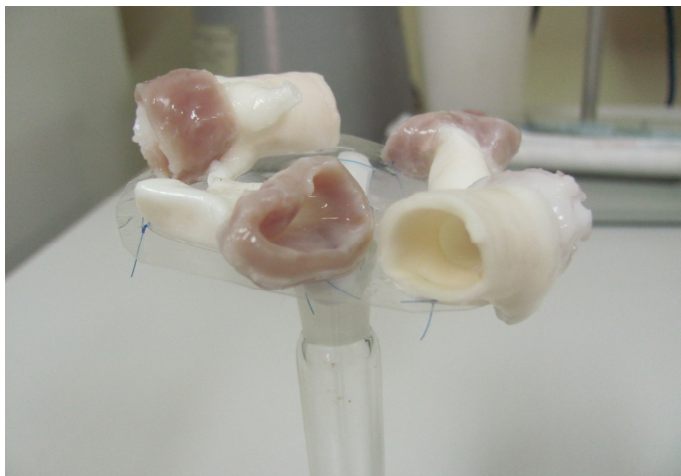


4. Aortos ir plaučių arterijos vožtuvinių transplantatų apdorojimo detergentais ir kitomis medžiagomis protokolų sukūrimas ir taikymas in vitro, pašalinant ląstelines struktūras (deceliulizacija) (cheminės medžiagos, apdorojimo protokolai, veikimo principai, tyrimai)

Eksperimentui naudotos 30–35 kg kiaulės (N=24), kiekvienam protokolui išbandyti naudoti 3 skirtingų kiaulių aortos ir plaučių arterijos vožtuviniai konduitai. Premedikacijai skirta diazepamą 5 mg/kg ir ketaminą 10 mg/kg, anestezija gilinta tiopentaliu, fentaniliu, po to heparinizacija (200 vv/kg), ir suleista KCl, atlikta eutanazija. Steriliomis sąlygomis išpreparuoti aortos ir plaučių arterijos vožtuviniai transplantatai. Tai atlikta iškerpant vožtuvus su 2–3 cm sienelės, pašalinant adventiciją, riebalinį audinį, paliekant nedidelį raumens ruoželį (apie 3–5 mm) prie pat vožtuvo. Transplantatai laikyti šaltame fiziologiniame tirpale, kol pernešti iki apdorojimo tirpalų. Tiriami transplantatai sudėti į sterilų indą, prifiksuojami prie specialios membranos, kuri sukasi 60 k/min greičiu pagal laikrodžio rodyklę taip, kad vožtuvo burės laisvai juda (7 pav.). Indas pagal poreikį dedamas į termostatą (8 pav.) arba į šaldytuvą.

Deceliulizacijos efektui pasiekti naudojamos medžiagos: detergentai (Na deoksicholinė rūgštis, Na dodecyl sulfatas, triton-X-100, CHAPS), fermentai (tripsinas, DNRaze ir RNRaze), įvairios koncentracijos tirpalai ir buferinės terpės.

7 pav. Membrana su pritvirtintais transplantatais



8 pav. Indas su transplantatais termostate, membranos sukimosi greitis 54 k/min.



Pradinis apdorojimas detergentais vykdomas termostate (8 pav.) 37°C 5 procentų CO₂ numatyta laiko tarpą, po to plaunama steriliu fiziologiniu tirpalu. Likusioms branduolių ar organoidų dalelėms pašalinti atliekamas apdorojimas DNRaze ir RNRaze, fermentais, suardančiais baltymines struktūras. Šis apdorojimas fermentais dar svarbus dėl galimų kiaulės retrovirusų, tai padeda išvengti užsikrėtimo po implantacijos. Apdoroti transplantatai dar kartą plaunami ir panardinami į mitybinę terpę L-15 (Leibovitz) (Gibco, UK) su L-amino r. ir su L-glutaminu, papildomai dedami antibiotikai (penicilinas/streptomocinas), laikomi iki implantacijos 4°C temperatūroje ne ilgiau kaip 7 dienas.

Deceliulizacijos efektui gauti mūsų tyrime naudoti 8 protokolai, vieni iš jų anksčiau aprašyti kitų autorių, šiek tiek patobulinti, kiti originalūs. Išbandėme visas įmanomas kombinacijas su visais tipais. Siekiant išsaugoti galimą komercinę paslaptį, protokoluose nurodytos ne visos sudedamosios dalys.

Deceliulizacijos protokolai:

1. 0,1% natrio deoksiholinė rūgštis, 0,1% natrio dodecilsulfatas;
2. 0,1% natrio deoksiholinė rūgštis, 0.25% tert-octylphenyl-polyoksietilenas (triton X-100);
3. 0.5% tripsinas, 0.2% etilendiamintetracto rūgštis (EDTA);
4. 0.05% tripsinas, 0.02% etilendiamintetracto rūgštis (EDTA);
5. 0,45% hipotoninis tirpalas, 0,5% natrio deoksiholinė rūgštis, 0,1% natrio dodecilsulfatas, 0.25% tert-octylphenyl-polyoksietilenas (triton X-100);
6. 0,45% hipotoninis tirpalas, 0,1% natrio deoksiholinė rūgštis, 0.25% tert-octylphenyl-polyoksietilenas (triton X-100) su 0.2% EDTA;
7. 0,45% hipotoninis tirpalas, 0,1% natrio deoksiholinė rūgštis, 0,1% natrio dodecilsulfatas, 0.2% EDTA;
8. 1% CHAPS, 0.25% tert-octylphenyl-polyoksietilenas (triton X-100).

In vitro įvertinime transplantatai nelaikyti mitybinėje terpėje, po apdoravimo vizualiai įvertinta audinių kokybė, elastingumas, vožtuvo sandarumas, po to panardinti į 10% formalino tirpalą, nusiųsti histologiniam tyrimui, ląstelinių struktūrų pašalinimo efektyvumui bei elastinių skaidulų būklei įvertinti.

Vertinant bendrą audinio būklę, branduolių buvimą audiniuose, dažyta hematoksilinu/eozinu, papildomai vertinant elastines skaidulas dažyta van Gieson būdu.

5. Nuląstelintų (deceliulizuotų) vožtuvinių transplantatų patikrinimas eksperimentiniame modelyje in vivo (N=9). (gyvūnai, nejautra, operacinė technika, tyrimai)

Vožtuviniai transplantatai gauti anksčiau aprašytu būdu ir laikyti iki implantacijos 4°C temperatūroje ne ilgiau kaip 7 dienas. Naudojimui pasirinkti du nuląstelinimo būdai, kurių metu gautas geriausias deceliulizacijos efektas.

Imituoti ksenotransplantato įsiuvimo modelį recipientais pasirinktos

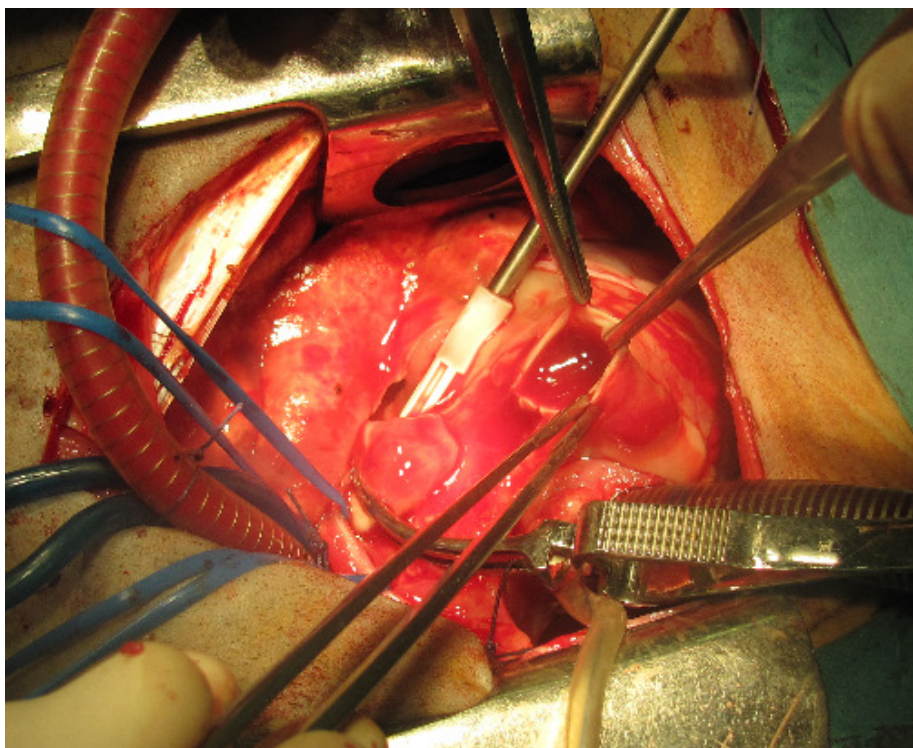
avys, kaip kitos rūšies gyvūnai, vyriškos lyties, 20–25 kg. Išpuntuota ausies vena ir suleidus diazepamą 5 mg/kg ir ketamino 10 mg/kg sukeltas slopinimas. Anestezijos indukcijai suleistas fentanilio 0,005 mg/kg, propofolio 2,5 mg/kg, tracrimumo, atlikta intubacija 7, 7,5 ar 8 dydžio vamzdeliu. Pradėta dirbtinė plaučių ventiliacija deguonies ir isoflurano mišiniu, palaikant kraujo dujų koncentraciją normos ribose. Išpuntuota v. jugularis, tolimesnė nejautra palaikyta fentaniliu, propofoliu. Infekcijos profilaktikai skirtas cefazolinas 1g operacijos pradžioje ir pooperaciniu periodu. Kitame etape punktuota ausies arba kojos arterija, invaziniam spaudimui sekti prijungti elektrokardiogramos elektrodai bei įvestas į nosiaryklę temperatūros matavimo zondas.

Operacinis plotas nuskustas bei paruoštas cutasept, padengtas steriliais apklotais. 3-ame tarpšonkauliniame tarpe kairėje pusėje atlikta torakotomija, audiniai išpreparuoti naudojant elektrokoaguliaciją. Atvėrus kairiąją pleurą, įdėtas ir išplėstas plėstuvai, plautis patrauktas stuburo link, prakirptas perikardas. Išpreparuotas aortos lankas, nusileidžiančioji aorta su diafragmos nervais. Heparinizuota (200 vv/kg) aortos lanke maždaug ties viduriu įsiuvus dvi tabokinės siūles 5/0 prolenu, įkišta tiesi 14Fr arterinė kaniulė, prijungta prie dirbtinio kraujo apytakos (DKA) aparato. Dešinysis prieširdis apsiūtas 3/0 prolenu tabokinės siūle, įkišta dviejų spindžių veninė kaniulė, prijungus prie DKA, pradėta dirbtinė apytaka. Dirbtinei kraujo apytakai palaikyti naudotas riedmeninis siurblys Gambro aparate, kraujo įsotinimui deguonimi – membraninis oksigenatorius (Dideco D905 EOS, Mirandola, Italija). Operacijos atliktos normotermijoje (37–37,5°C), perfuzijos greitis 2–2,5 l/min/m².

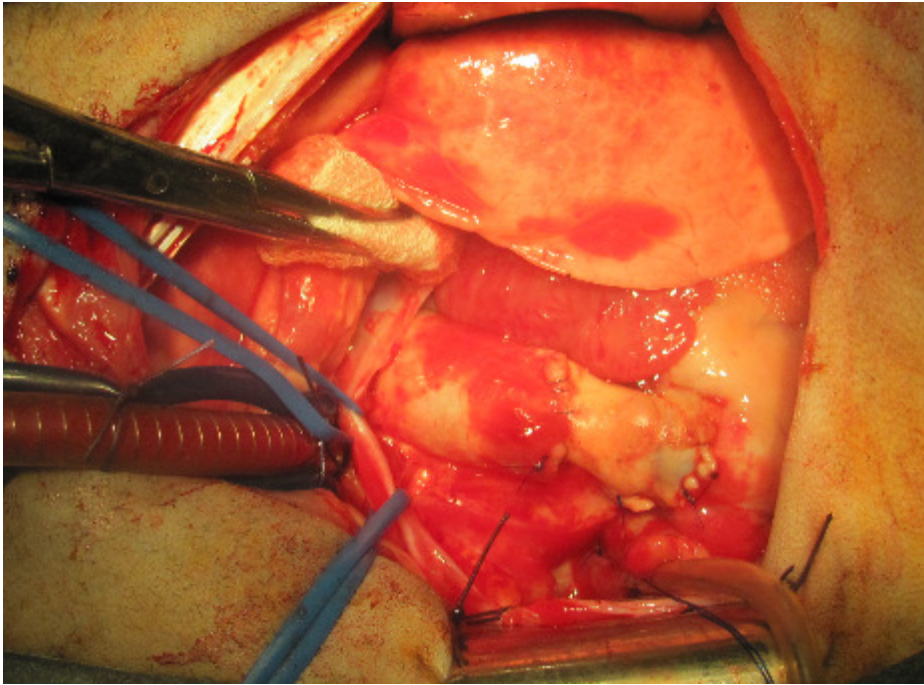
Pradėjus DKA, plaučių ventiliacija sumažinta iki minimumo. Saugant vainikines arterijas, išpreparuota plaučių arterija perkirpta skersai apie 2 cm distaliau PA vožtuvo žiedo ir nukirpta ties dešinio skilvelio raumeniu, pašalintas vožtuvas (9 pav.). Ištisine 4/0 prolenu siūle suformuota proksimalinė jungtis tarp ksenotransplantato ir dešinio skilvelio, po to sutrumpinus ir pritaikius kraujagyslių galus, ištisine 4/0 prolenu siūle suformuota distalinė jungtis (10 pav.). Papildoma hemostazė, ruošiantis baigti

DKA pradėtos nedidelių dozių eufilino ir deksametazono infuzijos, siekiant sumažinti plaučių kraujagyslių ir bronchų pasipriešinimą. Esant reikalui, hemodinamika koreguota trumpalaikė adrenalino infuzija. Sustabdžius DKA, suleistas protamino sulfatas. Įsitikinus, kad nėra kraujavimo, drenuota kairė pleuros ertmė plonu silikoniniu drenu, suartinti šonkauliai, audiniai užsiūti pasluoksniui. Gyvuliukai stebėti ir, prieš ekstubaciją įsitikinus, kad nėra kraujavimo bei oro drenavimosi, pašalintas drenas. Pirmąsias paras laikytas intensyvaus sekimo kambaryje užtikrinant nuskausminimą, stebint ir skatinant diurezę, arterinį spaudimą. Tolimesnis gydymas ir stebėjimas tęstas vivariume 45–60 dienų.

9 pav. DKA sąlygomis iškirptas plaučių arterijos vožtuvas

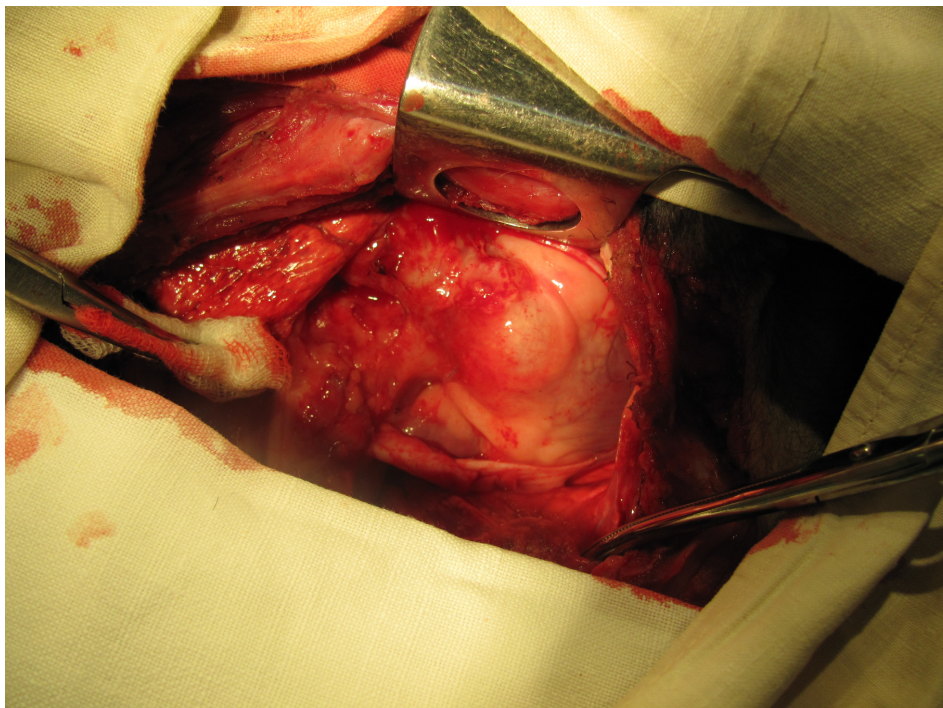


10 pav. DKA sustabdyta, transplantatas funkcionuoja gerai



Po numatyto laiko gyvuliukams atlikta pakartotinė operacija. Išpuntuota ausies vena ir suleidus benzodiazepinų sukeltas slopinimas. Vėliau suleisti anestetikai bei miorelaksantas, gyvuliukas intubuotas. Nejaunos premedikacija, indukcija ir palaikymas aprašyti anksčiau. Tęsta dirbtinė plaučių ventiliacija deguonimi, palaikant normalius kraujo dujų rodiklius. Kitame etape punktuota ausies arba kojos arterija invaziniam spaudimui sekti bei centrinė kaklo vena. Operacinis plotas nuskustas ir paruoštas antiseptiku. 3-ame tarpšonkauliniame tarpe kairėje pusėje atlikta torakotomija, audiniai ir pooperaciniai randai išpreparuoti naudojant elektrokoaguliaciją. Išpreparuota širdis, plaučių arterija ties vožtuvinio transplantato įsiuvimo vieta (11 pav.), heparinizuota (200 vv/kg).

11 pav. Išpreparuotas transplantatas po 60 dienų



Atlikta epikardinė echoskopija, įvertinta kraujotaka per vožtuvą, spaudimų gradientas. Atlikta eutanazija ir iškirptas implantatas. Pašalinti aplinkiniai audiniai, perkirptas išilgai, nufotografuotas vidinis paviršius. Audiniai iškirpti pagal anatomines sritis ir, kaip aprašyta anksčiau, tirti histologiškai bei nustatinėtas liekamojo kalcio kiekis.

