

ОЦЕНКА ДИСФУНКЦИИ БИОПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА МЕТОДОМ МИКРОКОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ

DOI: 10.17691/stm2017.9.3.02

УДК 616.126–089.844–77–073.756.8

Поступила 20.01.2017 г.

© **Е.А. Овчаренко**, к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии¹;
К.Ю. Клышников, научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии¹;
Т.В. Глушкова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии¹;
А.В. Батрагин, инженер-исследователь²;
М.А. Резвова, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии¹;
Ю.А. Кудрявцева, д.б.н., зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии¹;
Л.С. Барбараш, д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник¹

¹НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, 650002, Сосновый бульвар, 6;²Национальный институт «Томский политехнический университет», Томск, 634050, пр. Ленина, 30

Цель исследования — оценить возможности метода микрокомпьютерной томографии с последующей обработкой снимков для анализа дисфункций эксплантированных биологических протезов клапанов сердца.

Материалы и методы. Исследование выполнено на основе эксплантированного (срок функционирования — 5 лет) ксеноперикардального биопротеза «ЮниЛайн» (Россия). Микрокомпьютерная томография проведена с использованием модели экспериментального томографа «Орел-МТ» (Россия) с последующей постобработкой и анализом полученных томограмм. С целью референсной оценки структурных изменений биологического материала в процессе функционирования биопротеза выполнено гистологическое исследование с окраской образцов ализариновым красным.

Результаты. По томограммам в оттенках серого цвета и псевдо-цветным выявлена локализация наиболее плотных кальциатов в тканях обшивки и створчатого аппарата биопротеза. Путем анализа деформации элементов биопротеза установлено изменение угла наклона стоек, радиуса кривизны и угла провисания створчатого аппарата. Качественная оценка морфологии кальцификатов выполнена на основе объемного рендеринга, усредненной проекции и проекции максимальной интенсивности. Методом сегментирования полученных томограмм построена 3D-модель с триангулярной сеткой элементов протеза с дисфункцией, на основе которой выполнен количественный анализ тканевой дегенерации. Морфология кальцификатов, полученная методом микрокомпьютерной томографии, подтверждена результатами гистологического исследования.

Заключение. Микрокомпьютерная томография позволяет произвести качественную и количественную оценку кальцификации биологической ткани и деформации элементов биопротеза. Полученные результаты дают возможность осуществить пакетную количественную обработку реконструированных моделей.

Ключевые слова: микрокомпьютерная томография; биопротезы клапанов сердца; дегенерация ткани биопротеза; кальцификация биопротезов.

Как цитировать: Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.U., Glushkova T.V., Batrarin A.V., Rezvova M.A., Kudryavtseva Y.A., Barbarash L.S. Evaluation of a failed heart valve bioprosthesis using microcomputed tomography. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(3): 15–22, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.3.02>

English

Evaluation of a Failed Heart Valve Bioprosthesis Using Microcomputed Tomography

E.A. Ovcharenko, PhD, Senior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Experimental and Clinical Cardiology Department¹;

K.U. Klyshnikov, Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Experimental and Clinical Cardiology Department¹;

Для контактов: Глушкова Татьяна Владимировна, e-mail: bio.tvg@mail.ru

T.V. Glushkova, PhD, Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Experimental and Clinical Cardiology Department¹;

A.V. Batranin, Research Engineer²;

M.A. Rezvova, Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Experimental and Clinical Cardiology Department¹;

Y.A. Kudryavtseva, DSc, Head of Experimental and Clinical Cardiology Department¹;

L.S. Barbarash, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher¹

¹Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation;

²National Institute "Tomsk Polytechnic University", 30 Lenin Avenue, Tomsk, 634050, Russian Federation

The aim of the investigation was to assess the capabilities of microcomputed tomography with subsequent image analysis of explanted failed biological heart valves prostheses.

Materials and Methods. The study is based on the explanted (after 5-year functioning) xenopericardial biological prosthesis UniLine (Russia). Microcomputed tomography with subsequent post-processing and image analysis was performed using the experimental tomographic scanner Orel-MT (Russia). Histological examination using alizarin red staining was performed for reference assessment of the structural changes of the biological tissue during bioprosthesis functioning.

Results. The analysis of gray and pseudo-color tomograms revealed the localization of most dense calcifications in the leaflets and covering tissues of a bioprosthesis. The study of the deformed bioprosthetic elements showed significant changes in the inclination angle of the prosthesis frame racks, the curvature radius and angle of deflection of the leaflets. A qualitative assessment of the morphology of calcifications was made on the basis of volume rendering, the average projection and maximum intensity projection. The 3D model triangular mesh of the failed prosthesis was constructed by the tomogram segmentation followed by quantitative analysis of tissue degeneration. The morphology of the calcifications obtained the microcomputed tomography was confirmed by histological examination findings.

Conclusion. Microcomputed tomography enables to perform qualitative and quantitative assessment of biological tissue calcification and bioprosthesis deformation. The findings offer the opportunity to carry out batch quantitative processing of the reconstructed models.

