

Pretensado y comportamiento mecánico del pericardio de ternera utilizado en la construcción de bioprótesis cardíacas

CARRERA A*, GARCÍA PÁEZ JM, JORGE HERRERO E, GARCÍA SESTAFE JV**, MILLÁN IJ, CORDÓN A*, MARTÍN MAESTRO M., CALERO P, TÉLLEZ G Y CASTILLO-OLIVARES JL

Clínica Puerta de Hierro, Madrid. Servicios de Cirugía Experimental y Bioestadística .

* Departamento de Mecánica Estructural y Resistencia de Materiales. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Madrid

** Universidad Nacional a Distancia, Madrid

Resumen

Este trabajo analiza las propiedades mecánicas de un tejido biológico, pericardio de bovino empleado como biomaterial en la fabricación de bioprótesis cardíacas. Para ello se sometió pericardio de ternera a un estrés de tracción, uniaxial, en escalones de carga, con retirada de dicha carga tras cada escalón. Los escalones de carga fueron de aproximadamente 2,3 y 8 MPa sucesivamente, continuándose finalmente el ensayo hasta la rotura. Se ensayaron 32 muestras, 16 tratadas con glutaraldehído como grupo de control y 16 tratadas con cloroformo/metanol. La resistencia media a rotura estuvo entre 19.14 MPa y 32.60 MPa sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las series ensayadas. Se estudio también el estrés remanente tras cada escalón de carga, siendo este constante en su valor para cada ensayo. Para un valor medio de estrés inicial de 2.14 MPa, el estrés remanente medio fue de 0.36 MPa (16.82 % del estrés inicial) muy similar al estrés máximo de trabajo descrito para un velo valvular. La aplicación de un estrés progresivo produce una disminución de la deformación con pérdida de la elasticidad, pero un comportamiento mas homogéneo del pericardio. Este hallazgo no se afectó, por la región de pericardio de donde se obtuvo la muestra o por tratamiento químico recibido. Estos ensayos permiten, mediante una recta de regresión $X_i=f(Y_{max.})$, conocer la deformación (X_i) que puede sufrir el pericardio de ternera, tras un estrés de pretensado previo ($Y_{max.}$), cuando posteriormente se le somete a un estrés.

Palabras clave: Pretensado, propiedades mecánicas, pericardio de ternera, bioprótesis, glutaraldehído, calcificación

Introducción

Las propiedades de los biomateriales que se usan como implantes son cruciales, ya que estos deben funcionar en un organismo vivo. Las válvulas de cerdo o el pericardio de ternera empleado en la construcción de válvulas cardíacas son

biomateriales que están en contacto directo con el fluido sanguíneo cuando se implantan. Su éxito esta basado en las propiedades físico-químicas de las fibras de colágeno que forman parte de estos biomateriales. Las propiedades mecánicas de los tejidos vivos, varían tras el tratamiento químico (1,2). Por ello es obligado estudiar, tras su estabilización química, su comportamiento mecánico. Este cambio depende del tipo de tratamiento, la eficiencia de los agentes químicos para el entrecruzamiento de fibras y el tiempo de exposición a dichos agentes. La forma y el ordenamiento de las fibras de colágeno, responsables de la resistencia mecánica, tras el tratamiento, afecta al comportamiento

Correspondencia:

J.M. García Páez

Clínica Puerta de Hierro .

C/ San Martín de Porres nº 4

Madrid 28035.

Email: ejorge@hpth.insalud.es

del mecánico del biomaterial.

Las prótesis biológicas son biomateriales que precisan de cualidades mecánicas (resistencia) y bioquímicas (especialmente en términos de riesgo de calcificación del tejido). Ambos aspectos deben tenerse en consideración simultáneamente si se quiere llegar a una bioprótesis fiable (3-7).

El objetivo de este estudio es determinar la conducta mecánica y la relación estrés/deformación de un biomaterial, pericardio de ternera, cuando ha sido sometido a un estrés mecánico previo, es decir pretensado.

Algunos grupos, que estudian la influencia de ciertos componentes, como los fosfolípidos, implicados en la calcificación del tejido, han comunicado que tratamientos con solventes orgánicos, que eliminan parcialmente los lípidos del tejido, pueden ser efectivos para tratar pericardio de ternera o el tejido porcino (8-11).