5. REZULTATAI

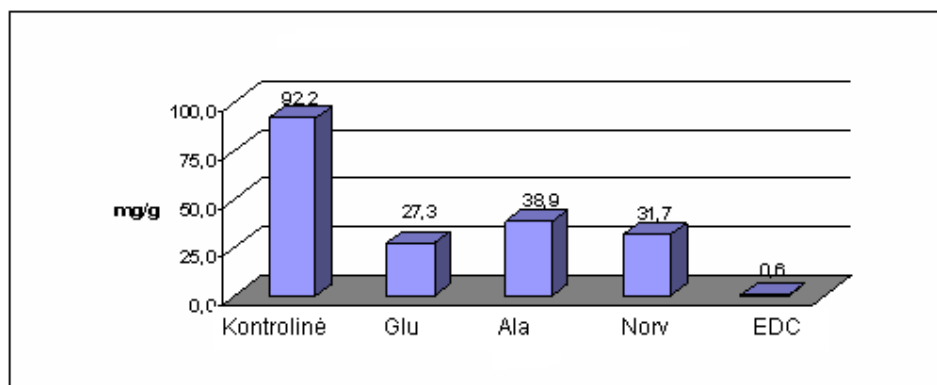
1. Cheminių medžiagų parinkimas ir aortos vožtuvo transplantato apdorojimo jomis protokolų sukūrimas.

Tiriami audiniai apdoroti chemikalais pagal numatytus protokolus, paruošti naudojimui. Histologinis tyrimas nedarytas nesitikint jokių struktūrinių pakitimų. Vizualiai audiniai pakitę, pakeitę spalvą, truputį rigidiški. Apžiūrint vožtuvą, pakitimų nepastebėta.

2. Cheminio apdorojimo efektyvumo patikrinimas eksperimentiniame modelyje be sąlyčio su kraujotakos sistema (su smulkiaisiais eksperimentiniais gyvūnais).

Iš viso atlikta 120 eksperimentų. Visos eksperimentinės žiurkės išgyveno, komplikacijų nestebėta. Kiekvienoje chemikalų grupėje buvo atlikta 20 eksperimentų, o kontrolinės grupės atlikta dar papildomai 20 eksperimentų kiekvieno metu implantuojant po 3 tiriamosios medžiagos gabaliukus, taigi implantuota po 60 gabalėlių audinio, apdoroto tokiu pat būdu. Duomenys suskirstyti pagal poveikį AoV ir AoS audiniams bei jie palyginti tarpusavyje skirtingų chemikalų grupėse. Liekamojo kalcio kiekio analizės duomenys pateikti lentelėje ir grafikuose.

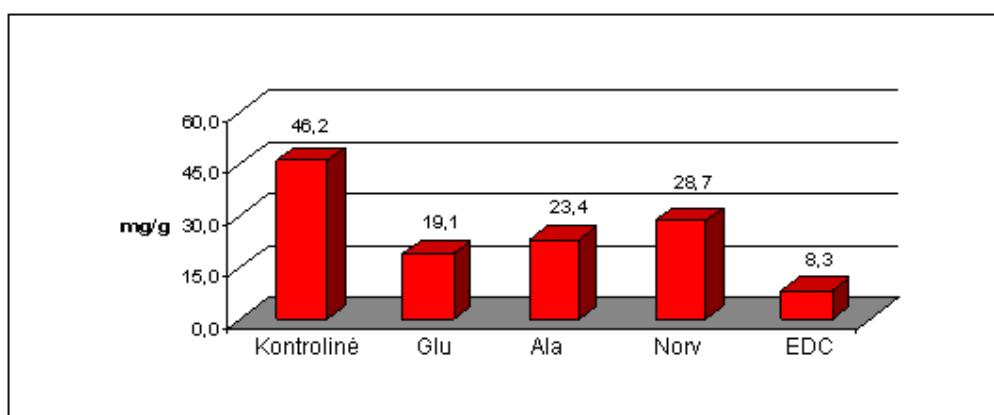
12 pav. Liekamojo kalcio kiekis aortos vožtuve



Glu – glutaraldehydas, Ala – L-alaninas, Norv – L-norvalinas, EDC – karbodiimididas, Kontrolinė – kontrolinė grupė.

Nustatėme liekamojo kalcio kiekio kitimą į paodį implantuotame aortos vožtuvo audinio gabalėlyje (12 pav.). Didžiausia kalcifikacija, kaip ir tikėtasi, yra kontrolinėje grupėje be jokio specialaus apdorojimo. Glu žymiai sumažina kalcio kiekį, tačiau apdorojant audinius tolimesniuose etapuose papildomai pridedant amino rūgščių, kalcifikavimas netgi padidėjo. Mažiausias liekamojo kalcio kiekis rastas EDC grupėje – 0,6 mg/g. Visi duomenys skiriasi statistiškai patikimai, išskyrus vidurkių skirtumą tarp amino rūgščių, kur $p > 0,05$.

13 pav. Liekamojo kalcio kiekis aortos sienelėje



Glu – glutaraldehydas, Ala – L-alaninas, Norv – L-norvalinas, EDC – karbodiimidai, Kontrolinė – kontrolinė grupė.

Tame pačiame eksperimentiniame modelyje, implantavus aortos sienelę į paodį, pastebėtas kiek mažesnis liekamojo kalcio kiekis (13 pav.). Vėl, kaip ir tikimasi, ryškiausia kalcifikacija kontrolinėje grupėje, kur transplantatai neapdoroti chemikalais. Glu žymiai sumažina kalcio kiekį, panašiai kaip ir aortos vožtuvo atveju, taip ir čia, Ala ir Norv papildomai pridėjus apdorojant audinius, rezultatas gautas blogesnis. Vienintelis ir geriausias apdorojimo būdas su EDC turėjo mažiausiai kalcio audiniuose – 8,3 mg/g. Visų grupių vidurkiai skyrėsi statistiškai patikimai, išskyrus amino rūgščių grupes, kur $p > 0,05$.

1 lentelė. Liekamojo kalcio kiekio audiniuose palyginimas

	<i>Kontrolinė grupė (N=120)</i>	<i>Glu (N=60)</i>	<i>Glu+Ala (N=60)</i>	<i>Glu+Norv (N=60)</i>	<i>EDC+NHS+Jeffamin+Ala (N=60)</i>
<i>AoV</i>	92,2±6,1	27,3±3,1	38,9±2,1 *	31,7±1,4 ●	0,6±0,1
<i>AoS</i>	46,2±5,3	19,1±0,9	23,4±1,2 *	28,7±1,8 ●	8,3±1

*AoS – aortos sienelė, AoV – aortos vožtuvas, Glu – glutaraldehydas, Ala – L-alaninas, Norv– L-norvalinas, EDC – karbodiimidai, NHS - N-hidroksisukcinimidai, * ir ●- p>0,05.*

Lyginant liekamojo kalcio kiekį tarp aortos vožtuvo ir sienelės skirtingose cheminių medžiagų grupėse, matome dėsningumus (1 lentelė). Abiejuose mėginiuose kalcifikavimas kito panašiai. Tačiau žymiai mažesnis pakitimų lygmuo matomas aortos sienos audiniuose, išskyrus EDC grupę, kur vožtuvo kalkėjimo lygmuo daugiau nei 10 kartų mažesnis už aortos sienos. Lyginant vidurkius tarp audinių grupėse, matome, kad tik amino rūgščių rodikliai nesiskyrė statistiškai patikimai.

Apibendrinant šį eksperimentinį modelį, verta pastebėti, kad EDC apdorojimas pasiteisino labiausiai ir užtikrina minimalų kalkėjimo lygį. Šiame modelyje nepasiteisino papildomo apdorojimo Ala ir Norv metodika. Glu kalkėjimo prevencija gauta stabiliai mažesnė nei kitų trijų grupių.

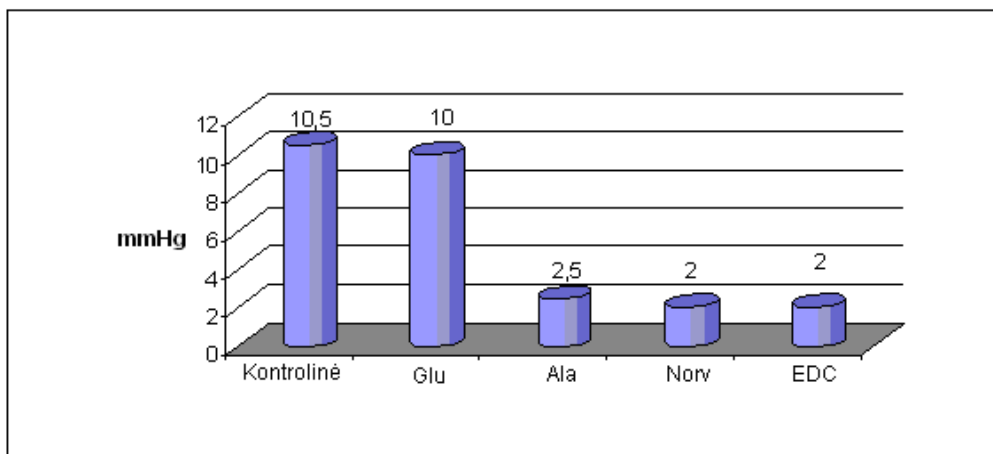
3. Cheminio apdorojimo efektyvumo patikrinimas eksperimentiniame modelyje esant tiesioginiam sąlyčiui su kraujotakos sistema (su stambiaisiais eksperimentiniais gyvūnais) (tik aortos vožtuvinio transplantato).

Atlikta 20 eksperimentų. Kiekvienoje cheminės medžiagos grupėje po 4

implantus, iš kiekvieno konduito paimti po 2 sienelės ir burių mėginiai kalcio kiekiui nustatyti, vienas – histologiniam tyrimui. Vienai kiaulei rastas retroperitoninis abscesas, kuris buvo kaudaliau transplantato įsiuvimo vietos. Apskaičiuotas vidutinis gradientas per transplantatą, nufotografuoti eksplantuoti audiniai, nustatytas liekamojo kalcio kiekis, atliktas histologinis audinių tyrimas, duomenys pateikti lentelėje, paveikslėliuose ir grafikuose.

Išpreparavus audinius, heparinizavus pirmiausia atliktas tiesioginis vidutinių spaudimų matavimas iki ir už transplantato įsiuvimo vietos, apskaičiuotas spaudimų skirtumas – vidutinis gradientas. Aortos diametras šioje vietoje apie 1,5 cm. Gauti rezultatai pateikiami grafike.

14 pav. Vidutinis gradientas per vožtuvinį transplantatą.



Glu – glutaraldehydas, Ala – L-alaninas, Norv – L-norvalinas, EDC – karbodiimididas, Kontrolinė – kontrolinė grupė.

Kaip matyti iš grafiko (14 pav.), tiek kontrolinėje, tiek Glu grupėse susidarė didžiausi vidutiniai spaudimų skirtumai, tai leidžia daryti prielaidą apie ryškiausią kalkėjimą ir aortos spindžio siaurėjimą. Likusiose grupėse gauti spaudimų skirtumai beveik lygūs, tačiau tai nėra tiesioginis įrodymas, jog nėra spindžio stenozės. Nereikia pamiršti, kad įsiuvus transplantatą į nusileidžiančiąją aortą bet kurioje vietoje, tikėtina, ksd vožtuvas nefunkcionuos, o geriausiu atveju judės laisvai spindyje. Tačiau didelė tikimybė, kad dėl stipraus arterinio spaudimo vožtuvo burės gali būti prispaustos šonuose, tokioje pozicijoje priaugusios, suirusios ar

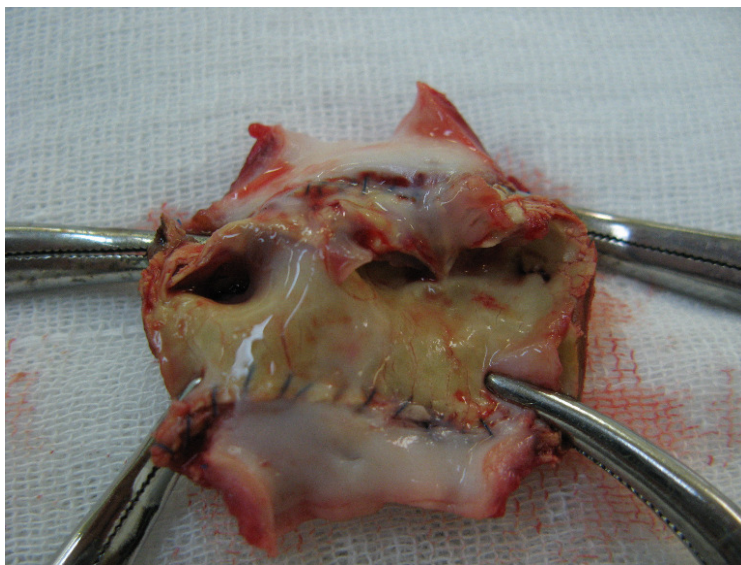
kalcinuotos, bet, palikusios atvirą aortos spindį kaip vamzdį, nesudarys stenozės.

Kitame etape, atlikus eutanaziją, iškirpti transplantatai, išilgai perpjauti ir išskleisti detalesniam apžiūrėjimui. Pavyzdžiai nufotografuoti, audiniai iškirpti pagal anatomines sritis, padalinti pusiau. Viena pusė skirta histologiniam, kita – liekamojo kalcio kieki tyrimui. Histologinio tyrimo metu taikytas von Kossa dažymas, kuris parodo kalcio intarpus kaip juodus taškus. Mikroskopuota šviesos mikroskopu 40 kartų didinimu.

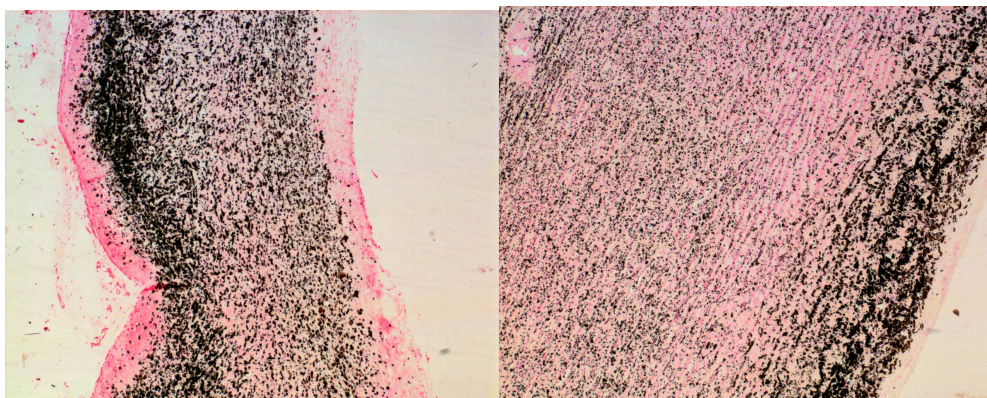
Gauti rezultatai pateikiami pagal chemikalų grupes, iliustruojant mikro- ir makronuotraukomis.

Kontrolinė grupė

15 pav. Makroskopinis transplantato vaizdas



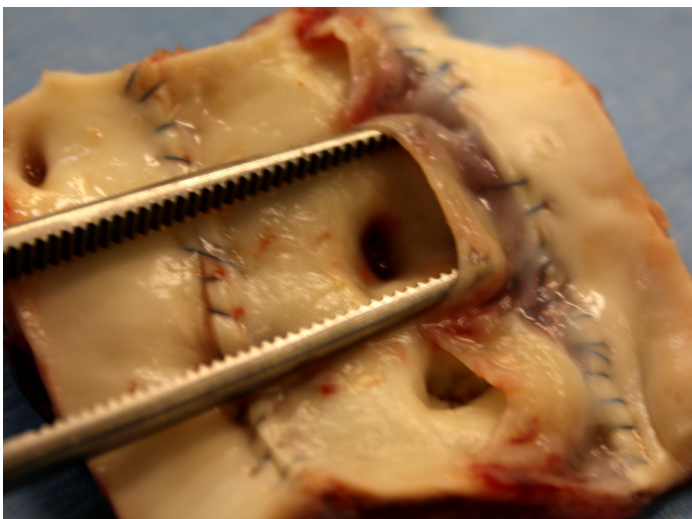
16 pav. Aortos vožtuvo ir sienos histologinis tyrimas von Kossa 40x



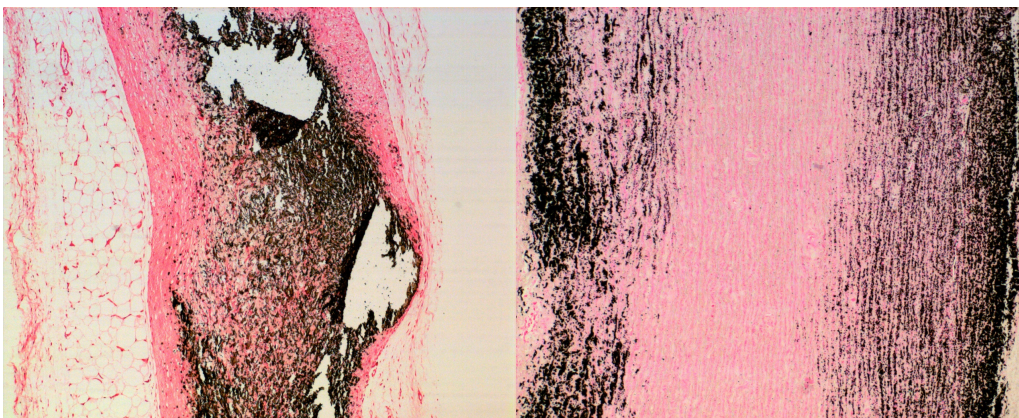
Įvertinus makrovaizdą ir histologinį tyrimą, galima tik patvirtinti, kad neapdoroti audiniai kalcifikuoja labiausiai. Matome labai pakitusią transplantato sienelę, pritrauktas, suragėjusias, nejudrias bures, kurios kalkėdamos traukiasi uždarydamos spindį (15 pav.). Histologinio tyrimo vaizduose matyti kalcio intarpų (juodi taškeliai) pilna ir AoS, ir AoV visame plotyje: tiek paviršiuje, tiek viduriniame sluoksnyje (16 pav.). Abu vaizdai patvirtina didelės apimties kalkėjimą.