Key words: microcomputed tomography; heart valve bioprostheses; bioprosthetic tissue degeneration; bioprosthesis calcification.

Ежегодно в РФ выполняют приблизительно 12 000 операций протезирования клапанов сердца, из которых 2400 составляют биологические протезы, при этом до 26,4% пациентов подвергаются повторной операции в связи с дисфункцией створчатого аппарата [1]. До 90% дисфункций биопротезов обусловлено первичной тканевой недостаточностью, развивающейся вследствие ряда факторов, основными из которых являются структурная деградация ткани и кальцификация [2, 3]. В связи с ростом числа приобретенных и врожденных пороков сердца количество вмешательств с использованием биологических протезов продолжает неуклонно увеличиваться [1], однако эффективных способов обработки биоматериала, позволяющих радикально решить проблему долговечности биопротезов, не найдено. Данная ситуация вызывает необходимость оценки состояния ткани протеза, что обуславливает развитие новых методов исследования, позволяющих получить количественную оценку степени деградации протеза и сформировать расширенное представление о механизме развития дисфункции.

Существующие исследования эксплантированных биопротезов в основном полагаются на макроскопическое и гистологическое описание [4, 5], однако данные методы не дают достаточной информации о структуре поражений, а заключения носят качественный, но не количественный характер. Высокая рентгенологиче-

ская контрастность кальциевых конгломератов позволяет успешно использовать флюороскопические методы оценки кальциноза: в частности, рентгенограмма способна обеспечить качественную визуализацию минерализованной ткани [6], но также не дает возможности сформировать количественную оценку. Наиболее перспективными в данном случае представляются методы, позволяющие осуществлять количественный анализ на базе трехмерных реконструкций, в частности компьютерная томография [7]. Однако и этот метод ввиду относительно невысокого разрешения стандартных клинических установок не позволяет воспроизводить детальную структуру кальцинатов и биологического материала в полной мере. С учетом статичности объекта исследования, а также отсутствия лимита лучевой нагрузки высокое разрешение трехмерной реконструкции может быть получено методом микрокомпьютерной томографии (микро-КТ) [8]. Данный подход широко используют при решении задач реконструкции прецизионных моделей протезов клапанов сердца для последующего компьютерного моделирования [9–11] и в исследованиях биологической ткани [12]. Мы предлагаем использовать микрокомпьютерную томографию при изучении эксплантированных протезов с дисфункцией для получения количественных характеристик исследуемого поражения.

Цель исследования — оценить возможности метода микрокомпьютерной томографии с последую-

щей обработкой снимков для анализа дисфункций эксплантированных биологических протезов клапанов сердца.

Материалы и методы

Объект исследования. В качестве объекта исследования был выбран ксеноперикардиальный биопротез «Юнилайн» (ЗАО «НеоКор», Россия) 30-го типоразмера. Данное медицинское устройство относится к классу жестких каркасных протезов, которые на сегодняшний день являются стандартом радикальной коррекции клапанных патологий [13]. Непосредственно сам протез изготовлен из бычьего ксеноперикарда, консервированного диглицидиловым эфиром этиленгликоля, смонтирован на композитном каркасе из нитинола и полипропилена. Обшивка каркаса и манжета также изготовлены из ксеноперикарда без применения синтетических материалов [14, 15].

В исследовании использовали биологический протез клапана, эксплантированный по причине дисфункции в митральной позиции. Возраст пациента на момент репротезирования — 56 лет, срок функционирования биопротеза в организме — 5 лет. С целью сохранности микроструктуры ткани после иссечения биопротез был помещен в раствор 4% забуференного параформальдегида (Sigma-Aldrich, Германия).

Микрокомпьютерная томография. Исследования проводили с применением метода микро-КТ [16]. Одной из распространенных схем реализации этого метода является использование рентгеновского аппарата с малым размером фокального пятна. Полезная форма пучка в такой схеме представляет собой конус (рис. 1). Излучение проходит через объект исследования, частично в нем ослабляется и регистрируется плоскопанельным рентгеновским детектором. Объект исследования поворачивается на определенный угол вокруг вертикальной оси, позволяя делать снимки с различных ракурсов. Размер воксела после реконструкции в данной схеме определен величиной проекционного увеличения, которое зависит от расстояния «объект–источник» и «источник–детектор» [8].

Для проведения исследования был использован томограф «Орел-МТ» (Томский политехнический университет, Россия), реализующий описанную выше схему и обладающий следующими характеристиками:

- излучатель: ток — 1–1000 мкА;
- напряжение — 20–160 кВ;
- фокальное пятно — 1,3 мкм;
- детектор — 3 мегапикселя (1920×1536 пикселей);
- 14-битная активная матрица;
- диапазон усиления — 1,3–25,0;
- область сканирования — 150×150×100 мм;
- размер воксела — 5–100 мкм.