En el presente estudio se ha usado pericardio de ternera seleccionado, tratado químicamente con glutaraldehído, como tratamiento de control, y con cloroformo/metanol en la serie de ensayo. Estas sustancias han demostrado su capacidad para extraer los lípidos del tejido y controlar la mineralización del mismo reduciendo el depósito de calcio (12-14).

Este trabajo analiza los siguientes parámetros:

a/ el estrés de rotura a tracción tras la exposición a escalones de carga continuos y crecientes.

b/ el estrés remanente después del pretensado, tanto en las muestras tratadas con glutaraldehído, (grupo de control), como en las tratadas además con cloroformo/metanol.

c/ el comportamiento mecánico tras el estrés en escalones crecientes de carga.

Materiales y métodos

El pericardio de ternera se obtuvo de un matadero local, transportándose en suero salino a 4°C (cloruro sódico 0.9%) al laboratorio. El tejido se limpió manualmente y se seleccionaron aquellos sacos pericárdicos que presentaron un buen aspecto visual. Para el corte de las muestras para ensayo, el pericardio se abrió como se muestra en la figura 1, con el ligamento diafragmático en el centro y el ligamento esternopericárdico en la circunferencia externa. Se cortaron muestras de 12 x 2 cm con la ayuda de un molde metálico que asegura su correcta dimensión.

Los espesores fueron medidos con un

micrómetro digital Mitutoyo (Elecount serie E.A:33/8) que tiene una precisión a 20° de ± 3 micras. Las lecturas se realizaron cada 5 mm. Las muestras de pericardio que midieron menos de 0.3 mm o más de 0.7 mm de espesor en algún punto fueron rechazadas. El espesor medio aproximado fue de 0.5 mm.

El ensayo fue dividido en dos grupos de acuerdo al tratamiento que recibió: grupo de control (GA), tratado durante 24 horas con glutaraldehído al 0.625 %, en una proporción de 1:50 (p/v), en tampón fosfato al 0.1 M, pH 7.4; grupo de ensayo (C/M) tratado con cloroformo/metanol 1:4 (v/v) durante 2 horas en una proporción de 1:30 (p/v), seguido de un tratamiento con glutaraldehído similar al empleado en el grupo de control.

Para el ensayo de tracción uniaxial se preparon 32 muestras de pericardio de ternera cortadas de la forma descrita y seleccionadas por parejas contiguas, tomadas de las regiones B y C (Figura 1) según un esquema modificado de Purinya (15).

Se establecieron cuatro series de 8 muestras cada una:

1. GA-B,
2. C/M-B,
3. GA-C,
4. C/M-C.

Siendo GA: grupo control, C/M: grupo cloroformo/metanol y B y C las regiones del pericardio de donde se obtuvieron las muestras. En la tabla 1 se presentan estas series.

Todas las muestras fueron sometidas a una prueba de tracción uniaxial en escalones de carga equivalentes a un estrés aproximado de 2, 3, y 8 MPa. La carga se fijó en Kg. en la máquina de ensayo, para cada escalón, estimándose una sección teórica para las muestras de cada serie, con el fin de evitar errores en la ejecución de los ensayos. La aplicación finalmente de la sección real de cada muestra determinó el valor final del escalón de carga en MPa, variando levemente de los estimados inicialmente.

La carga se elevó a una velocidad de 0.5 cm/min hasta el nivel fijado en cada escalón, con retirada inmediata de la hasta un teórico valor cero de estrés/deformación, elevando nuevamente la carga hasta el siguiente escalón.

Finalmente todas las muestras fueron sometidas a un incremento progresivo de carga hasta su rotura.

Para estos ensayos se utilizó una máquina INSTRON TTG4, (Instron Ltd, High Wycombe, Bucks, England) capaz de registrar con exactitud

Tabla 1 Muestras ensayadas

SERIES	Nº	Serie	Región	Preparación
GA-B	8	GB ₁ ..GB ₈	B	Glutaraldehído
C/M-B	8	C/MB ₁ ..C/MB ₈	B	Glutaraldehído
GA-C	8	GC ₁ .. GC ₈	C	Cloroformo./Metanol
C/M-C	8	C/MC ₁ ..C/MC ₈	C	Cloroformo./Metanol

Ejemplo: GB₁ y MB₁, muestras pareadas**Tabla 2** Resultados a rotura tras los escalones de carga (estrés a tracción y descarga).