Glutaraldehido grupė

17 pav. Makroskopinis transplantato vaizdas



18 pav. Aortos vožtuvo ir sienos histologinis tyrimas von Kossa 40x

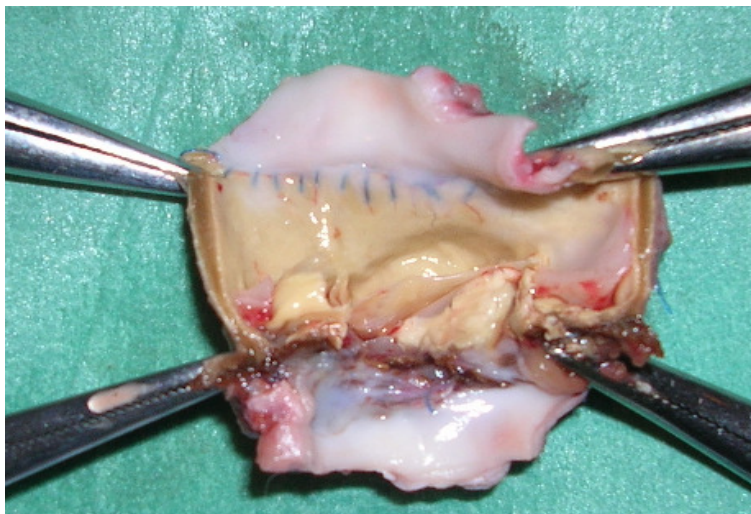


Makropreparato fotonuotraukoje, taip pat kaip ir neapuoštų audinių grupėje, Glu apdoroto implanto sienelės pakitusios, šiurkščios, rigidiškos,

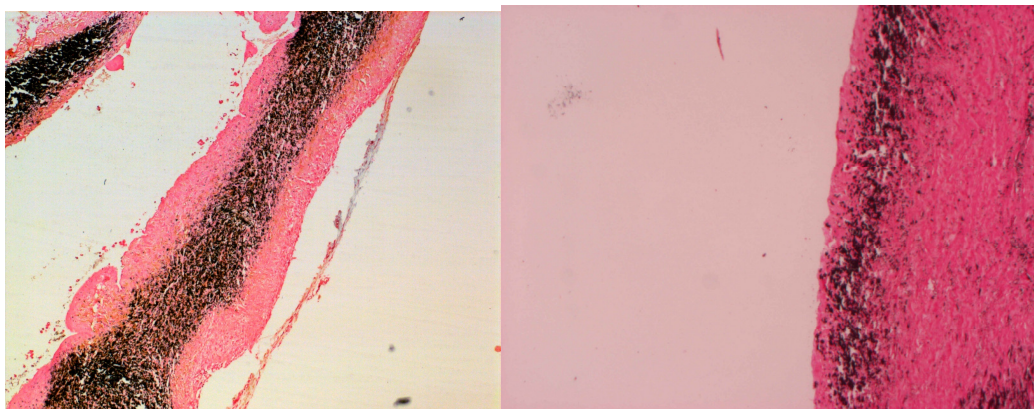
burės vos judančios, sustorėjusios (17 pav.). Histologiškai kalcio intarpų mažiau, AoV kalcinatai susikaupę labiau viduriniame sluoksnyje, kai tuo tarpu AoS – atvirkščiai (18 pav.). Įvertinus tai galime teigti, kad kalkėjimas labai žymus paviršiniuose sluoksniuose, giliai media išlieka normali galbūt dėl ribotos rezorbcijos po apdoravimo.

Glutaraldehydo ir L-alanino grupė

19 pav. Makroskopinis transplantato vaizdas



20 pav. Aortos vožtuvo ir sienos histologinis tyrimas von Kossa 40x

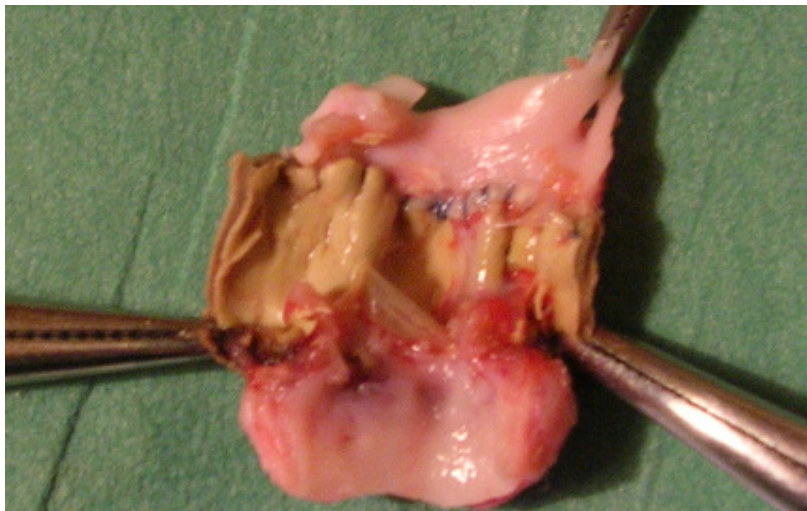


Makroskopiškai įvertinus, tampa aišku, kodėl šioje grupėje spaudimų skirtumai buvo tokie maži, preparato burės visiškai patrauktos ir užsilenkusios į vidų, neointima užaugusi iš abiejų pusių, uždengusi ir bures (19 pav.). Histologiškai burės išorinis sluoksnis kalcio intarpų neturi, tuo tarpu vidurinis sluoksnis gausiai sukaupęs kalcio. Galima preliminariai teigti, kad šis

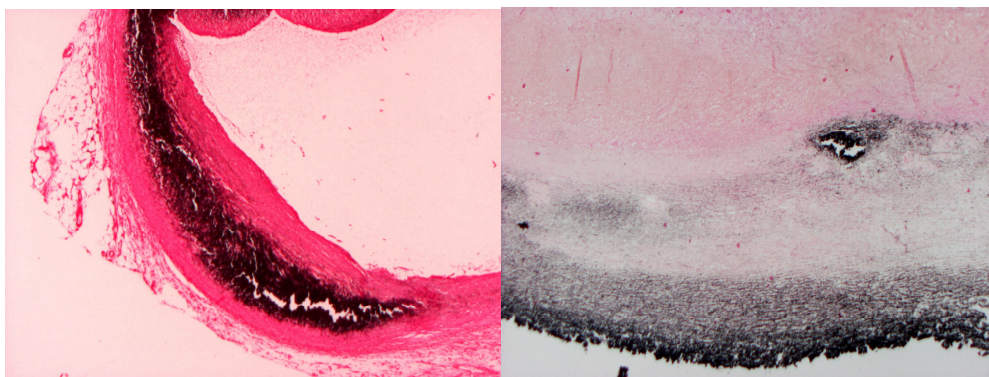
apdoravimo tirpalas burės veikia labiau paviršutiniškai, o AoS priešingai – vidinėje dalyje kalcio nėra, tik paviršiuje.

Glutaraldehydo ir L-norvalino grupė

21 pav. Makroskopinis transplantato vaizdas



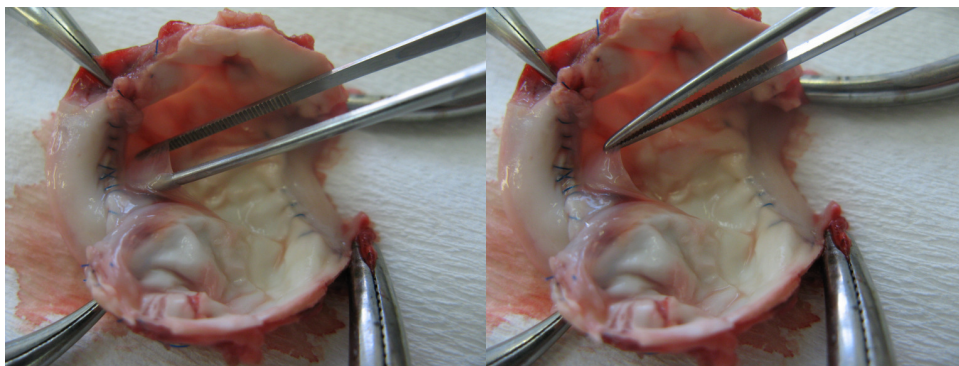
22 pav. Aortos vožtuvo ir sienos histologinis tyrimas von Kossa 40x



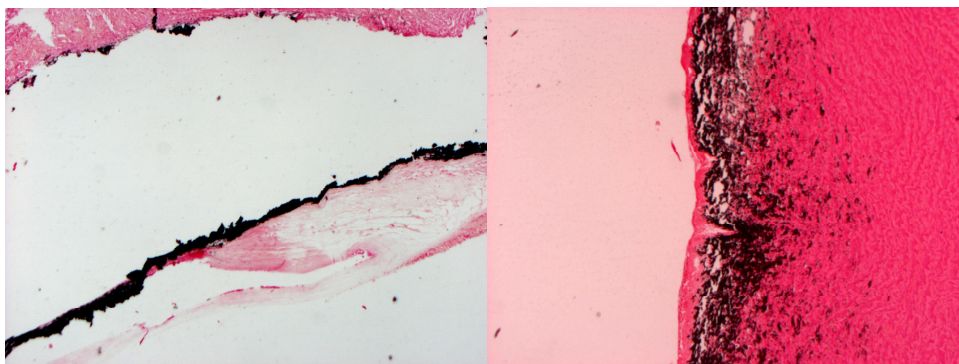
Vertinant Norv grupę, makro- ir mikrovaizdai panašūs į Ala grupę. Makroskopiškai labai pakitusi sienelė, burės pritrauktos, suirusios, nefunkciuonuoja (21 pav.), mikroskopiškai – kalcis susikaupė burės vidiniame sluoksnyje, o AoS – išoriniame (22 pav.).

Karbodiimido, N-hidroksisukciimido, poli(propileno glikol)bis 2-(aminopropil) eterio ir L-alanino grupė

23 pav. Makroskopinis transplantato vaizdas



24 pav. Aortos vožtuvo ir sienos histologinis tyrimas von Kossa 40x



Vertindami histologinį ir makro audinių vaizdą, galime teigti, kad apdorojimas šiomis medžiagomis davė geriausią efektą. Audiniai nepakitę, lankstūs, elastingi, burės permatomos, judrios, vientisos (23 pav.). Mikroskopijoje nedideli kalcio kiekiai paviršiniuose sluoksniuose tiek AoV, tiek AoS (24 pav.).

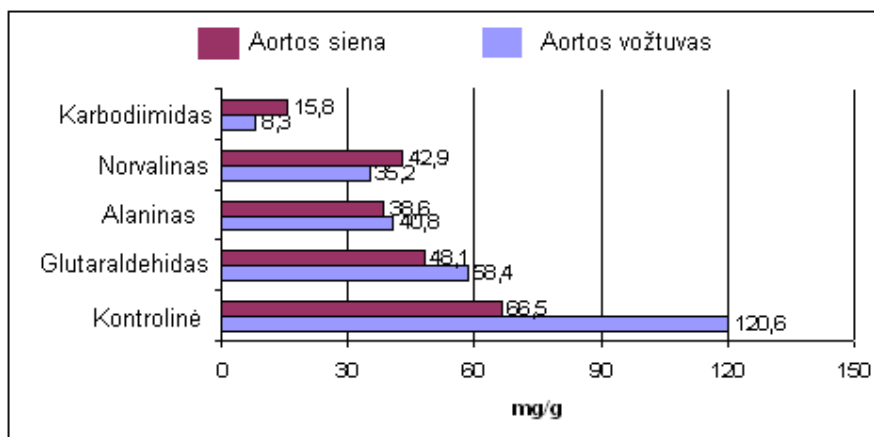
Paskutiniame etape įvertinome liekamojo kalcio kiekį spektrografškai. Gautų duomenų vidurkiai pateikti lentelėje ir grafike.

2 lentelė. Liekamojo kalcio kiekis audiniuose

	Kontrolinė grupė (N=8)	Glu (N=8)	Glu+Ala (N=8)	Glu+Norv (N=8)	EDC+NHS+Jeffamin+Ala (N=8)
AoV	120,6±9,2	58,4±4,2	40,8±2,6 *	35,2±1,9 ●	8,3±0,5
AoS	66,5±4,8	48,1±5,4	38,6±4,1 *	42,9±2,4 ●	15,8±0,8

AoS – aortos sienelė, AoV – aortos vožtuvas, Glu – glutaraldehidas, Ala – L-alaninas, Norv– L-norvalinas, EDC – karbodiimididas, NHS – N-hidroksisukcinimididas, * ir ●- $p > 0,05$

25 pav. Liekamojo kalcio kiekis aortos sienelėje ir vožtuve



Gauti rezultatai visiškai sutampa su kitų iki tol atliktų tyrimų duomenimis. Blogiausiai apsaugota ir labiausiai pažeista kalcio yra grupė be jokio apdoravimo, šie implantai sukaupe daugiausia kalcio, turėjo reikšmingiausią susiaurėjimą, gradiento padidėjimą ir tiek mikro- tiek makrovaizduose visame plote matomi pakitimai. Lyginant bures su siena, skirtumas beveik dvigubas (25 pav. ir 2 lentelė).

Liekamojo kalcio kiekis Glu grupėje žymiai mažesnis, tačiau pakitimai taip pat ryškūs ir koreliuojantys tarpusavyje (25 pav. ir 2 lentelė). Sukaupto kalcio kiekis atspindi transplantato disfunkciją. Lyginant AoV su AoS, burėse vėlgi kalckėjimas didesnis.

Ala ir Norv grupėse, kaip ir iki tol darytuose kitų eksperimentų tyrimuose, vyrauja kalckėjimas (25 pav. ir 2 lentelė). Kalcio sankaupos labai pažeidė struktūras, galima teigti, kad Ao spindžio stenozavimas buvo abiem atvejais reikšmingas. Taip pat abiejose grupėse vidiniai sienelių sluoksniai buvo geriau apsaugoti nei burių.

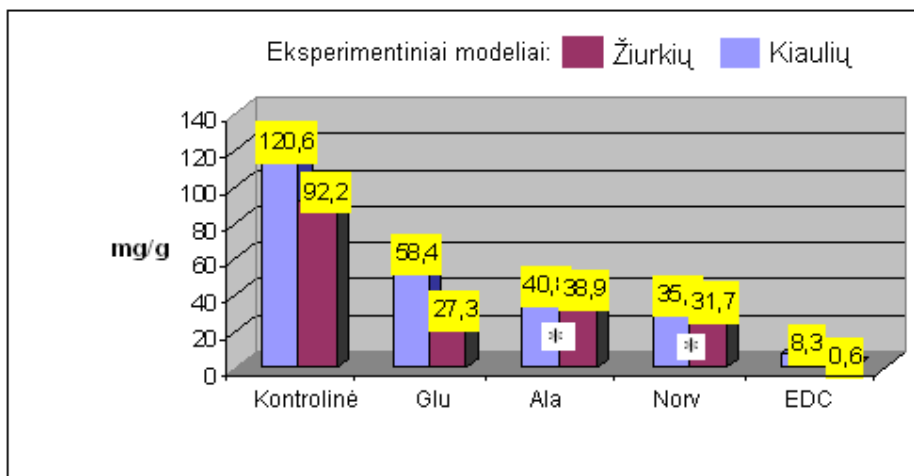
Susumavus visus duomenis, šiame eksperimentiniame modelyje EDC apdoravimo cheminės medžiagos labiausiai apsaugojo implantatą nuo kalcinavimo, suirimo. Audiniai išlaikė natyvinę struktūrą ir funkciją ir mažiausiai sukaupe kalcio (25 pav. ir 2 lentelė).

Vertinant liekamojo kalcio kiekį tarp audinių skirtingų chemikalų grupėse, statistiškai patikimai nesiskyrė tik amino rūgščių rezultatai, kur $p > 0,05$.

Liekamojo kalcio kiekio palyginimas tarp skirtingų eksperimentinių modelių

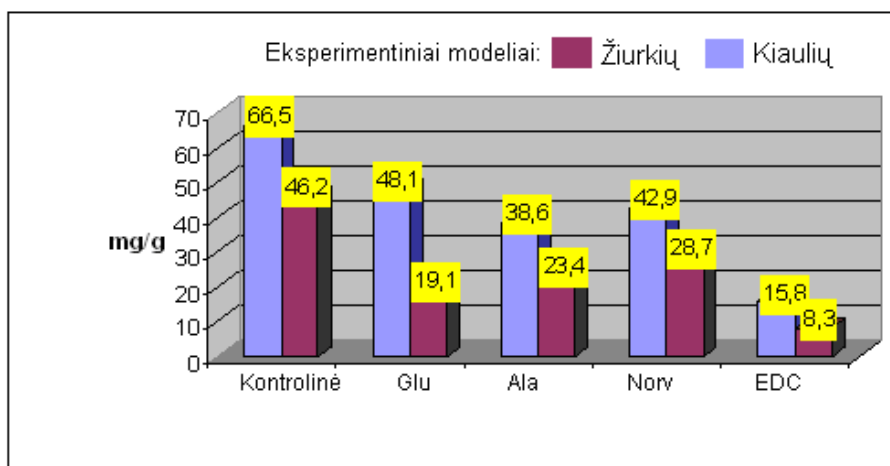
Atlikus du skirtingus eksperimentus su chemine dekalcifikacija, įdomu palyginti duomenis tarp modelių, kaip kaupė kalcį AoS ir AoV skirtingų chemikalų grupėse. Duomenys pavaizduoti paveikslėliuose pagal audinių rūšį.

*26 pav. Dviejų eksperimentinių modelių (žiurkės – raudona spalva ir kiaulės – mėlyna spalva) palyginimas, įvertinant liekamojo kalcio kiekį aortos vožtuve. *- $p > 0,05$*



Aortos vožtuvas labiau kalkėjo kiaušės eksperimentiniame modelyje. Tai matyti visose chemikalų grupėse. Taip pat pastebimas proporcingas kalcio kiekio mažėjimas keičiantis apdorojimo protokolui. Blogiausi rezultatai stebimi kontrolinėje ir Glu grupėse, mažiausiai intarpų sukaupė EDC (26 pav.).

27 pav. Dviejų eksperimentinių modelių (žiurkės – raudona spalva ir kiaušės – mėlyna spalva) palyginimas, įvertinant liekamojo kalcio kiekį aortos sienoje



Vertinant skirtumus aortos sienoje, pastebimos tos pačios tendencijos, tačiau kalcifikavimo lygmuo beveik per pusę mažesnis kai kuriose grupėse. Žiurkių eksperimentiniame modelyje kalcio kiekiai reikšmingai mažesni vertinant abu audinių mėginius (27 pav.). Tikriausiai tai paaiškinama santykiu su kraujotakos sistema, o kartu aktyvesnis uždegimas ir tiesioginis sąlytis su imunine sistema.