Разрешающая способность томографа в эксперименте составила 25,4 мкм. Детектор был установлен на расстоянии 500 мм от фокального пятна рентгеновского аппарата, объект исследования — на расстоянии 100 мм. Параметры режимов сканирования



Рис. 1. Схема микро-КТ-сканирования с применением конического пучка острофокусного рентгеновского аппарата и регистрацией на плоскопанельном детекторе [16] и модель томографа «Орел-МТ» с размещенным объектом исследования

Параметры микро-КТ-сканирования биопротеза

Параметр	Режим 1	Режим 2
Напряжение, кВ	80	140
Ток, мкА	48	23
Время экспозиции кадра, с		0,667
Число кадров в проекции		3
Число проекций		1200
Угловой шаг, град		0,3
Размер воксела, мкм		25,4

приведены в таблице. С целью получения более контрастных и информативных изображений протез помещали в герметичную тару с воздушной средой.

Последующую реконструкцию полученных томограмм, сегментирование в соответствии с грациями серого, измерения, а также построение сетки трехмерных моделей осуществляли с использованием программного обеспечения Mimics (Materialise, США). В процессе измерений деформации протеза на томограммах, соответствующих плоскостям гистологических срезов, фиксировали следующие показатели: H — высота зоны коаптации, α — угол провисания створки, R — радиус кривизны створки, D — диаметр

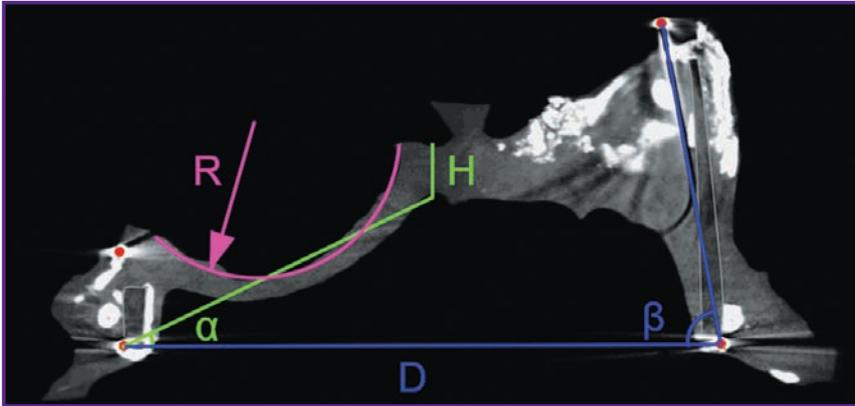


Рис. 2. Основные параметры, измеряемые на полученных томограммах:

H — высота зоны коаптации, α — угол провисания створки, R — радиус кривизны створки, D — диаметр каркаса, β — угол наклона стойки проволоочного каркаса протеза

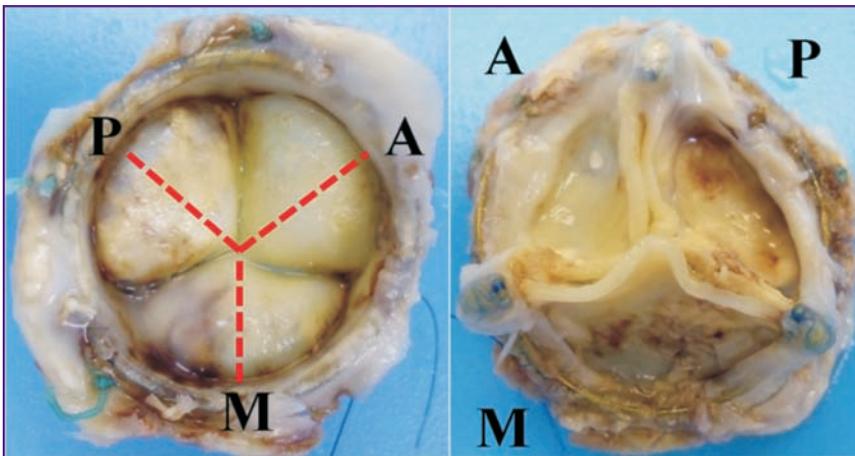


Рис. 3. Эксплантированный биопротез с дисфункцией (вид с приточной и выводной сторон):

A — антериальная, P — постериальная, M — медиальная створки протеза, красным пунктиром показана схема гистологических срезов

каркаса, β — угол наклона стойки проволоочного каркаса протеза (рис. 2).

Для проведения объемного рендеринга, построения проекций максимальной интенсивности и усредненных проекций использовали программное обеспечение Amira (FEI, США).

Гистологическое исследование. Для оценки структурных изменений биологического материала в процессе функционирования биопротеза была иссечена центральная часть створки от свободного края до основания. Микроструктуру биоматериала оценивали методом световой микроскопии на микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия). Документирование и обработку изображений производили с помощью программного обеспечения AxioVision (Carl Zeiss, Германия). Измерения толщин биоматериала и размеров кальцификатов производили на 10 серийных срезах для каждого образца. Гистологические препараты толщиной 4–6 мкм готовили на криотоме Microm HM 525 (Thermo Scientific, Германия). Для идентификации кальцификатов на микроструктурном уровне криосрезы окрашивали ализариновым красным С (НПО «Химсинтез», Россия).