SERIES	MEDIA (MPa)	Desviación Típica	Rango
GA-B	32.60	7.90	19.63-42.15
C/M-B	19.14	7.69	10.90-29.89
GA-C	26.60	9.51	12.06-38.00
C/M-C	26.30	7.58	16.24-34.81

Tabla 3 Estrés remanente (MPa) tras la aplicación del primer escalón de carga (MPa). Valores medios de las series

SERIES	Estrés inicial. Media (MPa)	Rango	Estrés remanente. Media (MPa)	Rango	Estrés remanente/Estrés inicial (%)
GA-B	2.32	2.11-2.87	0.39	0.11-0.57	16.81
C/M-B	2.10	2.04-2.57	0.24	0.17-0.34	11.43
GA-C	2.19	1.78-3.26	0.49	0.34-0.51	22.37
C/M-C	1.94	1.77-2.11	0.34	0.16-0.71	17.53

las variaciones del estrés aplicado y las deformaciones producidas en las muestras. Para ello, las muestras se adaptaron a las mordazas de forma segura dejando una luz libre en cada probeta de 60 mm.

Los resultados fueron registrados gráficamente, mostrando el diagrama carga/ elongación necesario para el calculo posterior de la curva estrés/ deformación.

El estrés del pericardio se calculó teniendo en cuenta la sección media de cada muestra.

Estudio estadístico

Los resultados fueron sometidos a un estudio estadístico y a un análisis matemático. Para los ensayos hasta rotura el estadístico t de Student fue aplicado para la comparación de los valores medios de las series ensayadas.

Tabla 4 Ajustes matemáticos de las funciones estrés / deformación. Series y escalones de carga.

SERIES	a	b	R ²
GA-B			
basal	4.70	462.74	0.97
3 MPa	11.40	724.13	0.97
8 MPa	8.80	1065.18	0.99
C/M-B			
basal	28.05	371.58	0.98
3 MPa	34.09	389.02	0.97
8 MPa	31.75	703.52	0.97
GA-C			
basal	8.81	449.81	0.97
3 MPa	26.09	662.05	0.95
8 MPa	26.30	1010.19	0.99
C/M-C			
basal	12.34	156.16	0.98
3 MPa	24.88	298.50	0.97
8 MPa	20.64	723.25	0.99

Función $y = ax + bx^2$. Valores de a, b y R² en los diferentes niveles de estrés (basal, 3 MPa y 8 MPa). Basal es el escalón inicial próximo a 2MPa; “y” representa el estrés en MPa; x la deformación en tanto por uno.

Análisis matemático

La función que estableció la relación entre el estrés aplicado en MPa(y) con la deformación producida (x) en tanto por uno, se ajustó a la siguiente ecuación: $y = ax + bx^2$. La curva promedio fue obtenida para cada serie y para cada nivel de estrés.

Se estudio también la variación de la deformación (x) en función del estrés previo (escalón de carga) y del estrés aplicado (MPa). En cada muestra, para cada valor de “y” (estrés aplicado en MPa) se obtuvo la recta de regresión que establece la correlación con los valores de “x” (deformación en tanto por uno), en función del escalón de carga o estrés previo (“y” máxima aplicada previamente). Se realizaron estas correlaciones para los escalones de carga previstos (aproximadamente 2 MPa, 3 MPa y 8 MPa) y para los valores de estrés aplicados entre 0.5 y 1.70 MPa, obteniendo coeficientes de correlación “r” mayores de 0.85, para la recta $X_i = f(y_{max.})$.

De esta manera conociendo el estrés previo a que se somete una muestra (escalón de carga ó “y” máxima) y el estrés aplicado posteriormente, se puede conocer la deformación de la muestra x_i (deformación en tanto por uno).