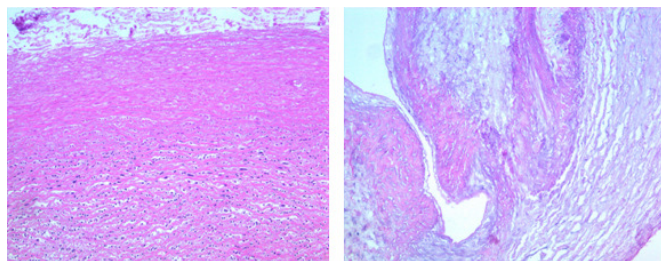
4. Aortos ir plaučių arterijos vožtuvinių transplantatų apdorojimo detergentais ir kitomis medžiagomis protokolų sukūrimas ir taikymas in vitro, pašalinant ląstelines struktūras (deceliulizacija).

Eksperimentai atlikti tiriant 8 skirtingus deceliulizacijos protokolus. Iš jų 6 originalūs, 2 atkartoti, norint įsitikinti fermentų efektyvumu. Kiekvienam protokolui naudoti 3 aortos ir 3 plaučių arterijos vožtuviniai konduitai.

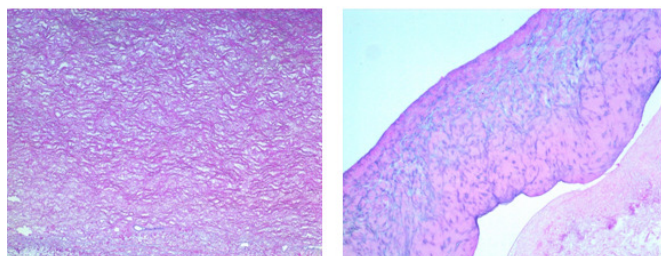
Tiriamoji medžiaga buvo paimta iš skirtingų kiaušių. Trumpai apžvelgsime kiekvieno protokolo rezultatus su histologinių tyrimų fotografijomis. Nepavykus deceliulizacijai, galima matyti tamsesnius branduolius skaidulų fone.

28 pav. I protokolas: **0,1% DEO + 0,1% SDS**

Aortos siena ir vožtuvas (HEx40)

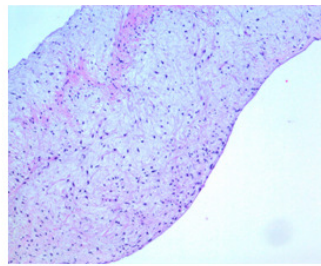
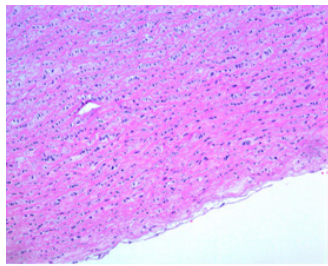


Plaučių arterijos siena ir vožtuvas(HEx40)

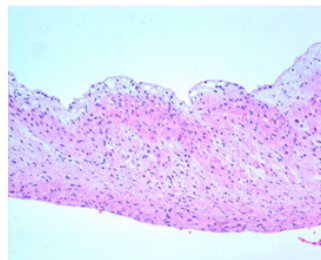
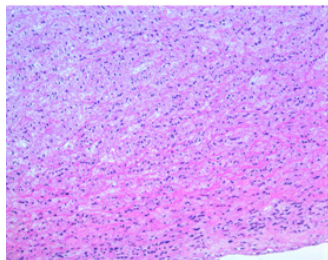


Paveikslėlyje matomos histogramos atlikus pirmą protokolą, kai naudoti du joniniai detergentai, kurių koncentracijos vienodos. Tai originalus metodas. Kaip ir tikėtasi, gauti vienas kitą papildantys poveikiai, kada efektyviai suardomos visos struktūros. Audinių pavyzdžiai rodo efektyvią deceliulizaciją beveik visuose audiniuose, išskyrus aortos sieną. Aortos sienoje deceliulizacijos pėdsakai matomi iki vidurinio sluoksnio vidurio, toliau einant išorės link matomi branduoliai (melsvi). Pakankamai storas aortos sienos audinys turėtų būti apdorojamas arba ilgiau, arba agresyviau.

29 pav. II protokolas: **0,1% DEO + 0,25% Triton 100**



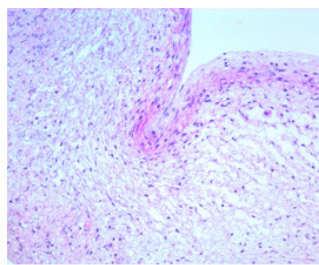
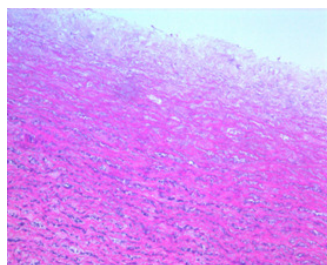
**Aortos siena ir vožtuvas
(HEx40)**



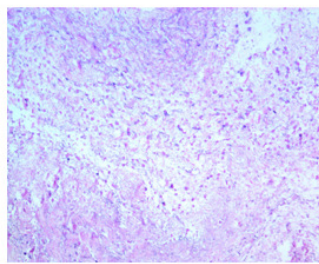
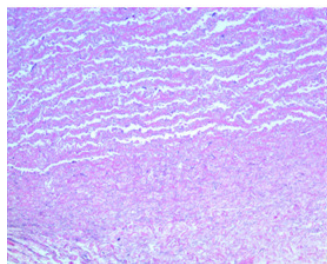
**Plaučių arterijos siena
ir vožtuvas (HEx40)**

Atlikus antrąjį originalų protokolą, kuriame naudoti detergentai iš skirtingų grupių (joninis ir nejoninis), deceliulizacija neefektyvi. Medžiagų koncentracijos nedidelės ir nejoninis triton-100 turėjo ilgiau veikiant švelniai papildyti prieš tai agresyviai ardžiusį DEO. Visuose pavyzdžiuose matomi branduoliai (mėlyni), tikėtina, kad ir kitos ląstelinės struktūros nevisai pašalintos.

30 pav. III protokolas: **0,5% Trypsin + 0,2% EDTA**



**Aortos siena ir
vožtuvas (HEx40)**



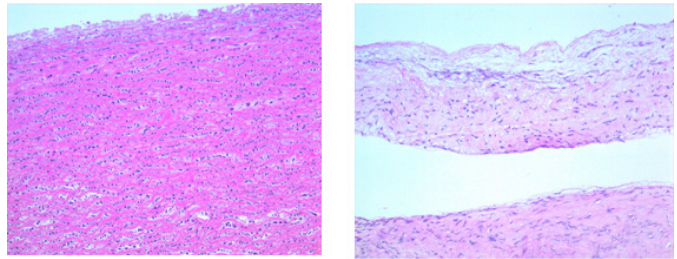
**Plaučių arterijos siena
ir vožtuvas (HEx40)**

Trečias protokolas, kartojantis kitų tyrėjų metodiką, skirtas išsiaiškinti

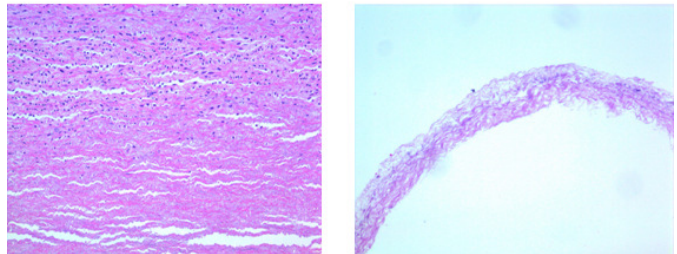
fermentų poveikį audiniams. Tai pavyzdys, kada kombinacijoje naudojamas chelatas ir fermentas. Tripsinas naudojamas nedidelės koncentracijos, tačiau per ilgą laiko tarpą suardo audinio baltymines jungtis, visai nedaug pakeisdamas ląstelių struktūrą sudėtį. Deceliulizacija neįvyko nė viename pavyzdyje, o audiniai pakenkti stipriai, gana gerai matyti fragmentavimasis. Šio proceso metu, kaip ir kituose protokoluose, naudotas išsistinis plovimas, kuris šiuo atveju nepašalino ląstelių, o tikriausiai priešingai – sulaukė fermentą audiniuose. Todėl poveikis labai paviršutinis, tik pačiuose vidiniuose endotelio sluoksniuose sienelėse, o vožtuvuose – visai nėra poveikio.

31 pav. IV protokolą: **0,05% Trypsin + 0,02% EDTA**

Aortos siena ir vožtuvas (HEx40)

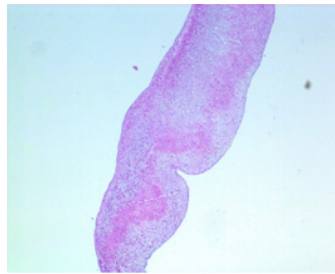
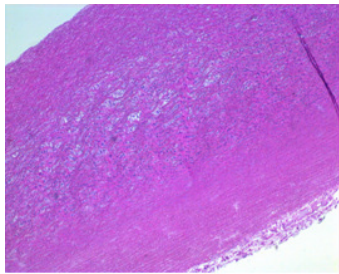


Plaučių arterijos siena ir vožtuvas (HEx40)

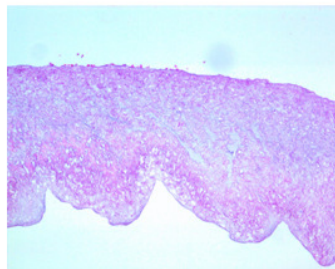
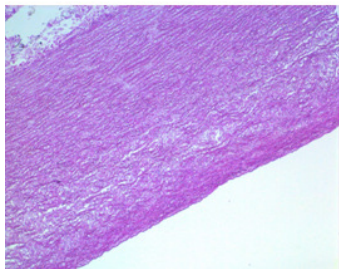


Ketvirtasis protokolą analogiškas prieš tai buvusiam, tik 10 kartų mažesnės medžiagų koncentracijos, o pati procedūra lygiai tokia pati. Kaip ir anksčiau, matome labai paviršutinį poveikį plaučių arterijos sienelėje, kur audinių sluoksniai plonesni, tuo tarpu kiti pavyzdžiai lieka nepaveikti – deceliulizacija neįvyko. Audiniai, kaip ir prieš tai, pakenkti, fragmentuojasi. Vadovaujantis histogramomis, galima teigti, kad fermentinis apdorėjimas su chelatais norimo efekto neduoda, o tik labiau žaloja pačius audinius.

32 pav. V protokolas: **Hipoton.+0,5%DEO+0,1%SDS+0,25%Triton-100**



**Aortos siena ir
vožtuvas (HEx40)**

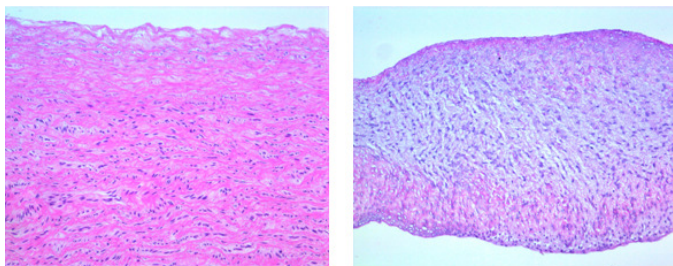


**Plaučių arterijos siena
ir vožtuvas (HEx40)**

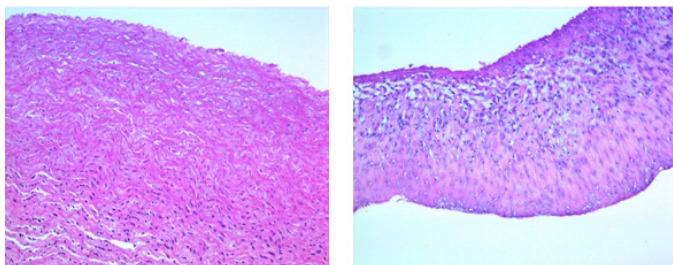
Penktasis originalus apdorojimo protokolas pasižymi įvairių medžiagų gausa, kurios skiriamos nedidelėmis koncentracijomis ir veikia pakaitomis. Iš principo, tai antrojo protokolo patobulinimas, didinant DEO koncentraciją, naudojant hipotoninį tirpalą ir triton-100 su SDS. Sudaromos sąlygos ardyti ląstelių membranas, taip palengvinant visapusišką detergentų poveikį. Audinių histogramose matomas poveikis, visiška deceliulizacija įvyko tik plaučių arterijos sienelėje, vožtuvų burėse. Nors ląstelių struktūriniai elementai smarkiai paveikti, tačiau nepakankamai gerai išplauti iš audinio gilumos. Aortos storesnė sienelė efektyviausiai paveikta tik iki vidurio, toliau matomi nesužaloti branduoliai. Šis metodas efektą davė, tačiau nepakankamą, tai galėtų būti arba dėl per mažos koncentracijos, arba dėl per trumpos apdorojimo trukmės.

33 pav. VI protokolas: **Hipoton.+0,1% DEO+0,25% Triton**

**Aortos siena ir
vožtuvas (HEx40)**



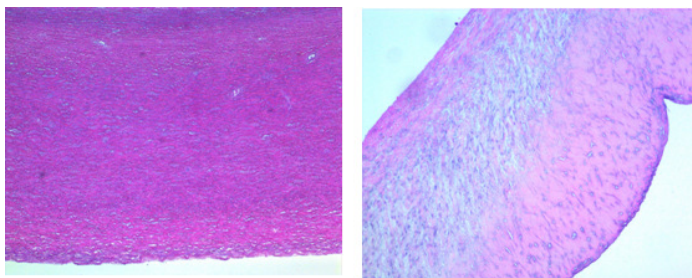
**Plaučių arterijos
siena ir vožtuvas
(HEx40)**



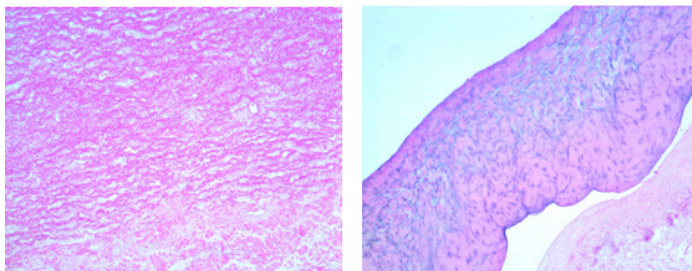
Šeštasis originalus protokolas – tai antrojo ir penktojo patobulinimas, nuo paskutinio pašalinant SDS. Tai atlikta siekiant sušvelninti žalojanti detergentų poveikį organoidams. Tačiau rezultatas neigiamas, visuose audinių pavyzdžiuose gausu nepakenktų branduolių, deceliulizacija tik paviršinė. Tikintis geresnio efekto, reikalinga ilgesnė ekspozicija detergentais ir didesnė jų koncentracija.

34 pav. VII protokolas: **Hipoton+0,1% DEO + 0,1% SDS**

**Aortos siena ir
vožtuvas (HEx40)**



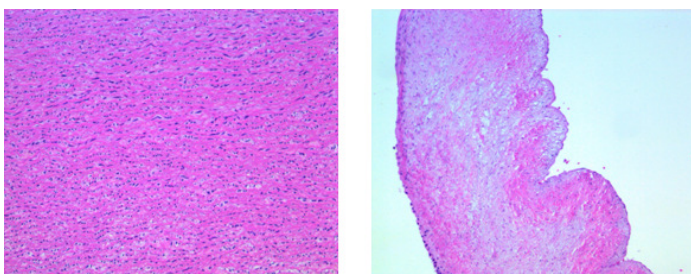
**Plaučių arterijos
siena ir vožtuvas
(HEx40)**



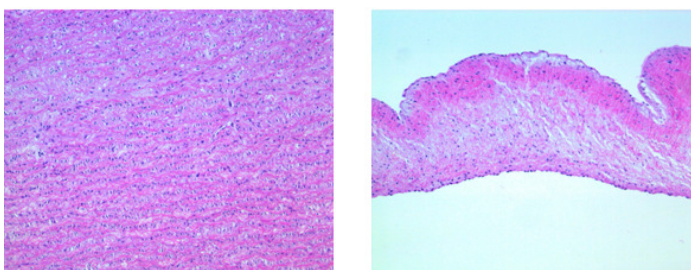
Septintas originalus audinių deceliulizacijos protokolas – tai pirmojo patobulinimas, įvedant hipotoninį tirpalą, chelatą. SDS ir DEO lieka tomis pačiomis koncentracijomis. Tai efektyviausias iš visų protokolas, visuose pavyzdžiuose visiškai deceliulizacija, branduolių nematyti, gal kiek blogiau išplauti organoidai iš aortos vožtuvo, tačiau tendencija teigiama. Teorinis tokio efekto pagrindas – subalansuotas poveikis audiniams, iš pradžių ardant išorines membranas, o toliau ir organoidus. Darome prielaidą, kad papildomai veikiant DNR-azei ir RNR-azei, visiškai suardyta tiek branduolinė, tiek nebranduolinė DNR ir RNR. Tai labai svarbu atokiam rezultatui, kalcifikacijos prevencijai.

35 pav. VIII protokolas: **1% CHAPS + 0,5% Triton 100**

Aortos siena ir vožtuvas (HEx40)



Plaučių arterijos siena ir vožtuvas (HEx40)



Aštuntasis protokolas originalus, neatkartojantis nė vieno iki tol buvusio. Naudojamas mišrus detergentas su švelnaus poveikio nejoniniu. Deja, norimas efektas nepasiektas, deceliulizacija nė viename audinio pavyzdyje neįvyko. Matomi mėlyni branduoliai. Manome, kad tai lemia per švelnus ir tausojantis poveikis audiniams.