По расположению биопротеза относительно анатомии естественного митрального клапана было принято следующее обозначение створок биопротеза: A —

антериальная, P — постериальная, M — медиальная (рис. 3).

Статистический анализ. Обработку данных по результатам гистологического исследования производили в программе Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде медианы (M) и 25 и 75 перцентилей.

Результаты

Микрокомпьютерная томография. Первоначально ускоряющее напряжение рентгеновского аппарата было выбрано на уровне 80 кВ. Однако в этих условиях на томограммах сильно проявлялись характерные артефакты из-за наличия металлических компонентов в конструкции биопротеза [17]. Напряжение было увеличено до 140 кВ, что частично компенсировало возникновение артефактов, однако контрастность компонентов, слабопоглощающих рентгеновское излучение, снижалась (рис. 4).

Полученные в ходе эксперимента томограммы в оттенках серого и псевдоцветные снимки продемонстрировали основную локализацию наиболее плотных кальцинатов в тканях постериальной и медиальной створок, при этом антериальная створка была свободна от кальцификации (рис. 5). Толщина кальцината в куполе постериальной створки составила 0,92 мм.

Медиальная створка содержала несколько кальцификатов в срезе, расположенных в куполе и основании створки, максимальная толщина составила 1,68 мм. Толщина антериальной створки в районе свободного края составила 1,57 мм, купола — 1,05 мм.

Медиальный срез (М-срез) наглядно продемонстрировал несимметричность свободного края створки и, как следствие, нарушение геометрии зоны коаптации: высота зоны коаптации составила 2,14 мм против 3,42 и 3,12 мм для постериальной и антериальной створок соответственно.

Наименьший радиус кривизны отмечен для постериальной створки — 22,0 мм, при этом угол провисания створки составил 22,7°. Аналогичные показатели для медиальной и антериальной створок составили 6,15 мм, 30,9° и 7,20 мм, 26,0° соответственно.

Наименьшим углом наклона в 73,4° (стойка деформирована в наибольшей степени) обладала постерио-антериальная стойка проволочного каркаса протеза, при этом угол для других стоек

был практически идентичный — 80,0° (медиально-антериальная) и 79,7° (постерио-медиальная).

Диаметр каркаса во всех трех срезах незначительно

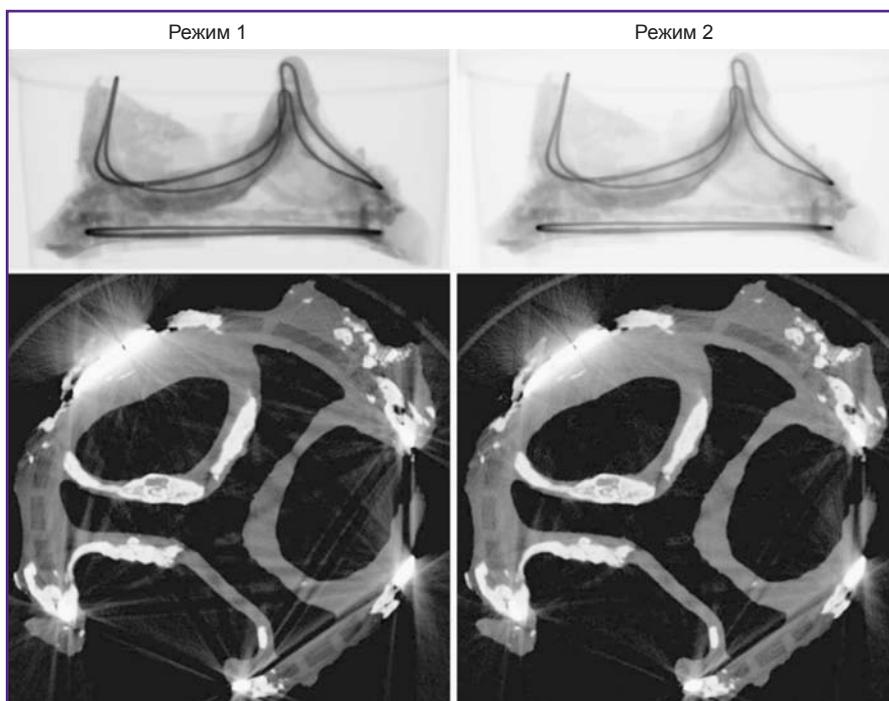


Рис. 4. Теневая проекция клапана при ускоряющем напряжении рентгеновского аппарата 80 кВ (режим 1) и 140 кВ (режим 2) и соответствующие томограммы