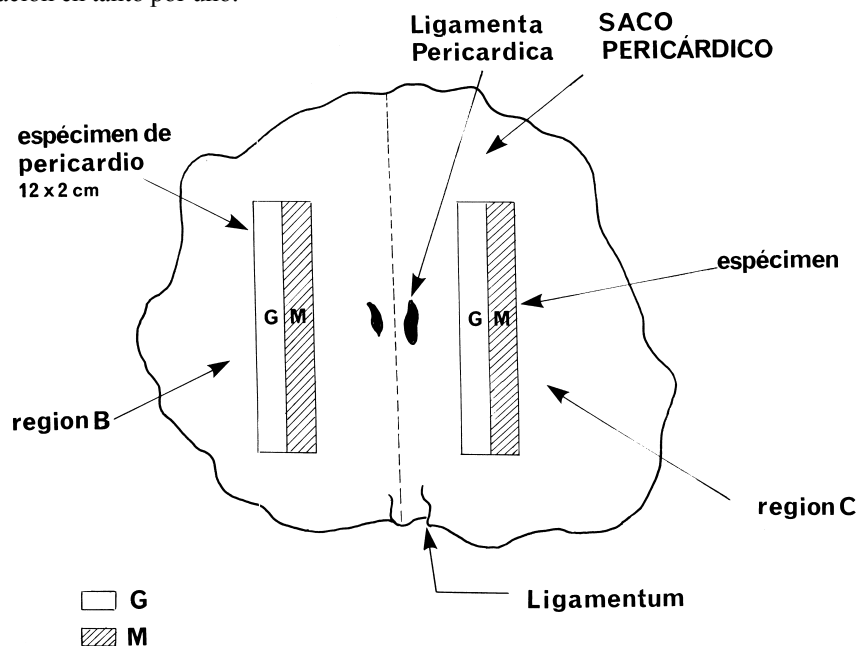


Figura 1 Obtención de las muestras de pericardio por parejas: GA, serie de control, tratada con glutaraldehído. C/M, serie tratada con cloroformo/metanol

VALORES MEDIOS DE LAS SERIES: GA-B,C/M-B,GA-C y C/M-C

Basal: 2 MPa

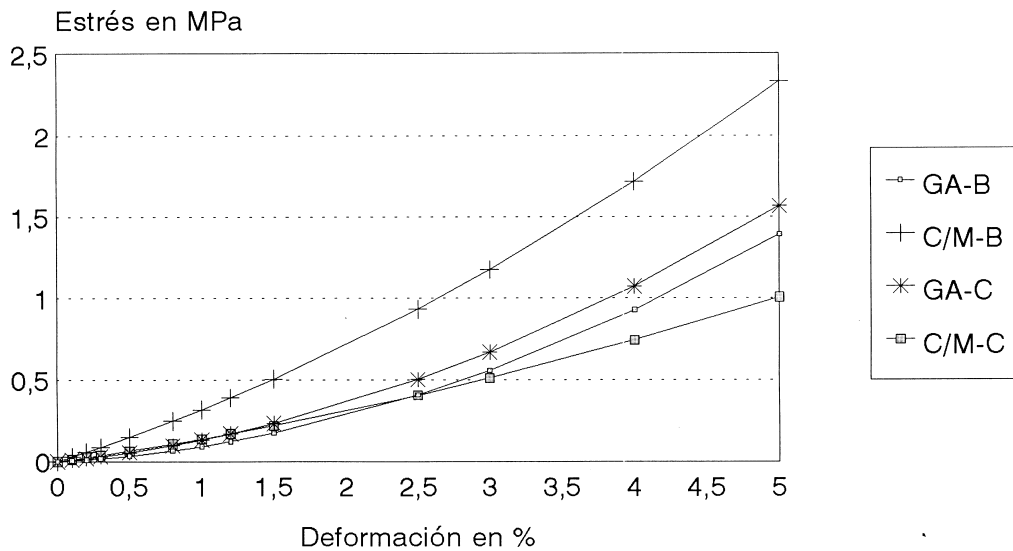


Figura 2 Curvas de estrés/deformación. Muestran el ajuste matemático ,para un escalón de carga de aproximadamente 2 MPa.(basal),hasta una deformación del 5%. Series de control tratadas con glutaraldehído: GA-B y GA-C. Series tratadas con cloroformo/metanol: C/M-B y C/M-C. B y C expresan las regiones de donde se obtuvieron las muestras.