Įvertinę visus audinių apdorojimo protokolus, matome, kad efektyviausiai veikia joninių detergentų ir kitų medžiagų kombinacijos. Net ir nedidelės koncentracijos veikia efektyviai. Tikėtina, didinant koncentraciją,

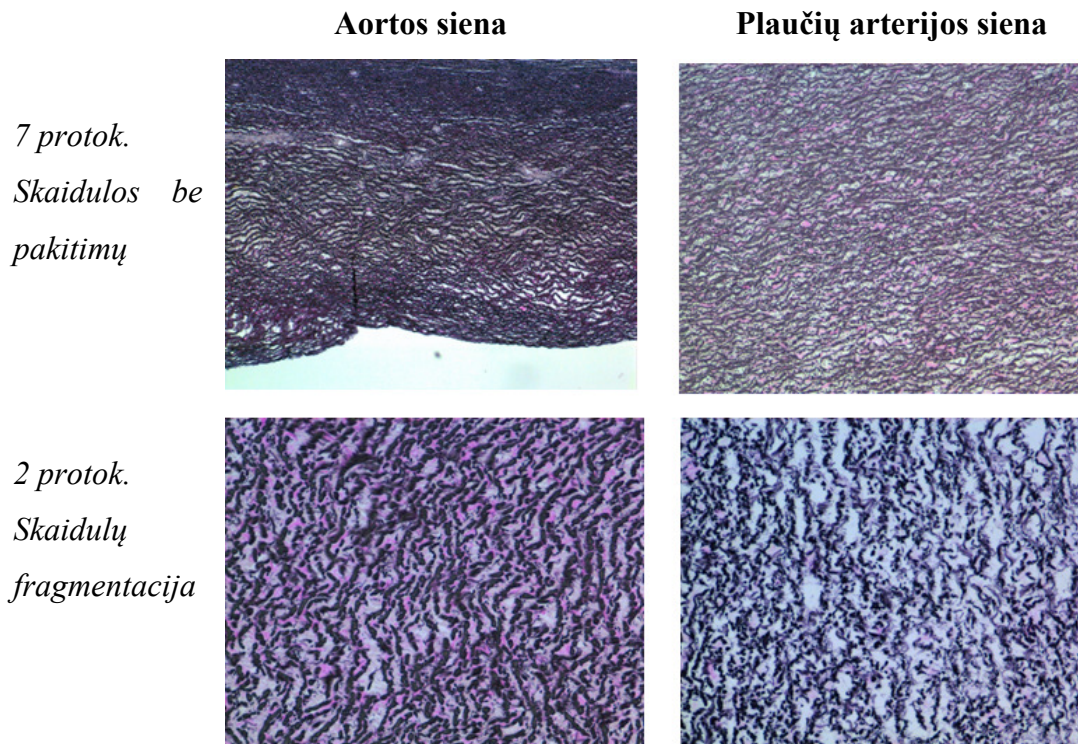
trumpės ekspozicijos trukmė, tačiau ir ECM pakenkimo tikimybė didesnė. Visi protokolai apibendrinti 3 lentelėje. Raudonai pažymėti laukeliai tų apdorojimo technologijų, kurios davė visišką deceliulizaciją. Lentelėje matome, kad geriausiai pavyksta paveikti plaučių arterijos audinius, tai neabejotinai dėl jų anatominių sienelės ypatumų.

3 lentelė. Apžvalginė deceliulizacijos efektyvumo įvertinimo schema

+ deceliulizacija visiška; +/- vietomis deceliulizacija nevisiška; - neįvyko deceliulizacija

Nr	Apdorojimo būdas	AoS	AoV	PAS	PAV
1	0,1% DEO + 0,1% SDS	-	+	+	+
2	0,1% DEO + 0,25% Triton 100	-	-	-	-
3	0,5% tripsinas + 0,2% EDTA	-	-	-	-
4	0,05% tripsinas + 0,02% EDTA	-	-	-	-
5	0,45% hipotoninis NaCl tirpalas + 0,5% DEO + 0,1% SDS + 0,25% Triton 100	-	-	+	-
6	0,45% hipotoninis NaCl tirpalas + 0,1% DEO + 0,25% triton 100 + 0,2% EDTA	-	-	-	-
7	0,45% hipotoninis NaCl tirpalas + 0,1% DEO + 0,1% SDS + 0,2% EDTA	+	+/-	+	+
8	1% CHAPS + 0,25% triton 100	-	-	-	-

36 pav. Elastinių skaidulų būklė po deceliulizacijos (van Gieson x40)



Septintojo protokolo audiniai, nepaisant visiškos deceliulizacijos, turi būti vertinami skaidulų elastingumo atžvilgiu. Neturėdami galimybės tirti kolageno skaidulas, kaip ekvivalentą tyrėme elastines skaidulas. 7-o protokolo histogramose matome vientisas liniuotas elastines skaidulas, beveik visos išsidėsčiusios viena kryptimi. Tuo tarpu lygindami su 2-u protokolu, kur neįvyko deceliulizacija, matome pakenktas elastines skaidulas, fragmentaciją. Įvertinę šią informaciją, galime teigti, kad, apdorojant audinius antruoju metodu, ECM yra pakenktas taip, kad po implantacijos galimas suirimas, o esant nepakenktoms elastingoms skaiduloms, didelė tikimybė, kad struktūrinė ECM sudėtis išsaugota. Tokie audinių apdorojimo rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad eksperimente *in vivo* šis karkasas pasiteisins.

6. Nulaužtelintų (deceliulizuotų) vožtuvinių transplantatų patikrinimas eksperimentiniame modelyje *in vivo* (N=9).

Remiantis anksčiau gautais teigiamais cheminio apdorojimo ir deceliulizacijos rezultatais, toliau atlikti eksperimentai *in vivo*, naudojant

vožtuvinius konduitus, apdorotus EDC ir 7-u protokolu.

Atlikti 9 eksperimentai, po 3 implantacijas kiekvienoje grupėje, EDC apdoroti tik aortos vožtuviniai konduitai, tikintis, kad pastarieji patvaresni ir geriau atlaiko mechaninį stresą. Eksperimento metu naudota DKA, vidutinis DKA laikas $42,8 \pm 7,7$ minutės. Šis laikotarpis skaičiuojamas nuo pat DKA pradžios iki galutinio sustabdymo su simpatomimetikais ar be. Eksperimentiniai gyvūnai, kurie turėjo refrakterinį širdies silpnumą ar plautinę hipertenziją ir dėl to eksperimento metu ar po jo nugaišo – neįtraukti.

45 dienos po implantacijos įvertintas liekamojo kalcio kiekis, echoskopiskai įvertinta kraujotaka per transplantatą, makroskopinis ir mikroskopinis vaizdai.

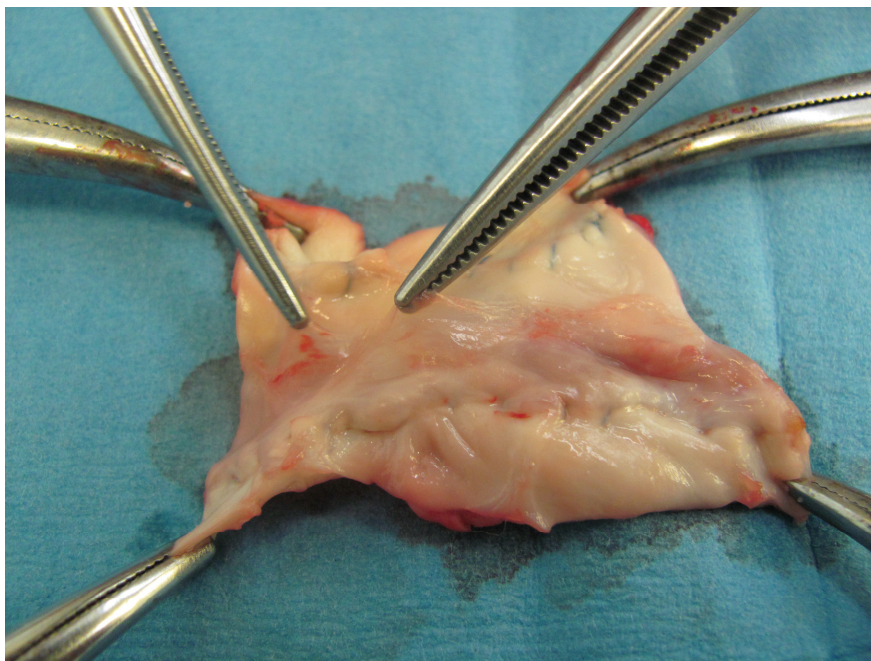
4 lentelė. Liekamojo kalcio kiekis ir spaudimų gradientai per PA vožtuvą

	Liekamojo kalcio kiekis (mg/g)	Spaudimo per vožtuvą gradientas (mmHg)
Karbodiimidu apdorotas Ao vožtuvinis transplantatas (N=3)	$12,05 \pm 0,2$	$2 \pm 0,2$
Deceliulizuotas PA vožtuvinis transplantatas (N=3)	$0,27 \pm 0,03$	$1,3 \pm 0,12$
Deceliulizuotas Ao vožtuvinis transplantatas (N=3)	$0,45 \pm 0,025$	$1,6 \pm 0,2$

Operacijų metu prieš eksplantaciją buvo atliekamos epikardinės echoskopijos, vertinama vožtuvo funkcija, vidutinis spaudimo gradientas per vožtuvą. Rezultatai parodė, jog visų trijų grupių vožtuviniai implantai turėjo nedidelį, fiziologiškai normalų gradientą. Kiek mažesni skaičiai buvo deceliulizuotų vožtuvų (4 lentelė). Tačiau vertinant liekamojo kalcio kiekį, skirtumai daug didesni, matome, kad deceliulizuotų vožtuvų

liekamojo kalcio kiekis mažesnis net 30 ar 60 kartų nei apdoroto EDC. Vertinant makroskopiškai, deceliulizuotas vožtuvas po implantacijos niekuo nesiskiria nuo natyvinio. Burės plonos, permatomos, be kalcifikavimo ar irimo židinių. Sienele elastinga, normalios spalvos, be kalcinatų (37 pav.).

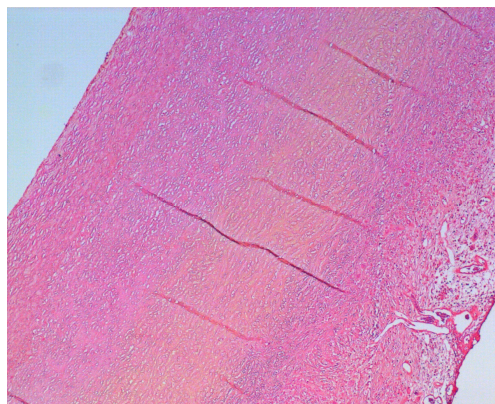
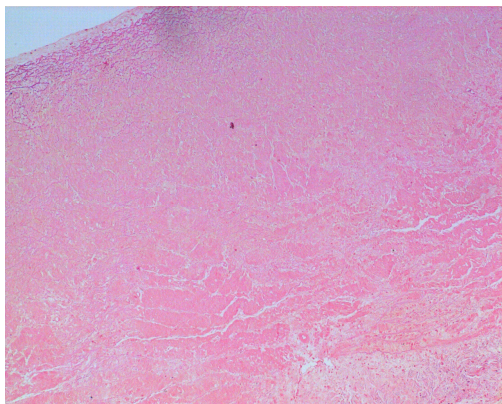
37 pav. Eksplantuotas vožtuvinis konduitas, apdorotas deceliulizacijos būdu



38 pav. Liekamasis kalcio kiekis eksplantuotame deceliulizuotame transplantate

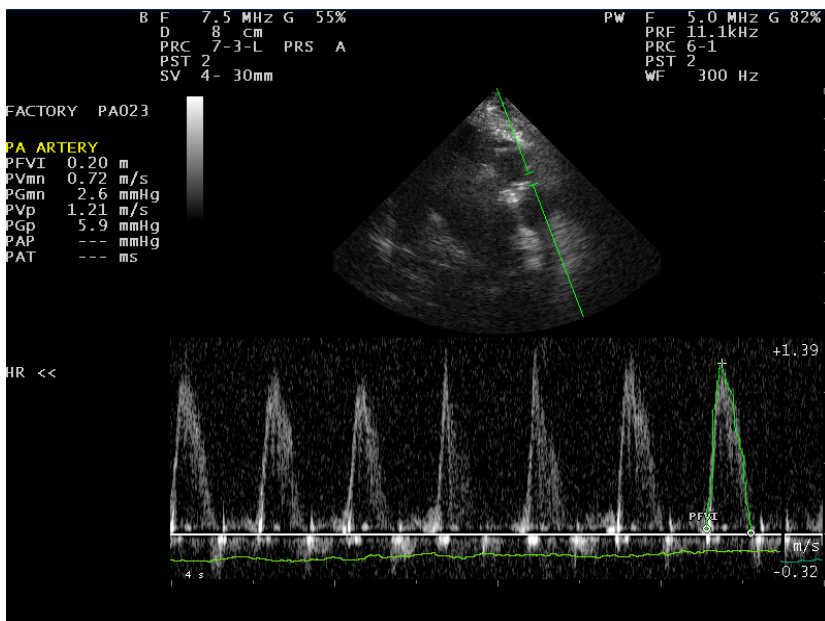
Plaučių arterija X40 von Kossa

Aorta X40 von Kossa



Histogramose, ieškant liekamojo kalcio intarpų, nematyti jokių tamsių dėmių (38 pav.) nei aortos, nei plaučių arterijos audiniuose, kaip tai buvo cheminio apdoravimo metu, kur net EDC grupėje liekamojo kalcio žymių buvo.

39 pav. Epikardinė intraoperacinė echoskopija, matuojant spaudimų gradientus ir vertinant vožtuvo funkciją

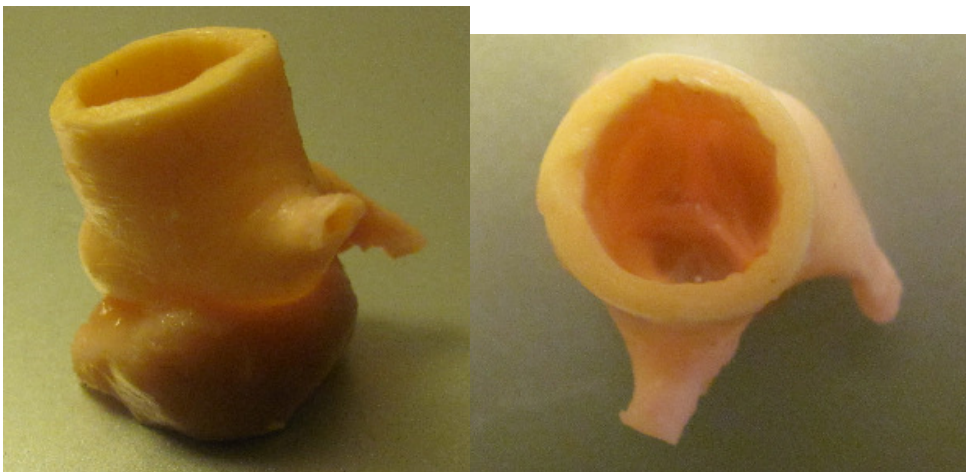


40 pav. Epikardinė intraoperacinė echoskopija, matuojant spaudimų gradientus ir vertinant vožtuvo funkciją



Vertinant vožtuvų morfologiją ir funkciją epikardinės echoskopijos metu, esminių skirtumų tarp Ao ir PA transplantatų nestebėta. Ao vožtuvo struktūros kiek labiau išreikštos. Pulsiniu dopleriu matuojant kraujotaką per transplantatą (39 pav), stenozavimo požymių nėra, kraujotakos greitis normos ribose. Burės visais atvejais elastingos, lanksčios, be sklerozės židinių. Vietomis stebėta minimali regurgitacinė tėkmė (40 pav), hemodinamiškai nereikšminga.

41 pav. Kiaulinio deceliulizuoto aortos vožtuvo transplantato pavyzdys



42 pav. Kiaulinio deceliulizuoto plaučių arterijos vožtuvo transplantato pavyzdys



Eksperimentiniame in vivo modelyje lyginant skirtingus apdorojimo metodus, geresnius rezultatus pavyko gauti deceliulizavus vožtuvinius konduitus. Pastarieji turėjo nežymiai geresnius hemodinaminius parametrus ir žymiai mažiau kaupė kalcį. O lyginant deceliulizuotus aortos ir plaučių arterijos transplantatus (41,42 pav), geresni rezultatai plaučių arterijos konduitu. Tikėtina, kad tą įtakoja anatomicinės transplantato savybės.

Ši technologija originali, patentuotina, tačiau reikalinti tolimesni išsamūs tyrimai, vertinant vidurinius ir tolimus rezultatus bei audinių ypatybes kaupiant kalcį bei vertinant hemodinamines savybes.

6. REZULTATŲ APTARIMAS

Širdies vožtuvų protezavimas biologiniu ar mechaniniu protezu išlieka pagrindiniu vožtuvų degeneracinių ligų gydymo būdu. Jau minėta anksčiau, kad abu protezų tipai turi šiokių tokių trūkumų ir privalumų. Mechaniniai – ilgaamžiai, tačiau pagaminti iš medžiagų, kurios yra svetimos žmogaus audiniams, todėl yra trombogeniški, reikia visą gyvenimą vartoti antikoagulantus, kurie gali sukelti kraujavimo komplikacijų. Šio tipo vožtuvai neauga, neregeneruoja bei netinka vaikams. Biologiniai protezai alo- ar ksenogeninės kilmės turi geresnes hemodinamines savybes, netrombogeniški, nereikia kraujo krešumą mažinančių vaistų, tačiau turi ribotą funkcionavimo trukmę, nes sukalkėja, suyra [145]. Tai sąlygota antigeninės struktūros arba apruošimo ypatumų, kai endotelinės ląstelės negali augti ant protezo vidinio paviršiaus [146]. Geriausi būtų autotransplantatai – jie gyvi, gali augti, regeneruoti, tačiau labai ribotos galimybės juos naudoti – tik Rosso operacija.

Biologiniai vožtuvai priskiriami gausiai kolageno turintiems audiniams, todėl, implantavus į svetimą organizmą kaip ksenotransplantatą, galimos atmetimo reakcijos įvairiausiomis išraiškomis dėl ant kolageno esančių antigeninių struktūrų. Siekiant to išvengti, bioprotezai apdorojami įvairiausiomis cheminėmis medžiagomis, kurios mažina antigeniškumą, stabilizuoja audinius, suformuodamos skersines jungtis tarp polimerų. Tai gali būti medžiaga su bifunkcinėmis savybėmis, kuri savo cheminėmis amino ir/ar karboksilo grupėmis sudaro skersines jungtis tarp skirtingų kolageno polimerų molekulių amino ir/ar karboksilinių grupių. Tačiau vykstant tokio tipo reakcijoms, beveik visada sudaromos vadinamosios „nulinio ilgio“ jungtys. Tai tiesioginė jungtis tarp dviejų to paties polimero kolageno molekulių ar molekulių funkcinių grupių, nesujungiant skersine jungtimi skirtingų polimerų. Tokios „nulinio ilgio“ jungtys labai pakeičia audinių savybes, pastarieji tampa kieti, praranda elastingumą. Norint to išvengti, chemiškai apdorojant naudojami „tarpininkai“ – medžiagos, kurios blokuoja galimus „nulinio

ilgio“ jungčių šaltinius, t.y. amino, karboksilines ar kitas grupes.