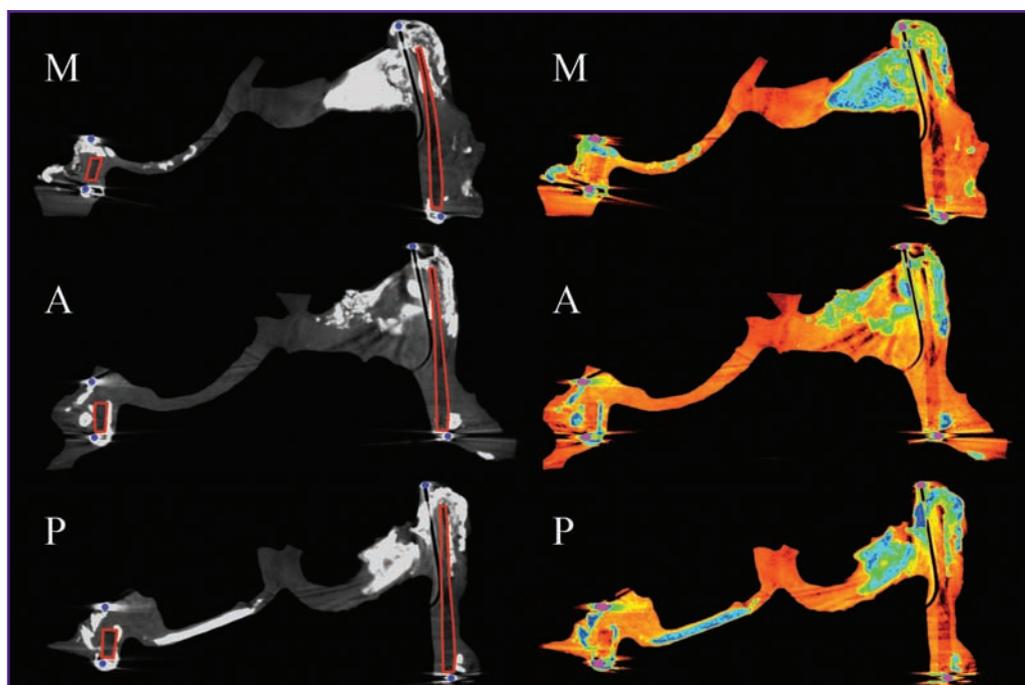


Рис. 5. Томограммы, соответствующие гистологическим срезам и принятому обозначению створок (см. рис. 3):

на черно-белых снимках синим цветом показан контур проволочного нитинолового каркаса, красным — контур полипропиленового каркаса

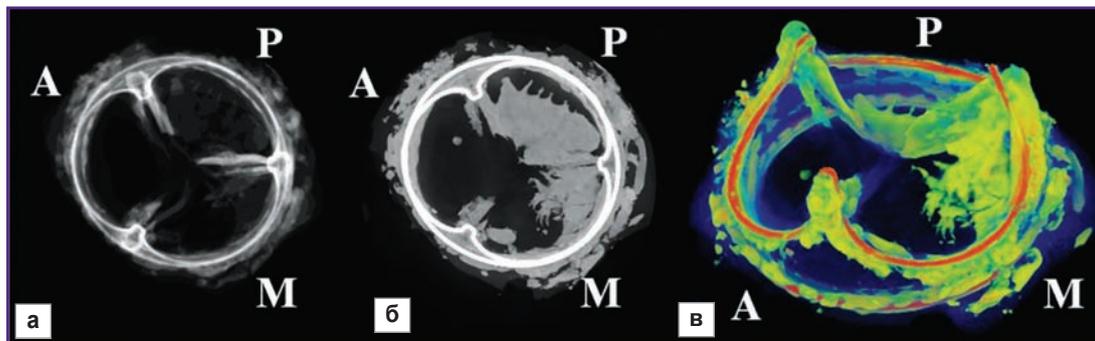


Рис. 6. Выделенные области с наиболее выраженным кальцинозом (обозначение см. на рис. 3): а — с помощью двумерной усредненной проекции; б — с помощью 2D-проекции максимальной интенсивности; в — с помощью 3D псевдоцветного объемного рендеринга

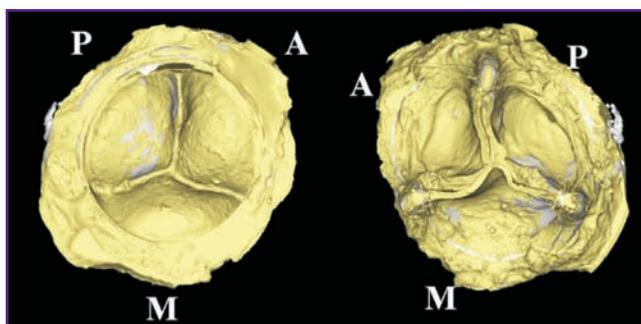


Рис. 7. 3D-модель биопротеза клапана сердца с дисфункцией, полученная в ходе реконструкции данных микро-КТ (желтый цвет — биологический материал, белый — кальцинат); обозначение см. на рис. 3

отклонялся от исходного — 30,48 мм: 28,96 (Р-срез); 30,68 (М-срез) и 30,22 мм (А-срез), т.е. каркас не был подвержен эллиптической деформации (см. рис. 5).