VALORES MEDIOS DE LAS SERIES: GA-B,C/M-B,GA-C y C/M-C

Escalón de carga: 3 MPa

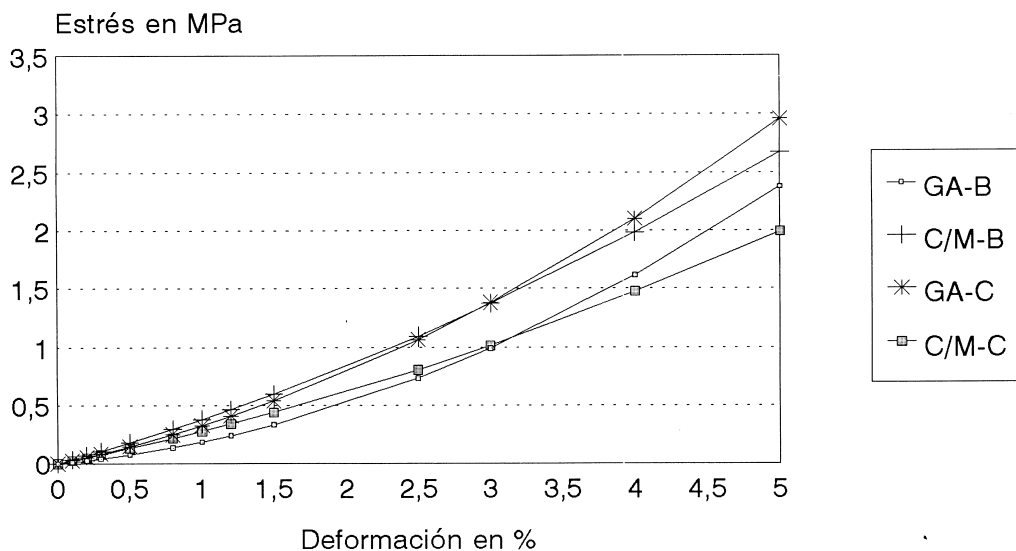


Figura 3 Curvas de estrés/deformación. Muestran el ajuste matemático para un escalón de carga de aproximadamente 3 MPa, hasta una deformación del 5 %. Series de control tratadas con glutaraldehído: GA-B y GA-C. Series tratadas con cloroformo/metanol (C/M-B y C/M-C. B y C expresan las regiones de donde se obtuvieron las muestras.

VALORES MEDIOS DE LAS SERIES: GA-B,C/M-B,GA-C y C/M-C

Escalón de carga de 8 MPa

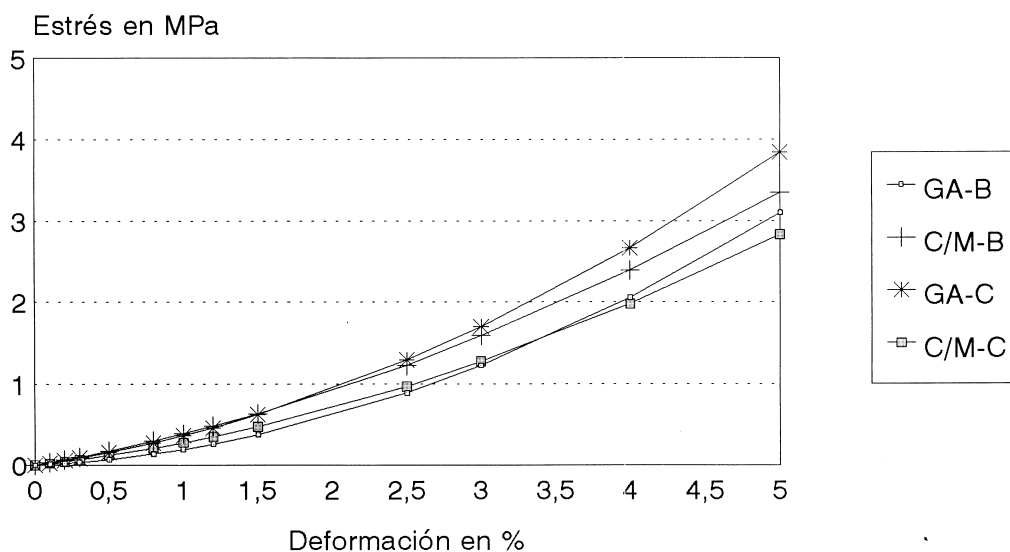


Figura 4 Curvas de estrés/deformación. Muestran el ajuste matemático para un escalón de carga de aproximadamente 8 MPa, hasta una deformación del 5 %. Series de control tratadas con glutaraldehído :GA-B y GA-C. Series tratadas con cloroformo /metanol: C/M-B y C/M-C. B y C expresan las regiones de donde se obtuvieron las muestras.