Biologinių vožtuvų apruošimui gali būti naudojamos įvairios cheminės medžiagos, tačiau pagrindinis tikslas – stabilizuoti kolagenines skaidulas. Dažniausiai naudojamas glutaraldehidas. Atliktos įvairios studijos tinkamiausiai koncentracijai ir apruošimo mechanizmui parinkti. Nustatyta, kad geresnis efektas gaunamas naudojant mažos koncentracijos (<1 proc.) glutaraldehidą, ypač po to atliekant detoksifikaciją [147]. Kartu kaip papildomas priedas, koreguojantis kalcio apytaką, gali būti naudojama 2-a-amino oleino rūgštis. Tai mononesočioji riebioji omega 9 rūgštis, oleino rūgštis, kuri dalyvauja organizmo metabolizme, derivatas. Pastaroji labai lengvai kovalentinėmis jungtimis jungiasi prie karboksilinių grupių ir stabdo kalcio metabolizmą į audinius. Geriausiai tai vyksta vožtuvų burėse, bet ne sienelėse. Tai kombinuotas audinių cheminis apdorojimas, kurio modifikacijų sukurta daug. Kiekviena modifikacija skirta sustabdyti kalcio jungimąsi prie implanto, kai lieka laisvi radikalai-jungtys. Kolageno skaidulų „nulinio ilgio“ jungtys, kurių susidaro itin daug, pakeičia audinio savybes, todėl reikia blokuoti papildomas laisvas aktyvias chemines grupes.

Pastaroji kombinacija taikoma biologinių vožtuvų gamyboje. Vertinant bioprotezų funkciją atokiu laikotarpiu, matomi geri rezultatai, tik 10–15 procentų pacientų po 13 metų nuo implantacijos prireikė pakartotinės operacijos [148].

Eksperimentuose bandomos ir kitos cheminių medžiagų kombinacijos, galinčios sustabdyti vožtuvų kalkėjimą. Pavyzdžiui, prie jau minėtos kombinacijos pridėjus karbodiimidą. Literatūroje jau senai aprašytas šios medžiagos teigiamas poveikis, nurodoma, kad netgi įvairesnėse kombinacijose efektas dar geresnis [149].

Savo tyrime negalėjome ir neturėjome tikslo kartoti patentuotų technologijų, tačiau ieškojome ekvivalentiškų medžiagų su panašiomis ar geresnėmis cheminėmis savybėmis.

Glutaraldehidas pasirinktas kaip pagrindinė medžiaga

biologiniams širdies protezams apdoroti, tai paprasčiausias bifunkcines savybes turintis reagentas. Glutaraldehido molekulė jungiasi su dviejų kolageno molekulių grupėmis, naudodama savo karboksilines grupes.

Mūsų eksperimentuose naudojome mažos koncentracijos (0,1%) glutaraldehydą. Tai darėme tikėdamiesi geresnės audinių apsaugos ir pakankamo stabilizacinio efekto. Literatūroje akcentuojama, kad didelės koncentracijos (>0,625%) glutaraldehydu apdoroti audiniai kalkėja greičiau [150].

Kombinuotam apruošimui pasirinkome alaniną ir norvaliną, tai trumpųjų grandžių amino rūgštys, kurios panašiai kaip alfa amino oleino rūgštis blokuoja karboksilines grupes, skatina audinių regeneraciją, augimą. Alanino ir norvalino aktyvumui didinti pasirinkti L izomerai, kurie net praradę vandenilio atomą, sudaro stabilų, nekintantį, neaktyvų – COO⁻ radikalą. Šių medžiagų naudojimas nėra anksčiau niekur aprašytas, todėl negalime palyginti rezultatų.

Kita medžiaga kombinuotam apruošimui – karbodiimidai. Tai tirpi vandenyje cheminė medžiaga, galinti sudaryti skersines jungtis su kolageno karboksilinėmis ir amino grupėmis (iš aspartato ir glutamato rūgščių). Taip pat pasižymi gebėjimu sudaryti „nulinio ilgio“ jungtis. Siekiant išvengti tokio reiškimo, naudojama kartu su N-hidroksisukcimi-imidu (NHS), kuris stabilizuoja skersines jungtis, konvertuoja reakcijos metu susidariusią cheminę grupę O-aciliurea į karboksilo grupę, kuri gali sudaryti jungtis su laisva amino grupe. Kitas audinių „tarpininkas“ – jeffamin, ši medžiaga taip pat kaip ir NHS blokuoja „nulinio ilgio“ jungtis“. Tai nėra nauja medžiaga, eksperimentai in vivo parodė gerus rezultatus, lyginant su standartiniu Glu apdorojimu [151].

Mūsų tyrimai parodė, kad apdorojus net ir nedidelės koncentracijos glutaraldehydo tirpalu, audinius implantavus į greito metabolizmo aplinką, gaunamas ryškus kalkėjimas (1 lentelė). Nors kalkėjimas mažiau intensyvus negu audinių be apdorojimo, bet liekamojo kalcio kiekis reikšmingas. Lyginant panašų tyrimą su paodžio implantais žiurkėms [152], mūsų eksperimentiniai

rezultatai geresni, kalkėjimo lygmuo mažesnis, čia pat verta pastebėti, kad Bezuidenhout ir kt. atliktuose eksperimentuose, papildomai prie apruošimo glutaraldehidu pridėję liziną, kalkėjimo lygmenį sumažino iki 5 kartų, tuo tarpu mūsų tyrime atvirksčiai – liekamojo kalcio kiekis liko panašus arba netgi didesnis nei apruošiant tik su glutaraldehidu. Tai galima paaiškinti lizino cheminiu aktyvumu, mūsų pasirinktos amino rūgštys tikėtina nepakankamai sujungė laisvuosius radikalus, susidarė galimybė formuoti kalcio sankaupoms.

Kalkėjimo profilaktikai naudodami karbodiimidą, gavome geriausius rezultatus lyginant su kitomis medžiagomis, atliekant implantacijas į paodį. Šio tipo kombinuotame apruošime dar papildomai naudojome alaniną, tai, tikėtina, dar labiau sumažino liekamojo kalcio kiekį. Taip daryta tikintis, kad ne visada pavyksta išardyti ar blokuoti daugiau nei 50% „nulinio ilgio“ jungčių, o alaninas šiuo atveju buvo kaip galutinė blokuojanti molekulė. Tad kuo mažiau žalingų jungčių, tuo labiau išsaugojamos audinių savybės. Panašūs rezultatai gaunami ir kitų tyrėjų, kai prie karbodiimido papildomai pridėjus amino rūgštį ar riebiąją rūgštį, kalkėjimas sumažinamas [153].

Lyginant vožtuvinių transplantatų liekamojo kalcio kiekį tarp skirtingų chemikalų grupių, aortos sienelėje ir burėse, mažiausias kiekis aptinkamas po apruošimo karbodiimidu. Šioje grupėje sienelėje kalcio kiekis didesnis, nes joje daugiau kolageno, kuris kalkėja, tačiau, lyginant tarp šių audinių tipų, kalcio kiekis skiriasi statistiškai patikimai.

Kartojome eksperimentus, pakeitę eksperimentinį modelį, vožtuvinius transplantatus implantavome kiaulėms į pilvo aortą. Gavome labai panašius rezultatus kaip ir eksperimentuose su žiurkėmis. Mažiausias liekamojo kalcio kiekis rastas apruošus karbodiimidu. Atlikus histologinį audinių tyrimą, visose grupėse, išskyrus karbodiimido, gerai matomi gausūs kalcio intarpai. Histogramose jie matomi kaip juodi taškai, beveik visais atvejais užpildę burių vidų ir sienelės didžiąją dalį (15–22 pav.). Tik apruošus karbodiimidu, kalcio intarpų nedaug susikaupė paviršiuje (23–24 pav.). Dėl tokio kalcio išsidėstymo

įvyko pakitimai burėse ir, matuojant spaudimų skirtumus, rasti esminiai skirtumai kontrolinėje grupėje ir glutaraldehido apruošimo grupėje. Visi tyrimo duomenys patvirtina, kad karbodiimidu aktyvavus karboksilo grupes kolageno polimeruose, surišus jas amino grupėmis ir papildomai stabilizavus jaffaminu bei alaninu, gaunamas geras efektas. Kalkėjimas paviršutinis, vadinasi, dauguma laisvųjų radikalų surišti, kolageno skaidulos stabilizuotos, dėl to išsaugotos audinių elastinės savybės. Vieni autoriai teigia, kad kalkėjimas jaunuose organizmuose labai aktyvus ir, nepaisant apdorojimo, transplantatai kalkėja [154], kiti – priešingai, kad apdorojimas nors ir glutaraldehidu naudingas, slopina imuninį atsaką, netgi sudaro sąlygas konduitui augti [155]. Mūsų tyrimų rezultatai parodo, kad audinių apruošimas turi daug įtakos audinio savybėms ir vožtuvo funkcijoms, galimai leidžia augti ir regeneruoti audiniams. Labai svarbi cheminių medžiagų kombinacija, kuri visiškai užtikrintų audinio stabilizavimą ir laisvų karboksilo jungčių inaktyvavimą.

Kitas būdas apruošti vožtuvinius transplantatus – audinių inžinerija. Donoriniai ar ksenogeniniai širdies vožtuvai, įvairiais būdais apruošti, pašalinus ląstelinius antigenus, kurie sukelia imunines reakcijas, gali būti naudojami kaip karkasai implantacijai ar tolimesniam apauginimui ląstelėmis. Pašalinus ląstelines struktūras, gaunamas ekstraceliulinis matriksas, sudarytas iš struktūrinių baltymų, prie kurių tolimesniu etapu gali tvirtintis ląstelės. Nuląstelinimo procedūrų gali būti įvairiausių – pavyzdžiui, liofilizacija (sausas užšaldymas) [156], audinių apruošimas tripsinu [157], apruošimas detergentais [158], apruošimas įvairiais fermentais [159]. Tyrimų metu nustatyta, kad naudojant tripsiną gaunamas negrynas nuląstelinimas bei pažeidžiamas matriksas [160], tačiau kitų tyrėjų duomenimis, fermentinio apruošimo metu galima gauti visišką nuląstelinimą, išsaugant ekstraląstelinę struktūrą [161]. Atliekant tyrimus su tripsinu ne dažnai gaunamas norimas nuląstelinimo efektas, o naudojant detergentus dažniausiai deceliulizacija pavyksta ir nepažeidžiamas matriksas [162]. Dažniausia priežastis, kodėl vienu tyrimų metu pažeidžiama struktūra, kitų ne – endogeniniai fermentai,

kurių yra audiniuose. Pastaruosius aktyvavus įvairių cheminių procesų metu, gaunami struktūriniai pažeidimai. Todėl atliekant nuląstelimo procedūras būtina naudoti fermentų inhibitorius, siekiant išvengti nepageidaujamų komplikacijų [163]. Tolesniame etape, kai pašalinamos pagrindinės ląstelinės struktūros, labai svarbu iš audinių pašalinti ar suardyti DNR ir RNR. Tai atliekama pasitelkiant fermentus [164]. Taigi, audinių kokybė ir funkcionalumas po deceliulizacijos labai priklauso nuo taikyto metodo ir kryžminių jungčių, stabilizuojančių kolageno skaidulas, susidarymo. Reikia pastebėti, kad pastarieji procesai stabdo arba visai panaikina audinio galimybę augti, plėstis. Tyrimuose su avimis pastebėta aceliulinių karkasų, kurie nėra papildomai apruošti cheminėmis medžiagomis, augimas, neovaskuliarizacija, receliulizacija [165], jie išlaiko reikiamą funkcionalumą po implantacijos.

Atlikus tokio tipo biologinių vožtuvų pirmąsias implantacijas, mirštamumas ankstyvu laikotarpiu buvo iki 75% dėl imunologinių reakcijų į svetimkūnį [166]. Vis dėlto aceliulinių karkasų naudojimas kaip biologinio protezo atrodo gera perspektyva, nepaisant to, kad išlieka zoonozių ir imuninių reakcijų rizika. Tyrėjai ne tik *in vitro* ar eksperimentuose *in vivo*, tačiau ir implantuodami pacientams, gavo gerus artimus ir viduriniuosius rezultatus, naudodami nuląstelintus alotransplantatus [167]. Deja, alotransplantatų dydžių pasirinkimas (dažniau pasitaiko didesnio diametro) ir galimybė greitai gauti – riboti, o atliekant eksperimentus ir lyginant skirtingos kilmės transplantatus, geresni rezultatai gauti su ksenotransplantatais [168]. Pastarųjų privalumas – galimybė didesniais kiekiais, įvairesniais dydžiais ir greitesniu laiku paruošti. Pagrindiniai trūkumai – didesnis imunologinis atsakas dėl daugybės antigenų ir zoonozių perdavimo galimybė. Galimos imunologinės reakcijos į ksenotransplantatus plačiai ištyrinėtos Lynno ir kt. [169].

Kitas minėtas pavojus – zoonozės, tai galimybė perduoti ksenogeninės kilmės infekciją žmogui. Didžiausia tikimybė perduoti kiaulių endogeninį retrovirusą [170] ar iš jaučio audinių užkrėsti spongiformine encefalopatija

Creutzfeld-Jakobo ligos atveju. [171].

Leyh ir kt. [172] eksperimentinių tyrimų metu įrodė, kad nesant grynos deceliulizacijos, kada lieka tik apie 2% DNR, rizika perduoti infekciją sumažėja iki minimumo. Todėl labai svarbu taikyti tinkamą apruošimo metodą, leidžiantį idealiai gerai atlikti nuląstelitimą ir likusios DNR ar RNR pašalinimą.

Atrasta daug įvairių apruošimo būdų, dažniausiai taikoma kelių metodų kombinacija. Dažniausiai naudojamos medžiagos:

1) Nejoniniai detergentai – suardo riebalų-riebalų ir riebalų-baltymų jungtis, tačiau išlieka tarpbaltyminės jungtys. [173] Triton X-100 geriausiai žinoma ir dažniausiai naudojama medžiaga, puikiai suardanti branduolių struktūras, tačiau ne iki galo atlieka ląstelinių elementų suardymą transplantatų vožtuvų sienelėse [174]. Be to, netenkama gliukozaminoglikanų.

2) Joniniai detergentai – efektyviai suardo ir pašalina citoplazminius ląstelės organoidus ir branduolines struktūras [175]. Natrio dodecilcholinė rūgštis ir natrio dodecilsulfatas geriausi šios grupės atstovai. Dodecilcholinė rūgštis gerai nuląstelina širdies vožtuvus, palikdama struktūrinius matrikso elementus nepažeistus [176,177]. Panašus efektas gaunamas naudojant dodecilsulfatą, tačiau matrikso pažeidimai dažnesni, netenkama gliukozaminoglikanų, suardomas kolageno skaidulų vientisumas [178].

Mūsų tyrime naudojome triton-100 izoliuotai ar kombinacijoje su vienu ar keliais joniniais detergentais. Visi detergentai naudojami mažomis koncentracijomis, siekiant išsaugoti matriksą ir maksimaliai suardyti ląstelines struktūras. Naudodami kombinacijoje skirtingus detergentus, tikėjomės, kad skirtingomis savybėmis papildys vieni kitus. Taip pat bandėme apruošti audinius ir mišrių savybių turinčiais detergentais. Be to, nuląstelimo efektui sustiprinti naudojome hipotoninį tirpalą, tikėdamiesi, kad tai padės pirmiausiai suardyti ląsteles membrane, o vėliau likusias struktūras.

Apruošiant audinius detergentais, viena iš svarbiausių savybių yra kritinis micelių sudarymo taškas, tai tam tikra detergento koncentracija, kuriai esant sudaromos micelės ir prasideda veikimas. Kiekvienam tipui šis skaičius

skirtingas, tačiau kiekvienam tipui svarbios vis kitokios fizinės sąlygos, lemiančios šį skaičių. Joniniam tipui neturi įtakos temperatūra, tuo tarpu ne jjoniniam, keliant temperatūrą, didėja CMC. Veikimo principas detergentams bendras, kol koncentracija mažesnė CMC, molekulės laisvai plaukioja ir nusėda monosluoksniu, virš CMC molekulės sudaro micles ir netirpias medžiagas ištirpina, denatūruoja baltymus, suardo membranas. Kontroluoti šią pusiausvyrą sunku, tačiau tinkamai parinkus komponentus, gaunami geri rezultatai.

3) Chelatai – EDTA, dažniausiai naudojama medžiaga, turinti žiedinę molekulinę struktūrą su metalo jonu centre. Dažniausiai Mg^{2+} ir Ca^{2+} , kurie reikalingi ląstelėms tvirtinantis prie matrikso kolageno. Prisijungdami pastaruosius metalų jonus, chelatai pašalina ląsteles nuo paviršių.

4) Fermentai – pagrindinės medžiagos – proteazės ir nukleazės. Tripsinas – dažniausiai naudojama proteazė, suardanti peptidines baltymų jungtis. Endonukleazės ardo DNR ir RNR vidines jungtis, o egzonukleazė – terminalines jungtis, sąlygodama baltymo suirimą. Audinius apruošiant fermentais, pastarieji taip pat pažeidžia matriksą [180]. Be to, dažniausiai naudojami fermentai yra gyvulinės kilmės (jaučio), todėl egzistuoja ligų perdavimo rizika [181].

Tyrimė bandėme skirtingų koncentracijų fermentinius tirpalus (tripsino, DNR-azę, RNR-azę) su chelatais (EDTA) efektui sustiprinti. Pasirinkome skirtingas koncentracijas norėdami įvertinti jų poveikį audiniams ir kartu labiau apsaugoti matriksą, apruošiant su mažesnės koncentracijos fermentu.