Полученные в исследовании усредненная 2D-проекция и проекция максимальной интенсивности позволили выделить области с наиболее выраженным кальцинозом (рис. 6). Наибольшим изменениям была подвергнута постериальная створка, медиальная створка была преимущественно поражена со стороны постерио-медиальной стойки. Кроме того, объемный рендеринг позволил наглядно визуализировать кальцинаты в области стоек каркаса.

Согласно полученной гистограмме градаций серого по 16-битной шкале яркости от 0 до 65 535 ступеней было выделено два основных пика в диапазоне 800–3700 ступеней — для биоматериала и полипропиленового каркаса, 3700–10 000 ступеней — для кальцинов. Диапазон 10 000–65 535 ступеней соответствовал проволочному каркасу. В соответствии с данными диапазонами выполнены сегментирование и последующее построение трехмерных моделей (рис. 7).

В результате измерения объемов сегментированных тел были получены следующие значения: совокупный объем кальцинов — 1499,68 мм³, проволочного каркаса — 67,76 мм³, биоматериала (за вычетом

полипропиленового каркаса) — 4918,5 мм³. Таким образом, отношение кальция/биологическая ткань составило 0,305. Общая площадь поверхности сетки кальцинов — 4640 мм².

Гистологическое исследование. Все створки были утолщены с потерей эластичности. В основании створок наблюдали сохранение исходной толщины ткани. В центральной части постериальной и медиальной створок выявлены массивные кальцинаты протяженностью 8 и 4,84 мм соответственно, локализованные в куполе створок (рис. 8). Максимальная

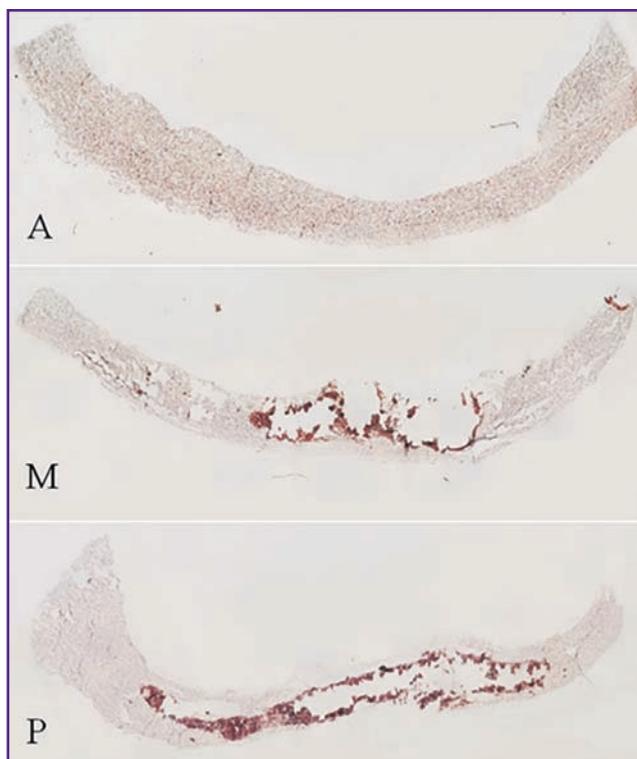


Рис. 8. Криостатные срезы центральной части створок биопротеза (обозначение см. на рис. 3): слева расположен свободный край, справа — основание створок; окраска препаратов ализариновым красным С; кальцинат бурого цвета; ×50

толщина кальцинированных участков отмечена в куполе постериальной и медиальной створок и составила 0,89 (0,88–1,0) и 1,64 (1,59–1,72) мм соответственно. Толщина кальцината варьировала от 0,3 до 0,68 мм. Также в основании по линии крепления медиальной створки к каркасу отмечен кальцинат, не имеющий локализационной связи с кальцином купола створки. Антериальная створка в центральной части не имела признаков кальцификации, ее толщина в области свободного края и купола составила 1,5 (1,47–1,54) и 0,96 (0,94–0,97) мм соответственно.

Обсуждение. Результаты настоящего исследования демонстрируют, что использование метода микро-КТ в изучении дисфункции биопротезов клапанов сердца позволяет существенно расширить арсенал инструментов качественного и количественного анализа. В отличие от рентгенографии [6], метод также позволяет получать проекции максимальной интенсивности, что может быть использовано для быстрой оценки распределения кальциатов в зоне створчатого аппарата (см. рис. 6), однако оказывается неэффективным для анализа распределения кальциатов по контуру каркаса ввиду его сложной трехмерной геометрии. Для решения этой задачи может быть успешно применен 3D псевдоцветной объемный рендеринг. В целом следует отметить, что использование псевдоцветного окрашивания, в частности в томограммах, позволяет отчетливо визуализировать элементы каркаса протеза со схожей с окружающими тканями рентгенологической плотностью (см. рис. 5).