Resultados

Rotura

Los resultados de estos ensayos a tracción, hasta rotura, se expresan en la tabla 2. El estrés medio a rotura encontrado estuvo entre 32.60 MPa y 19.14 MPa para las series obtenidas de la región B (ver figura 1) y tratadas respectivamente con glutaraldehído y cloroformo /metanol respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar sus valores medios. En la series obtenidas de la región C los valores medios para los dos tipos ensayados fueron de 26.60 y 26.30 MPa respectivamente sin encontrar tampoco diferencias estadísticamente significativas en la comparación de dichos valores medios.

Estrés remanente

Tras cada escalón de carga aplicado, (estrés de tracción) se descargaron las muestras intentado recuperar su longitud inicial. En ese punto y en todos los ensayos se obtuvo un estrés remanente, que fue constante en su valor para cada ensayo, desde el primer escalón de carga con un valor medio de aproximadamente a 2 MPa y hasta el último escalón a 8 MPa. En la tabla 3 se expresan los resulta-

dos del estrés remanente medio, de cada serie, tras la aplicación del primer escalón de carga o estrés inicial. En la comparación de los valores medios del estrés inicial, en el primer escalón de carga, de las distintas series, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Tampoco lo fueron en la comparación de los valores medios del estrés remanente en las series estudiadas. Para un valor medio de todas la series estudiadas de estrés inicial de 2.14 MPa, el estrés remanente fue de 0.36 MPa. El porcentaje medio entre el estrés remanente medio y el estrés inicial medio fue del 16.82%

Análisis matemático de la curva estrés/deformación.

Este análisis demuestra que cuando las muestras se someten al estrés de tracción, las funciones resultantes con mejor ajuste matemático son parábolas cuadráticas del tipo $y = ax^2 + bx + c$, siendo c igual a cero, por condiciones biológicas, a cero estrés, nula deformación, en la primera subida de la carga. Estas funciones se repetían con cada escalón de carga y con la descarga, el escaso valor del termino c permitió su eliminación. Se obtuvieron los coeficientes «a» y «b» de cada curva. También se obtuvieron los coeficientes de Determinación R^2 , que fueron iguales o supe-

riores a 0.95. Estos valores se expresan en la tabla 4.

En las figuras 2,3 y 4 se expresan las curvas estrés/deformación resultantes del ajuste matemático, hasta una deformación del 5%, para los escalones de carga referidos.

La pendiente en cada punto de las curvas, representa el modulo de elasticidad que ayuda a analizar el comportamiento elástico de las muestras tras ser sometidas a tracción en los ensayos descritos.

Discusión

Para conseguir una bioprótesis fiable y duradera, es necesario conocer adecuadamente las propiedades mecánicas y bioquímicas del biomaterial utilizado en su fabricación. Rotura por desgarro y calcificación del tejido son los factores, interrelacionados en muchos casos, causantes del fracaso temprano de las bioprótesis de tejidos de cerdo o de ternera. Las causas de calcificación son multifactoriales y aún no se ha encontrado una solución satisfactoria que mitigue o retarde el proceso mediante la aplicación de tratamientos químicos a los tejidos. Estos tratamientos están basados en la posibilidad de modificar la ultraestructura del tejido de la que depende la nucleación y el desarrollo de los cristales de hidroxapatita. Ensayos previos han demostrado el papel de reactivos orgánicos sobre los fosfolípidos, moléculas directamente implicadas en los procesos de calcificación del tejido (8-14).

Por otra parte es necesario conocer el comportamiento mecánico de los biomateriales para intentar aumentar la vida media del tejido. Pretensar un material es someterle a un estrés de tracción antes de su uso. La razón para someter a las muestras a tan elevado estrés es conocer las variaciones del estrés residual, con la carga, si realmente se producen y su valor. El estrés remanente, en nuestro ensayo, fue constante para los escalones de carga aplicados y similar al estrés de trabajo de una valva de las tres que componen una bioprótesis cardiaca (7,16,17).

Los resultados tras la rotura de las distintas muestras parecen indicarían que no hay pérdida de resistencia a pesar de haber sido sometidas a estrés reiterativo y progresivo. En ensayos previos el estrés de rotura a tracción del pericardio de ternera no fue superior a 9 MPa(4,18). En este trabajo, al no tener muestras de control sin escalones de carga no es posible asegurar este aspecto.