Nuo 2004 m. audinių inžinerijos paruošti vožtuvai gaminami pramoniniu būdu (daugiausia – Matrix P® ir Matrix P Plus®, AutoTissue GmbH, Berlin, Germany), atlikta per 1000 implantacijų pacientams daugiau nei 5 Europos šalyse [182]. Tačiau ir šių vožtuvinių transplantatų artimi rezultatai ne visada geri – grupė chirurgų iš Vokietijos pranešė apie vožtuvų suirimą [183].

Atliekant eksperimentus *in vitro*, iš 8 apruošimo protokolų tik vienas visiškai nuląstelino plaučių arterijos ir aortos vožtuvinius transplantatus.

Efektyviausias metodas – naudojant joninius detergentus. Deceliulizacija įvyko visuose audiniuose, išskyrus aortos sieną, tuo tikslu patobulinome apdoravimo būdą, pridėdami hipotoninį tirpalą. Efektas gautas geras, ląstelinių struktūrų niekur nematyti, deceliulizacija visiška. Toks rezultatas atitinka ir kitų autorių tyrimus, kur joniniai detergentai nurodomi kaip efektyviausi [184]. Tuo tarpu vertinant visas kitas detergentų kombinacijas, efektas negautas, histogramose matomi branduoliai. Naudodami mišrių savybių detergentą, norėjome išsiaiškinti poveikį širdies vožtuvų audiniams, o efektui sustiprinti pridėjome nejoninį detergentą. Tačiau rezultatas visiškai atitiko literatūroje nurodomą, pastaroji rūšis netinkama širdies audiniams apruošti [184].

Eksperimentuodami su joniniais detergentais ir gavę visišką deceliulizaciją, taip pat turėjome įvertinti audinių elastines skaidulas, kurios, implantavus į hemodinaminę, lemtų transplantato hemodinamines savybes ir funkcionavimo trukmę. Atlikus histologinius tyrimus pavydžiuose, kur buvo visiška deceliulizacija, matomos nepažeistos elastinės skaidulos (36 pav. viršutinės histogramos). Šiuo atveju pasiteisino detergentų naudojimas mažomis koncentracijomis, siekiant išsaugoti matriksą, kai tuo tarpu naudojant tris detergentus ar didinant koncentracijas, gavome elastinių skaidulų fragmentaciją.

Siekdami patvirtinti audinių apruošimo protokolų efektyvumą, atlikome ir in vivo eksperimentus. Stebėjome vožtuvinių transplantatų funkciją ir struktūrą artimu laikotarpiu po implantacijos į plaučių arterijos vožtuvo vietą. Gauti geri rezultatai, liekamojo kalcio kiekis nedidelis, lyginant su cheminiais apruošimo metodais, netgi mažesnis. Histologinio tyrimo metu kalcio intarpų nematyti (38 pav.), o ir anatomiškai eksplantuotas vožtuvas atrodo normaliai, elastingi, nepakitę audiniai (37 pav.). Šie duomenys sutampa su kitų mokslininkų atliktais tyrimais [185,186]. Tolimesni tyrimai parodė, kad pašalinus visą antigeninį substratą, audinių antigeniškumas sumažėja, o tai lemia ir kalkėjimo tikimybės sumažėjimą [187].

Labai svarbus etapas – vožtuvo funkcijos įvertinimas, kuris atliktas pakartotinės operacijos metu. Rezultatas – matoma gera vožtuvo burių funkcija

ir nereikšmingas spaudimų skirtumas.

Lygindami du skirtingus apruošimo būdus, matome, kad geresni rezultatai gaunami nuląstelinant audinius. Sėkmingai atlikus nuląstelinimą ir antigeninių struktūrų pašalinimą, sumažinamas imunologinis atsakas, pailginama transplantato funkcionavimo trukmė. Tolimesniame etape tikslinga tirti vožtuvinių transplantatų funkciją atokiu laikotarpiu.

7. IŠVADOS

- 1. Atlikus ksenotransplantatų apdorojimą cheminėmis medžiagomis, mažiausias kalkėjimas gautas apdorojant karbodiimidu eksperimentuose ir su mažais, ir su dideliais gyvūnais.*
- 2. Ksenotransplantatų deceliulizacija gauta naudojant detergentų ir kitų medžiagų kombinaciją (0,5% hipotoninis NaCl tirpalas su 0,1% DEO, 0,1% SDS ir 0,2% EDTA). Visi kiti apdorojimo protokolai davė nepakankamą deceliulizaciją arba buvo neefektingi.*
- 3. Deceliulizacijos būdu apdoroti vožtuviniai transplantatai kalcij kaupia mažiau nei kitais būdais paruošti.*

8. LITERATŪRA:

1. Filova E, Straka F, Mirejovsky T, Masin J, Bacalova L *Tissue-Engineered Heart Valves. Physiol. Res, 2009. 58 (Suppl. 2): S141-S158.*
2. Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng ZJ, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff DC Jr, Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie P, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P. *Heart disease and stroke statistics-2006 update. A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation 2006; 113: e85-e151.*
3. Yacoub MH, Takkenberg JJ: *Will heart valve tissue engineering change the world? Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2005;2:60-61.*
4. Kulik A, Bedard P, Lam BK, Rubens FD, Hendry PJ, Masters RG, Mesana TG, Ruel M *Mechanical versus bioprosthetic valve replacement in middle-aged patients. Eur J Cardiothorac Surg. 2006 Sep;30(3):485-491.*
5. Ruel M, Kulik A, Lam BK, Rubens FD, Hendry PJ, Masters RG, Bédard P, Mesana TG. *Long-term outcomes of valve replacement with modern prostheses in young adults. Eur J Cardiothorac Surg. 2005 Mar;27(3):425-433*
6. Campos NL, Andrade RR, Silva MA. *Oral anticoagulation in carriers of mechanical heart valve prostheses: experience of ten years. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2010;25(4):457-465.*
7. Kobayashi J *Stentless aortic valve replacement: an update. Vasc Health Risk Manag. 2011;7:345-351.*
8. Thiene G, Valente M. *Anticalcification strategies to increase bioprosthetic valve durability. J Heart Valve Dis. 2011 Jan;20(1):37-44.*

9. Sutherland FW, Perry TE, Yu Y, Sherwood MC, Rabkin E, Masuda Y, Garcia GA, McLellan DL, Engelmayr GC Jr, Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE Jr. *From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. Circulation* 2005; 111: 2783-2791.
10. Park S, Kim WH, Choi SY, Kim YJ. *Removal of alpha-Gal epitopes from porcine aortic valve and pericardium using recombinant human alpha galactosidase A. J Korean Med Sci.* 2009;24(6):1126-1131.
11. Iyer K. *The Contegra bovine jugular valved conduit: Living up to expectations? Ann Pediatr Cardiol.* 2012 Jan-Jun; 5(1): 34–35.
12. Jashari R, Goffin Y, Van Hoeck B, Vanderkelen A, du Verger A, Fan Y, Holovska V, Fagu A, Brahy O. *Belgian and European experience with the European Homograft Bank (EHB) cryopreserved allograft valves.-- assessment of a 20 year activity. Acta Chir Belg.* 2010 May-Jun;110(3):280-290.
13. Dainese L, Guarino A, Burba I, Esposito G, Pompilio G, Polvani G, Rossini A. *Heart valve engineering: decellularized aortic homograft seeded with human cardiac stromal cells. J Heart Valve Dis.* 2012 Jan;21(1):125-134.
14. Chikwe J, Filsoufi F, Carpentier AF. *Prosthetic valve selection for middle-aged patients with aortic stenosis. Nat Rev Cardiol.* 2010 Dec;7(12):711-719.
15. Harken D.E.. *Heart valves: ten commandments and still counting. Ann Thorac Surg.* 1989;48, S18–19.
16. Yoganathan, A.P. “*Cardiac Valve Prostheses. The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition*” CRC press LLC, 2000.
17. Dijkman PE, Driessen-Mol A, Frese L, Hoerstrup SP, Baaijens FP. *Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. Biomaterials.* 2012 Jun;33(18):4545-4554.

18. Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng.* 2006 Dec;34(12):1799-819.
19. Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11:289-313.
20. Kim KC, Kim SH, Kim YJ. Detoxification of glutaraldehyde treated porcine pericardium using L-arginine & NABH(4). *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Apr;44(2):99-107.
21. Lim HG, Kim SH, Choi SY, Kim YJ. Anticalcification effects of decellularization, solvent, and detoxification treatment for genipin and glutaraldehyde fixation of bovine pericardium. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012 Feb;41(2):383-390.
22. Lee C, Kim SH, Choi SH, Kim YJ. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: in vitro material assessment and in vivo anticalcification effect. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011 Mar;39(3):381-387.
23. Hønge JL, Funder JA, Pedersen TB, Kronborg MB, Hasenkam JM. Degenerative processes in bioprosthetic mitral valves in juvenile pigs. *J Cardiothorac Surg.* 2011 May 15;6:72.
24. Flameng W, Jashari R, De Visscher G, Mesure L, Meuris B. Calcification of allograft and stentless xenograft valves for right ventricular outflow tract reconstruction: an experimental study in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Jun;141(6):1513-1521.
25. Tillquist MN, Maddox TM. Cardiac crossroads: deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement. *Patient Prefer Adherence.* 2011 Feb 17;5:91-99.
26. Cicha I, Ruffer A, Cesnjevar R, Glöckler M, Agaimy A, Daniel WG, Garlich CD, Dittrich S. Early obstruction of decellularized xenogenic valves in pediatric patients: involvement of inflammatory and

- fibroproliferative processes. Cardiovasc Pathol. 2011 Jul-Aug;20(4):222-231*
27. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. *Regulatory mechanisms in vascular calcification. Nat Rev Cardiol. 2010 Sep;7(9):528-536.*
28. Danilevicius CF, Lopes JB, Pereira RM. *Bone metabolism and vascular calcification. Braz J Med Biol Res. 2007 Apr;40(4):435-442.*
29. Karwowski W, Naumnik B, Szczepański M, Myśliwiec M. *The mechanism of vascular calcification - a systematic review. Med Sci Monit. 2012 Jan;18(1):RA1-11.*
30. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. Nature 2005;437:270-274.*
31. Poggianti E, Venneri L, Chubuchny V, Jambrik Z, Baroncini LA, Picano E. *Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction. J Am Coll Cardiol. 2003 Jan 1;41(1):136-141.*
32. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. *Endothelial dysfunction and vascular disease. Acta Physiol (Oxf). 2009 Jun;196(2):193-222.*
33. Kennedy JA, Hua X, Mishra K, Murphy GA, Rosenkranz AC, Horowitz JD. *Inhibition of calcifying nodule formation in cultured porcine aortic valve cells by nitric oxide donors. Eur J Pharmacol. 2009 Jan 5;602(1):28-35.*
34. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K. *Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signalling. Cardiovasc Res. 2008 Jan;77(1):221-230.*
35. Chester AH, Taylor PM. *Molecular and functional characteristics of heart valve interstitial cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007;362:1437-1443.*
36. Rattazzi M, Iop L, Faggin E, Bertacco E, Zoppellaro G, Baesso I, Puato M, Torregrossa G, Fadini GP, Agostini C, Gerosa G, Sartore S, Pauletto P. *Clones of interstitial cells from bovine aortic valve exhibit*

- different calcifying potential when exposed to endotoxin and phosphate. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Dec;28(12):2165-2172.*
37. Yip CY, Chen JH, Zhao R, Simmons CA. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Jun;29(6):936-942.*
38. El-Hamamsy I, Balachandran K, Yacoub MH, Stevens LM, Sarathchandra P, Taylor PM, Yoganathan AP, Chester AH. Endothelium-dependent regulation of the mechanical properties of aortic valve cusps. *J Am Coll Cardiol. 2009;53:1448--1455.*
39. Kaden J.J. Towards medical therapy of calcific aortic stenosis lessons from molecular biology. *Eur Heart J 2007;28:1795-1796.*
40. Xiao YT, Xiang LX and Shao JZ. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun. 2007;362:550—553.*
41. Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M and Chester AH. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. *Circulation. 2006;114:I547--I552.*
42. Gordon KJ and Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta. 2008;1782:197--228.*
43. Clark-Greuel JN, Connolly JM, Sorichillo E, Narula NR, Rapoport HS, Mohler ER III, Gorman JH III, Gorman RC and Levy RJ. Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events. *Ann Thorac Surg. 2007;83:946--953.*
44. Balachandran K, Sucusky P, Jo H and Yoganathan AP. Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenic protein-dependent manner. *Am J Pathol. 2010;177:49--57.*
45. Lu Q, Harrington EO, Jackson H, Morin N, Shannon C and Rounds S. Transforming growth factor-beta1-induced endothelial barrier dysfunction involves Smad2-dependent p38 activation and subsequent RhoA activation. *J Appl Physiol. 2006;101:375—384.*

46. Khan R and Sheppard R. *Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. Immunology. 2006;118:10—24.*
47. Hruska KA, Mathew S and Saab G. *Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. Circ Res. 2005;97:105-114.*
48. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. *Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem. 2005;280:33132-33140.*
49. Danilevicius C, Lopes J, Pereira R *Bone metabolism and vascular calcification. Braz J Med Biol Res;2007, 40(4): 435-442.*
50. Parolari A, Loardi C, Mussoni L, Cavallotti L, Camera M, Biglioli P, Tremoli E, Alamanni F. *Nonrheumatic calcific aortic stenosis: an overview from basic science to pharmacological prevention. Eur J Cardiothorac Surg. 2009; 35 (3): 493-504.*
51. Rapoport HS, Connolly JM, Fulmer J, Dai N, Murti BH, Gorman RC, Gorman JH, Alferiev I, Levy RJ. *Mechanisms of the in vivo inhibition of calcification of bioprosthetic porcine aortic valve cusps and aortic wall with triglycidylamine/mercapto bisphosphonate. Biomaterials. 2007 Feb;28(4):690-699.*
52. Onuki Y, Bhardwaj U, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. *A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. J Diabetes Sci Technol. 2008 Nov;2(6):1003-1015.*
53. Schoen FJ, Levy RJ *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. Ann Thorac Surg 2005;79:1072– 1080.*
54. Weber PA, Jouan J, Matsunaga A, Pettenazzo E, Joudinaud T, Thiene G, Duran CM. *Evidence of mitigated calcification of the Mosaic versus Hancock Standard valve xenograft in the mitral position of young sheep. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006 Nov;132(5):1137-1143.*

55. Connolly JM, Bakay MA, Alferiev IS, Gorman RC, Gorman JH 3rd, Kruth HS, Ashworth PE, Kutty JK, Schoen FJ, Bianco RW, Levy RJ. Triglycidyl amine crosslinking combined with ethanol inhibits bioprosthetic heart valve calcification. *Ann Thorac Surg.* 2011 Sep;92(3):858-865.
56. Clark JN, Ogle MF, Ashworth P, Bianco RW, Levy RJ. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminum chloride. *Ann Thorac Surg.* 2005 Mar;79(3):897-904.
57. Navarro FB, Costa FD, Mulinari LA, Pimentel GK, Roderjan JG, Vieira ED, Noronha Ld, Miyague NI. Evaluation of the biological behavior of decellularized pulmonary homografts: an experimental sheep model. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010 Jul-Sep;25(3):377-387.
58. Bezuidenhout D, Oosthuysen A, Human P, Weissenstein C, Zilla P. The effects of cross-link density and chemistry on the calcification potential of diamine-extended glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart-valve materials. *Biotechnol Appl Biochem.* 2009 Nov;54(3):133-140.
59. Sinha P, Zurakowski D, Kumar TK, He D, Rossi C, Jonas RA. Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 Jan;143(1):224-227.
60. Zilla P, Weissenstein C, Human P, Dower T, von Oppell UO. High glutaraldehyde concentrations mitigate bioprosthetic root calcification in the sheep model. *Ann Thorac Surg* 2000;70:2091-2095.
61. Soda A, Tanaka R, Saida Y, Takashima K, Hirayama T, Umezu M, Yamane Y. Hydrodynamic characteristics of porcine aortic valves cross-linked with glutaraldehyde and polyepoxy compounds. *ASAIO J.* 2009 Jan-Feb;55(1):13-18.
62. Li S, Hu S, Zhou J. Biostability and calcification resistance of valved bovine jugular veins stabilized by dye-mediated photooxidation. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2005 Aug;22(4):754-758. [Kinu

- kalba].
63. Schoen FJ. *Pathologic findings in explanted clinical bioprosthetic valves fabricated from photooxidized bovine pericardium. J Heart Valve Dis* 1998;7:174-179.
 64. Stephan S, Ball SG, Williamson M, Bax DV, Lomas A, Shuttleworth CA, Kiely CM. *Cell-matrix biology in vascular tissue engineering. J Anat.* 2006 Oct;209(4):495-502.
 65. Grimm M, Eybl E, Grabenwoger M, Griesmacher A, Losert U, Bock P, Muller MM, Wolner E. *Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. An in vitro and in vivo approach toward improvement of bioprosthetic heart valves. J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;102:195-201.
 66. Leslie-Barbick JE, Moon JJ, West JL. *Covalently-immobilized vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell tubulogenesis in poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels. J Biomater Sci Polym Ed.* 2009;20(12):1763-1779.
 67. Tedder ME, Simionescu A, Chen J, Liao J, Simionescu DT. *Assembly and testing of stem cell-seeded layered collagen constructs for heart valve tissue engineering. Tissue Eng Part A.* 2011 Jan;17(1-2):25-36.
 68. Brendel K, Duhamel RC. *Body Implants of Extracellular Matrix and Means and Methods of Making and Using Such Implants. Chicago:University Patents Inc; 1989.*
 69. Klement P, Wilson GJ, Yeager H. *Process for Preparing Biological Mammalian Implants. Toronto, Ontario, Canada: HSC Research Development Corp; 1988.*
 70. Vesely I, Noseworthy R. *Culture of human aortic fibroblasts on porcine bioprosthetic valves. Can J Cardiol.* 1992;8:65B.
 71. Courtman DW, Pereira CA, Omar S, Langdon SE, Lee JM, Wilson GJ. *Biomechanical and ultrastructural comparison of cryopreservation and a novel cellular extraction of porcine aortic valve leaflets. J Biomed Mater Res.* 1995;29:1507-1516.