Из всех возможностей метода микро-КТ наиболее ценной является количественное измерение геометрических параметров на реконструированных томограммах, а также реконструкция трехмерных тел с последующей оценкой их объемов. Сравнение результатов микро-КТ-анализа и гистологического описания продемонстрировало идентичность данных. Таким образом, искажения и артефакты — основной недостаток метода — можно считать несущественными.

Полученные в результате измерения данные позволяют связать распределение кальциатов с напряженно-деформированным состоянием узлов конструкции протеза. Так, постериальная створка имела наименьший радиус кривизны и угол провисания, т.е. находилась в наиболее напряженном состоянии, при этом ее кальцификация — наиболее выраженная. Это позволяет предположить наличие взаимосвязи степени кальцификации и нагрузки в створке протеза, что согласуется с литературными данными, предполагающими первостепенное влияние напряжения материала на скорость кальцификации [18, 19]. В то же время причина изменения геометрии створчатого аппарата заключается по крайней мере в двух факторах: значительная несимметричная деформация стоек каркаса (изначальный угол наклона 84°) и растяжение непосредственно биологической ткани под действием интенсивной циклической нагрузки.

Наличие разрозненных конгломератов кальция

в створках и их последующее объединение в более массивные элементы является приоритетным механизмом образования крупных скоплений кристаллов фосфата кальция [19, 20]. Рост кальцината сопровождается разрушением и замещением органической составляющей матрикса на кристаллы фосфата кальция [20, 21], поэтому наличие элементов перикарда вокруг сформированного крупного кальцината говорит о внутренней кальцификации, при которой центры нуклеации расположены в толще материала [18]. Значительное увеличение толщины створок в кальцинированных участках дает основание полагать, что процесс замещения биологической составляющей кальцином проходит с большей интенсивностью роста кальцината. Однако увеличение толщин свободного края постериальной створки и в целом толщины антериальной створки без признаков кальцификации указывает на дегенеративные изменения биоматериала без участия процесса кальцификации, которые также вносят свой вклад в дисфункцию биопротеза.

Таким образом, проведенное исследование наглядно демонстрирует возможности метода микро-КТ в оценке степени кальцификации и деформационных изменений каркаса и створчатого аппарата при дисфункции биопротезов клапанов сердца.

Заключение. Предложенный метод микро-КТ способен существенно расширить набор инструментов исследования механизмов развития дисфункций биологических протезов за счет количественной и качественной оценки распределения кальциатов. Он дает возможность провести пакетную количественную обработку реконструированных моделей и в перспективе решить вопрос их изучения методами компьютерного моделирования.

Финансирование исследования. Работа проведена в рамках финансирования ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия — 2015. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М: НЦССХ им. А.Н. Бакулева; 2016; 208 с. Bokeriya L.A., Gudkova R.G. *Serdechno-sosudistaya khirurgiya — 2015. Bolezni i vrozhdennyye anomalii sistemy krovoobrashcheniya* [Cardiovascular surgery — 2015. Diseases and congenital anomalies of the circulatory system]. Moscow: NTsSSKh im. A.N. Bakuleva; 2016; 208 p.
2. Hoffmann G., Lutter G., Cremer J. Durability of bioprosthetic cardiac valves. *Dtsch Arztebl Int* 2008; 105(8): 143–148, <https://doi.org/10.3238/arztebl.2008.0143>.
3. Журавлева И.Ю., Веремеев А.В., Хрячкова О.Н., Никонорова Н.Г. Нарушения кальций-фосфорного обмена у больных с приобретенными пороками сердца. Патология кровообращения и кардиохирургия 2013; 3: 8–12. Zhuravleva I.Y., Veremeyev A.V., Khryachkova O.N., Nikonorova N.G. Disorders of calcium and phosphorus metabolism in patients with acquired heart diseases.

- Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya* 2013; 3: 8–12.
4. Siddiqui R.F., Abraham J.R., Butany J. Bioprosthetic heart valves: modes of failure. *Histopathology* 2009; 55(2): 135–144, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03190.x>.
 5. Ong S.H., Mueller R., Iversen S. Early calcific degeneration of a CoreValve transcatheter aortic bioprosthesis. *Eur Heart J* 2012; 33(5): 586–586, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr283>.
 6. Takano T., Terasaki T., Wada Y., Ohashi N., Komatsu K., Fukui D., Amano J. Early bioprosthetic valve calcification with alfacalcidol supplementation. *J Cardiothorac Surg* 2013; 8(1): 11, <https://doi.org/10.1186/1749-8090-8-11>.
 7. Saleeb S.F., Newburger J.W., Geva T., Baird C.W., Gauvreau K., Padera R.F., Del Nido P.J., Borisuk M.J., Sanders S.P., Mayer J.E. Accelerated degeneration of a bovine pericardial bioprosthetic aortic valve in children and young adults. *Circulation* 2014; 130(1): 51–60, <https://doi.org/10.1161/circulationaha.114.009835>.
 8. Batranin A.V., Chakhlov S.V., Grinev D.V., Kapranov B.I., Klimenov V.A. Design of the X-Ray micro-CT scanner TOLMI-150-10 and its perspective application in non-destructive evaluation. *Applied Mechanics and Materials* 2013; 379: 3–10, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.379.3>.
 9. Claiborne T.E., Xenos M., Girdhar G., Alemu Y., Sheriff J., Slepian M., Pinchuk L., Jesty J., Einav S., Bluestein D. Dynamic numerical and experimental evaluation of Trileaflet polymer prosthetic heart valves. *ASME 2011 Summer Bioengineering Conference* 2011; p. 1205–1206, <https://doi.org/10.1115/sbc2011-53176>.
 10. Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.U., Yuzhalin A.E., Savrasov G.V., Kokov A.N., Batranin A.V., Ganyukov V.I., Kudryavtseva Y.A. Modeling of transcatheter aortic valve replacement: patient specific vs general approaches based on finite element analysis. *Comput Biol Med* 2016; 69: 29–36, <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2015.12.001>.
 11. Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.U., Savrasov G.V., Batranin A.V., Ganyukov V.I., Kokov A.N., Nushtaev D.V., Dolgov V.Y., Kudryavtseva Y.A., Barbarash L.S. Predicting the outcomes of transcatheter aortic valve prosthesis implantation based on the finite element analysis and microcomputer tomography data. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(1): 82–92, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.1.11>.
 12. Liu J., Zhong S., Lan H., Meng X., Zhang H., Fan Y., Wang Y., Wang C., Wang Z. Mapping the calcification of bovine pericardium in rat model by enhanced micro-computed tomography. *Biomaterials* 2014; 35(29): 8305–8311, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.026>.
 13. Барбараш Л.С., Журавлева И.Ю. Эволюция биопротезов клапанов сердца: достижение и проблемы двух десятилетий. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2012; 1: 4–11. Barbarash L.S., Zhuravleva I.Yu. Bioprosthetic heart valve evolution: two decades of advances and challenges. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy* 2012; 1: 4–11.
 14. Клышников К.Ю., Овчаренко Е.А., Мальцев Д.А., Журавлева И.Ю. Сравнительная характеристика гидродинамических показателей биопротезов клапанов сердца «ЮниЛайн» и «ПериКор». *Клиническая физиология кровообращения* 2013; 1: 45–51. Klyshnikov K.Yu., Ovcharenko E.A., Maltsev D.A., Zhuravleva I.Yu. Comparative characteristics of hydrodynamic data of heart valve bioprostheses “UniLine” and “PeriCor”. *Klinicheskaya fiziologiya krovoobrashcheniya* 2013; 1: 45–51.
 15. Караськов А.М., Журавлева И.Ю., Астапов Д.А., Стасев А.Н., Демидов Д.П., Одаренко Ю.Н., Барбараш Л.С. Клинико-гемодинамические результаты применения биопротезов ЮниЛайн в аортальной позиции. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия* 2014; 7(4): 87–91. Karas'kov A.M., Zhuravleva I.Iu., Astapov D.A., Stasev A.N., Demidov D.P., Odarenko Iu.N., Barbarash L.S. Clinical and hemodynamic results of bioprostheses UniLine using in aortic position. *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya* 2014; 7(4): 87–91.
 16. Stock S. *Microcomputed tomography*. CRC Press; 2008, <https://doi.org/10.1201/9781420058772>.
 17. Kalender W.A. *Computed tomography: fundamentals, system technology, image quality, applications*. John Wiley & Sons, 2011; 372 p.
 18. Pettenazzo E., Deiwick M., Thiene G., Molin G., Glasmacher B., Martignago F., Bottio T., Reul H., Valente M. Dynamic in vitro calcification of bioprosthetic porcine valves: evidence of apatite crystallization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121(3): 500–509, <https://doi.org/10.1067/j.mtc.2001.112464>.
 19. Halevi R., Hamdan A., Marom G., Mega M., Raanani E., Haj-Ali R. Progressive aortic valve calcification: three-dimensional visualization and biomechanical analysis. *J Biomech* 2015; 48(3): 489–497, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.12.004>.
 20. Пухов Д.Э., Васильев С.В., Зотов А.С., Ильин М.В., Рудый А.С. Микроморфология, состав, особенности локализации минеральных отложений створок аортальных клапанов по данным сканирующей электронной микроскопии и рентгенодифракционного анализа. *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова* 2014; 9(1): 23–30. Pukhov D.E., Vasilev S.V., Zotov A.S., Ilin M.V., Rudy A.S. Micromorphology, composition and localization habits of mineral deposits of aortal valves cusps according to the scanning electron microscopy and X-ray diffractometry. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo Tsentra im. N.I. Pirogova* 2014; 9(1): 23–30.
 21. Cottignoli V., Cavarretta E., Salvador L., Valfré C., Maras A. Morphological and chemical study of pathological deposits in human aortic and mitral valve stenosis: a biomineralogical contribution. *Patholog Res Int* 2015; 2015: 342984, <https://doi.org/10.1155/2015/342984>.