No pudimos devolver a la longitud inicial a las

muestras, tras el primer escalón de carga, pero esa escasa deformación inicial se mantuvo durante todo el ensayo. También desde el primer escalón de carga de aproximadamente 2 MPa, se producía un estrés remanente medio próximo al 16% del estrés aplicado (tabla 3) y muy similar al estrés de trabajo descrito para un velo valvular de 0.250 MPa, aspecto ya descrito previamente(7,16,17). La aplicación del estrés progresivo produce cambios en la deformación del pericardio, que pueden establecerse por una ley matemática y que por lo tanto pueden ser previsibles.

La recta de regresión $X_i=f(y_{max})$ permite calcular la deformación que puede sufrir el tejido de pericardio tras un nivel previo de carga, pretensado, cuando posteriormente se le somete a un estrés de trabajo. Teóricamente, es posible elegir un grado de deformación para un estrés de trabajo conocido.

Los resultados parecen indicar una clara disminución de la deformación esperada, para un mismo tipo de estrés cuando el escalón de carga o pretensado fue mayor, al menos en un modelo matemático (figuras 2,3,y 4). El comportamiento mecánico se va haciendo cada vez mas homogéneo según aumenta la carga aplicada, independientemente de la región de pericardio seleccionada y del tipo de preparación química utilizada (figuras 2,3 y 4). De igual manera hay una progresiva pérdida de elasticidad (aumento de los valores de los módulos elásticos, tangentes a la curva estrés/deformación) según se aplica la carga. Es un hecho conocido que cuando las prótesis biológicas son retiradas de los pacientes por complicaciones, presentan cambios de forma por deformación permanente de sus valvas y pérdida de elasticidad, facilitando el fallo funcional y precipitando finalmente el fracaso valvular (19).

Un tratamiento mecánico previo que consiguiera disminuir la deformación del pericardio sin pérdida de su resistencia a rotura puede ser considerado.

Cuando un material es pretensado, mantiene posteriormente una tensión remanente o residual, que es el estrés por relajación del biomaterial. Este fenómeno produce cambios en su morfología interna, entrecruzamiento y alteraciones en la alineación de fibras. Con el estrés a tracción alcanzado en estos ensayos, estos cambios son irreversibles (3,4,6). Sus consecuencias son desconocidas en este momento.

La presencia de una tensión residual fue descrita por Vasely (20). Esta tensión o estrés mecáni-

co afectaba a las fibras de colágeno, alterando la extensibilidad de las capas fibrosa y ventricular. Este mismo autor (21) demostró que la rotura de las fibras de colágeno se produce con mayor facilidad en las regiones donde las fibras forman bucles. Los procesos capaces de eliminar este tipo de morfología, como el pretensado del pericardio serían capaces de eliminar estas regiones. La eliminación de los bucles y la reorientación de las fibras mejoraría el comportamiento mecánico.

También ha sido descrito que los velos valvulares tratados dinámicamente poseen características que permiten una mas larga resistencia en el tiempo a la fatiga mecánica y resisten mejor los procesos de degradación «in vivo»(22). Este fenómeno parece explicarse por el alto grado de entrecruzamientos internos que posibilita la penetración del tratamiento químico (glutaraldehído) dentro de las fibras de colágeno (22).

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) ayudas 96/250 y 00/192.