72. Hilbert SL, Yanagida R, Souza J, Wolfinbarger L, Jones AL, Krueger P, Stearns G, Bert A, Hopkins RA. Prototype anionic detergent technique used to decellularize allograft valve conduits evaluated in the right ventricular outflow tract in sheep. *J Heart Valve Dis.* 2004;13:831-840.
73. Konertz W, Dohmen PM, Liu J, Beholz S, Dushe S, Posner S, Lembcke A, Erdbrugger W. Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation. *J Heart Valve Dis.* 2005; 14:78-81.
74. Dohmen PM, Costa F, Lopes SV, Yoshi S, Souza FP, Vilani R, da Costa MB, Konertz W. Results of a decellularized porcine heart valve implanted into the juvenile sheep model. *Heart Surg Forum.* 2005;8:El 00-El 04.
75. Stamm C, Khosravi A, Grabow N, Schmohl K, Treckmann N, Drechsel A, Nan M, Schmitz KP, Haubold A, Steinhoff G. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering. *Ann Thorac Surg.* 2004;78:2084-2093.
76. Schenke-Layland K, Riemann I, Opitz F, Konig K, Halbhuber KJ, Stock UA. Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. *Matrix Biol.* 2004;23:113-125.
77. Leyh RG, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofidis T, Haverich A, Mertsching H. In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:1457-1463; discussion 1463.
78. Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, Weigel G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127:399-405.
79. Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces

- leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003;126:2003-2010.*
80. Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. *Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. J Heart Valve Dis. 2002;11:463-471.*
81. Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pauletto P, Casarotto D, Marchini M, Sartore S. *Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO Project (Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Lahore Ingenioso Obtenibitur). Ann Thorac Surg. 2003;75:1274-1282.*
82. Long L, Wu C, Pan L, Qi X, Hong T. *Preparation of heart valve scaffold and cell seeding. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2004;21:610-613.*
83. Ye FL, Xu ZY, Zhang BR. *Preparation of acellularized porcine heart valve and seeding of bovine aortic endothelial cells. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2003;17:493-495.*
84. Wu X, Zhu J, Liu Y, Cao X. *Construction of bioprosthetic heart valve with viable cells. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2003;20: 750-753.*
85. Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, Hoetzenecker W, Roth G, Moser B, Boltz-Nitulescu G, Gorlitzer M, Klepetko W, Wolner E, Ankersmit HJ. *Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. Eur J Clin Invest. 2005 Jan;35(1):17-23.*
86. Hongo JL, Funder J, Hansen E, Dohmen PM, Konertz W, Hasenkam JM. *Recellularization of aortic valves in pigs. Eur J Cardiothorac Surg. 2011 Jun;39(6):829-834.*
87. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Kivelitz D, Braun JP, Pruss A, Konertz W. *Mid-term clinical results using a tissue-engineered*

- pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. Ann Thorac Surg. 2007 Sep;84(3):729-736..*
88. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Pruss A, Konertz W. Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. *Ann Thorac Surg. 2011 Oct;92(4):1308-1134.*
89. Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng. 2009;11:289-313.*
90. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials. 2011 Apr;32(12):3233-3243.*
91. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg 2005;27:566-571.*
92. Jung HJ, Vangipuram G, Fisher MB, Yang G, Hsu S, Bianchi J, Ronholdt C, Woo SL. The effects of multiple freeze-thaw cycles on the biomechanical properties of the human bone-patellar tendon-bone allograft. *J Orthop Res. 2011 Aug;29(8):1193-1198.*
93. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng 2006;12(3):519-526.*
94. Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnol Bioeng 2002;79:211-216.*
95. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta 2004; 1666:105-117.*
96. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med. 2008;14(2):213-221.*

97. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(3):525–532.
98. Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:2003-2010.
99. Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, Robinson E, Crouch K, Wolfenbarger Jr L, et al. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg* 2005;79:888-896.
100. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*. 2003;26(5):421–427.
101. Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs*. 2010;34(3):206–210.
102. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010;31(13):3590–3595.
103. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. 2010;329(5991):538–541.
104. Gui L, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(2):173–184.
105. Du L, Wu X, Pang K, Yang Y. Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. *Br J Ophthalmol*. 2011 Mar;95(3):410-414.

106. Cox B, Emili A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Protoc.* 2006;1(4):1872–1878.
107. Xu CC, Chan RW, Tirunagari N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria. *Tissue Eng.* 2007;13(3):551–566.
108. Meyer SR, Chiu B, Churchill TA, Zhu L, Lakey JR, Ross DB. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(2):254–262.
109. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials.* 2010;31(13):3590–3595.
110. Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Harasztosi C, et al. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials.* 2010;31(9):2549–2554.
111. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2007;16(5):567–573.
112. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(3):525–532.
113. Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(2):399–405.
114. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different

- decellularisation methods. Eur J Cardiothorac Surg. 2005;27(4):566–571.*
115. Yang M, Chen CZ, Wang XN, Zhu YB, Gu YJ. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;91(1):354–361.*
116. Hilbert SL, Yanagida R, Souza J, Wolfenbarger L, Jones AL, Krueger P, et al. Prototype anionic detergent technique used to decellularize allograft valve conduits evaluated in the right ventricular outflow tract in sheep. *J Heart Valve Dis 2004;13:831–840.*
117. Affonso da Costa FD, Dohmen PM, Lopes SV, Lacerda G, Pohl F, Vilani R, et al. Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep. *Artif Organs 2004;28:366-370.*
118. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater. 2009;5(1):1–13.*
119. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell. 2010;140(5):619–630.*
120. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature. 2010;464(7285):104–107.*
121. Kakkar R, Grover SR. Theoretical study of molecular recognition by Hoechst 33258 derivatives. *J Biomol Struct Dynam 2005;23:37-47.*
122. Kral T, Widerak K, Langner M, Hof M. Propidium iodide and PicoGreen as dyes for the DNA fluorescence correlation spectroscopy measurements. *J Fluoresc 2005; 15:179-183.*
123. Levy RJ, Vyavahare N, Ogle M, Ashworth P, Bianco R, Schoen FJ. Inhibition of cusp and aortic wall calcification in ethanol- and aluminum-treated bioprosthetic heart valves in sheep: background, mechanisms, and synergism. *J Heart Valve Dis 2003;12:209-16.*

124. Trantina-Yates AE, Human P, Zilla P. Detoxification on top of enhanced, diamine-extended glutaraldehyde fixation significantly reduces bioprosthetic root calcification in the sheep model. *J Heart Valve Dis* 2003;12:93-100.
125. Evaerts F, Torrianni M, van Luyn MJ, Van Wachem PB, Feijen J, Hendriks M. Reduced calcification of bioprostheses, cross-linked via an improved carbodiimide based method. *Biomaterials* 2004;25:5523-5530.
126. Flameng W, Ozaki S, Meuris B, et al. Antimineralization treatments in stentless porcine bioprostheses. An experimental study. *J Heart Valve Dis* 2001;10:489-494.
127. Meuris B, Phillips R, Moore MA, Flameng W. Porcine stentless bioprostheses: prevention of aortic wall calcification by dye-mediated photooxidation. *Artif Organs* 2003;27: 537-543.
128. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Carbodiimide treatment dramatically potentiates the anticalcific effect of alpha-amino oleic acid on glutaraldehyde-fixed aortic wall tissue. *Ann Thorac Surg* 2005;79:905-910.
129. Talman EA, Boughner DR. Effect of altered hydration on the internal shear properties of porcine aortic valve cusps. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:S375-S378.
130. Christie GW. Computer modelling of bioprosthetic heart valves. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1992;6(suppl 1):S95-S100; discussion S101.
131. Biglioli P, Spampinato N, Cannata A, Musumeci A, Parolari A, Gagliardi C, Alamanni F. Long-term outcomes of the Carpentier-Edwards pericardial valve prosthesis in the aortic position: effect of patient age. *J Heart Valve Dis.* 2004;13(suppl 1):S49-S51.
132. Schoen FJ. Pathologic findings in explanted clinical bioprosthetic valves fabricated from photooxidized bovine pericardium. *J Heart Valve Dis.* 1998;7:174-179.

133. Hilbert S, Yanagida R, Krueger P, Linthurst Jones A, Wolfenbarger L, Hopkins R. A comparison of the explant pathology findings of anionic and nonionic detergent decellularized heart valve conduits. In: Nerem RM, ed. *Cardiovascular Tissue Engineering: From Basic Biology to Cell-Based Therapies*. Hilton Head, SC: Georgia Institute of Technology; 2004:43.
134. Opitz F, Schenke-Layland K, Cohnert TU, Starcher B, Halbhuber KJ, Martin DP, Stock UA. Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo. *Cardiovasc Res*. 2004;63:719-730.
135. Ellis JT, Healy TM, Fontaine AA, Saxena R, Yoganathan AP. Velocity measurements and flow patterns within the hinge region of a Medtronic Parallel bileaflet mechanical valve with clear housing. *J Heart Valve Dis*. 1996;5:591-599.
136. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;23:1002-1006; discussion 1006.
137. Flanagan TC, Pandit A. Living artificial heart valve alternatives: a review. *Eur Cell Mater*. 2003;6:28-45; discussion 45.
138. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:113-118.
139. Taylor PM, Allen SP, Yacoub MH. Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J Heart Valve Dis*. 2000;9:150-158.
140. Delia Rocca F, Sartore S, Guidolin D, Bertiplaglia B, Gerosa G, Casarotto D, Pauletto P. Cell composition of the human pulmonary valve: a comparative study with the aortic valve-the VESALIO Project. *Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum*

- labore Ingegnoso Obtinebitur. Ann Thorac Surg. 2000;70:1594-1600.*
141. Cimini M, Rogers KA, Boughner DR. Smoothelin-positive cells in human and porcine semilunar valves. *Histochem Cell Biol.* 2003;120:307-317.
142. Heng BC, Haider H, Sim EK, Cao T, Ng SC Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovasc Res.* 2004;62:34-42.
143. Farivar RS, Filsoufi F, Adams DH Mechanisms of Gal(α)1-3Gal(β)1-4GlcNAc-R (αGal) expression on porcine valve endothelial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 306-314.
144. Sinha P, Zurakowski D, Kumar TK, Rossi D, Jonas RA Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 143(1) January 2012, 224–227.
145. Gao G, Wu YX, Grunkemeier GL, Furnary AP, Starr A. Durability of pericardial versus porcine aortic valves. *Journal of the American College of Cardiology.* 44(2) 2004, 384–388.
146. Honge JL, Funder J, Hansen E, Dohmen PM, Konertz W, Hasenkam JM. Recellularization of aortic valves in pigs. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011;39(6):829-834.
147. Kim KC, Kim SH, Kim YJ. Detoxification of Glutaraldehyde Treated Porcine Pericardium Using L-arginine & NABH(4). *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Apr;44(2):99-107.
148. Riess FC, Cramer E, Hansen L, Schiffelers S, Wahl G, Wallrath J, Winkel S, Kremer P. Clinical results of the Medtronic Mosaic porcine bioprosthesis up to 13 years. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010;37(1):145-153.
149. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Carbodiimide treatment dramatically potentiates the anticalcific effect of alpha-amino oleic acid

- on glutaraldehyde-fixed aortic wall tissue. *Ann Thorac Surg.* 2005 Mar;79(3):905-910.
150. Sinha P, Zurakowski D, Kumar TK, Rossi D, Jonas RA Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;143(1): 224–227.
151. Everaerts F, Gillissen M, Torrianni M, Zilla P, Human P, Hendriks M, Feijen J. Reduction of calcification of carbodiimide-processed heart valve tissue by prior blocking of amine groups with monoaldehydes. *J Heart Valve Dis.* 2006;15(2):269-277.
152. Bezuidenhout D, Oosthuysen A, Human P, Weissenstein C, Zilla P. The effects of cross-link density and chemistry on the calcification potential of diamine-extended glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart-valve materials. *Biotechnol Appl Biochem.* 2009;54(3):133-140.
153. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Carbodiimide treatment dramatically potentiates the anticalcific effect of alpha-amino oleic acid on glutaraldehyde-fixed aortic wall tissue. *Ann Thorac Surg.* 2005 Mar;79(3):905-910.
154. Manji RA, Zhu LF, Nijjar NK, Rayner DC, Korbitt GS, Churchill TA, Rajotte R, Koshal A, Ross DB Glutaraldehyde-Fixed Bioprosthetic Heart Valve Conduits Calcify and Fail From Xenograft Rejection. *Circulation.* 2006;114;318-327.
155. Dohmen PM, da Costa F, Holinski S, Lopes SV, Yoshi S, Reichert LH, Villani R, Posner S, Konertz W. Is There a Possibility for a Glutaraldehyde-Free Porcine Heart Valve to Grow? *Eur Surg Res* 2006;38:54–61.
156. Curttil, A., Pegg, D. E., and Wilson, A. Repopulation of freeze-dried porcine valves with human fibroblasts and endothelial cells. *Journal of heart valve disease*, 1997;6:296–306.
157. Kasimir, M. T., Rieder, E., Seebacher, G., Silberhumer, G., Wolner, E., Weigel, G., Simon, P. Comparison of different

- decellularization procedures of porcine heart valves. International journal of artificial organs.*2003;26, 421–427.
158. Kasimir, M. T., Rieder, E., Seebacher, G., Silberhumer, G., Wolner, E., Weigel, G., and Simon, P. *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. International journal of artificial organs*, 2003;26:421–427.
159. Zeltinger, J., Landeen, L. K., Alexander, H. G., Kidd, I. D., and Sibanda, B. *Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. Tissue engineering*, 2001;7:9–22.
160. Kasimir, M. T., Rieder, E., Seebacher, G., Silberhumer, G., Wolner, E., Weigel, G., and Simon, P. *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. International journal of artificial organs*, 2003;26:421–427.
161. Leyh, R. G., Wilhelmi, M., Rebe, P., Fischer, S., Kofidis, T., Haverich, A., and Mertsching, H. *In vivo repopulation of xenogeneic and allogenic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. Annals of thoracic surgery*, 2003;75:1457–1463.
162. Kasimir, M. T., Rieder, E., Seebacher, G., Silberhumer, G., Wolner, E., Weigel, G., and Simon, P. *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. International journal of artificial organs*, 2003;26:421–427.
163. Booth, C., Korossis, S. A., Wilcox, H. E., Watterson, K. G., Nearney, J. N., Fisher, J., and Ingham, E. *Tissue engineering of cardiac valve prostheses: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. Journal of heart valve disease*, 2002;11: 457–462.
164. Booth, C., Korossis, S. A., Wilcox, H. E., Watterson, K. G., Nearney, J. N., Fisher, J., and Ingham, E. *Tissue engineering of cardiac valve prostheses: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. Journal of heart valve disease*, 2002;11: 457–462.

165. Elkins, R. C., Dawson, P. E., Goldstein, S., Walsh, S. P., and Black, K. S. Decellularized human valve allografts. *Annals of thoracic surgery*, 2001;71:S428–432.
166. Simon, P., Kasimir, M. T., Seebacher, G., Weigel, G., Ullrich, R., Salzer-Muhar, U., Rieder, E., and Wolner, E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve synergraft in pediatric patients. *European journal of cardiothoracic surgery*, 2003;23:1002–1006.
167. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Kivelitz D, Braun JP, et al. Midterm clinical results using a tissueengineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during Ross procedure. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 729–736.
168. Leyh RG, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofidis T, et al. In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 1457–1463.
169. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 71: 343–354.
170. Wilson CA, Wong S, Muller J, Davidson CE, Rose TM, et al. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol* 1998; 72: 3082–3087.
171. Knight R, Collins S. Human prion disease: cause, clinical and diagnostic aspects. *Contrib Microbiol* 2001; 7:68–92.
172. Leyh RG, Wilhelmi M, Walles T, Kallenbach K, Rebe P, et al. Acellularized porcine heart valve scaffolds for heart valve tissue engineering and the risk of crossspecies transmission of porcine endogenous retrovirus. *J Thoracic Cardiovascular Surg* 2003; 126: 1000–1004.
173. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1666 (1-2): 105–117.

174. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, et al. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularization methods. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27: 566–571.
175. Gulik-Krzywicki T. Structural studies of the associations between biological membrane components. *Biochim Biophys Acta* 1975; 415: 1–28.
176. Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis* 2002; 11: 457–462.
177. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* 2003; 26: 421–427.
178. Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 399–405.
179. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, et al. Impact of decellularization of xenogenic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol* 2003; 143: 201–208.
180. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res BAppl Biomater* 2004; 71: 343–354.
181. Dohmen PM, Konertz W. Tissue-Engineered Heart Valve Scaffolds. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 15: 362–367.
182. Ruffer A, Purbojo A, Cicha I, Glöckler M, Potapov S, Dittrich S, Cesnjevar R. Early failure of xenogenous decellularised pulmonary

- valve conduits a word of caution! Eur J Cardiothorac Surg 2010;38:78-85.*
183. *Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011; 32(12): 3233–3243.*
184. *Everaerts F, Gillissen M, Torrianni M, Zilla P, Human P, Hendriks M, Feijen J. Reduction of calcification of carbodiimide-processed heart valve tissue by prior blocking of amine groups with monoaldehydes. J Heart Valve Dis. 2006 Mar;15(2):269-277.*
185. *Dohmen PM, Ozaki S, Verbeken E, Yperman J, Flameng W, Konertz W Tissue Engineering of an Auto-Xenograft Pulmonary Heart Valve Asian Cardiovasc Thorac Ann 2002;10:25-30.*
186. *Bloch O, Golde P, Dohmen PM., Posner S, Konertz W, Erdbrügger W Immune Response in Patients Receiving a Bioprosthetic Heart Valve: Lack of Response with Decellularized Valves Tissue Engineering Part A. October 2011, Vol. 17, No. 19-20: 2399-2405.*

Mokslininkai padėję atlikti mokslinį darbą:

prof. A. Kareiva,

prof. S. Tautkus,

doc. V. Žilinskas,

dr. E. Žurauskas.

Mokslinį darbą finansavo:

Vilniaus universitetas,

Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas,

Vilniaus universiteto Chemijos fakultetas,

Vilniaus širdies chirurgijos paramos fondas,

Vilniaus universiteto ligoninė Santariškių klinikos,

Inovatyvios medicinos centras,

Valstybinis patologijos centras,

Biochemijos institutas,

Lietuvos hipertenzijos draugija,

UAB „Johnson & Johnson“,

UAB „Berlin Chemie Menarini group“,

UAB „Imunolita“,

UAB „Alna“,

UAB „Fermentas“,

UAB „Lietuvos draudimas“,

Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas, projektas „Biologinių audinių, naudojamų širdies chirurgijoje, dekalifikacijos metodų palyginimas“.