Bibliografía

1. **Chachra D, Gratzner P F, Pereira C A and Lee J M.** "Effect of applied uniaxial stress on the rate and mechanical effects of cross-linking in tissue-derived biomaterials". *Biomaterials* 1996;17:1865-1875.
2. **Flomennbaum M A, Shoen F J,** "Effects of fixation black pressure and antiminerallization treatment on the morphology of porcine aortic bioprothetic valves" *J. Thorac Cardiovasc. Sur.* 1993;1:154-164.
3. **Trowbridge E A, and Crofts C E,** "The extension rate independence of the hysteresis in glutaraldehyde fixed bovine pericardium". *Biomaterials* 1987;8:201-206
4. **Garcia Paez J M, Carrera A, Garcia Sestafe J V, Jorge E, Navidad R, Cordon A, Candela I Castillo-Olivares J L.** Comparison of elasticities of components a cardiac bioprosthesis leaflet". *J. Biomed Mater. Res.* 1996;30:47-52.
5. **Garcia Paez J M, Carrera A, Garcia Sestafe J V, Jorge E, Millan I and Candela I.** "The relationship between stress and relaxation in calf pericardium used in the construction of cardiac bioprostheses". *Biomaterials* 1990;11:186-190.
6. **Garcia Sestafe J V, Garcia Paez J M, Carrera A, Jorge E, Navidad R, Candela I, Castillo-Olivares JI.** "Description of the mathematical law that defines the relaxation of bovine pericardium subjected to stress". *J. Biomed. Mater. Res.* 1994;28:755-760.
7. **Zioupou P, Barbenel JC and Fhiser J.** "Anisotropic elasticity and strength of glutaraldehyde fixed bovine pericardium for use in pericardial bioprothetic valves" *J. Biomed Mater Res* 1994;28:45-52.
8. **Hirsch D, Drader J, Thomas T, Schoen FJ, Levy JT, Levy RJ.** "Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusp with sodium dodecyl sulfate:preincubation and controlled release studies" *J. Mater. Res.* 1993;27:1477-1484.
9. **Vesely I, Macris N, Dunmore PJ, Boughner D.** "The distribution and morphology of aortic valve cusp lipids" *J. Heart Valve Dis.* 1994;3:451-456.
10. **Khor E, Wee A, Tan L, Chew TY,** "The efficacy of a dual anticalcification treatment in the prevention of calcification of glutaraldehyde fixed porcine pericardium" *J. Mater Sci: Mat in Med* 1995;6:518-522.
11. **Vyavahare N, Hirsch D, Lerner E, Baskin JZ, Schoen FJ, Bianco R, Kruth HS, Zand R, Levy RJ.** "Prevention of bioprothetic heart valve calcification by ethanol preincubation" *Circulation* 1997;95:479-488.
12. **Jorge E, Gutierrez M, Castillo-Olivares JL,** "Calcification of soft tissue employed in the construction of heart valve prostheses. Estudy of different chemical treatments" *Biomaterials* 1991;12:249-252.
13. **Jorge E, Fernandez P, Gutierrez M, Castillo-Olivares JL.** "Estudy of calcification of bovine pericardium :analysis of implication of lipidsand proteoglycans." *Biomaterials* 1991;12:683-689.
14. **Jorge E, Fernández P, Escudero C, Castillo-Olivares JL.** "Inhibition of bovine pericardium calcification: A competitive study of Al³⁺ and lipid removing treatment" *J. Mater. Sci.: Mater in Med.* 1991;2:86-88.
15. **Purinya B, Kasynov J, Volkolakov J, Latsis R, Tetere G.** "Biomechanical and structural properties of the explanted bioprothetic valve leaflets" *J. Biomechan.* 1994; 27:1-11.
16. **Clark R E and Butterworth G A.** "Characterization of mechanics of human aortic and mitral valve leaflets" *Surg Forum* 1971;22:134-136.
17. **Gould P L, Catalogin A, and Dhatt G.** "Stress analysis of the human aortic valve" In *Computer Structures, Vol 3, Pergamon Press, Oxford* 1973, pp 377-384.
18. **Zioupou P, Barbenel JL, Fhiser J,** "Mechanical and optical anisotropy of bovine pericardium" *Med. Biol. Engin. Comp.* 1992;30:76-82.
19. **Zioupou P, Berbenel JC, Fhiser J, Wheatley D.** "Changes in mechanical propieties of bioprothetic valve leaflets made of bovine pericardium, as a result of long-term mechanical conditioning in vitro and implantation in vivo" *J.*

- Mater Sci.:Mater in Med.1993;4:531-537.
20. **Vasely I, Lozoz A, Talman E.** "Is zero-pressure fixation of bioprothetic valves truly stress free?" J. Thorac. Cardiovasc. Surg.1993;106:288-298.
 21. **Vasely I, Boughner D, Song T,**"Tissue buckling as a mechanism of bioprothetic valve faillure" Ann. Thorac. Surg. 1988;46:302-308.
 22. **Ducan AC, Boughner D, Vasely I.**" Dynamic glutaraldehyde fixation of a porcine aortic valve xenograft. I.Effect of fixation conditions on the final tissue viscosoelastic propieties" Biomaterials 1996;17:1849-1856.