

ного максимума отображалось на индикаторе «Frequency»; оно извлекалось из массива с помощью прибора «Index Array», на входе которого было установлено начальное (нулевое) значение индекса массива.

Заключение

Испытания прибора показали возможность неинвазивной оценки средней частоты следования потенциалов действия отдельных двигательных единиц мышц [10]. Продолжительность процедуры измерения – около 1 с. Это позволяет неинвазивно контролировать изменение частоты следования импульсов в динамике, например в процессе выполнения физических упражнений и нагрузочных тестов.

Список литературы:

1. Webster J.G. (ed.) Medical Instrumentation: Application and Design. 3rd ed. – New York, NY: Wiley, 1998.
2. Forbes H.N. Jr., Edgar L. Gasteiger action potentials of single motor units in normal muscle // *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1955. Vol. 7. Iss. 1. PP. 115-126.
3. DeLisa J.A., Mackenzie K., Baran E.M. Manual of Nerve Conduction Velocity and Somatosensory Evoked Potentials. – New York: Raven Press, 1987.
4. Agarwal G.C., Gottlieb G.L. An analysis of the electromyogram by Fourier simulation and experimental techniques // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1975. Vol. 22. № 3. PP. 225-229.
5. Rangayyan R.M. Biomedical Signal Analysis: A Case-Study Approach. – New York, NY: Wiley-IEEE Press, 2002.
6. Шайдук А.М., Останин С.А. Структура спектра электромиосигнала при хаотическом следовании отдельных импульсов // *Известия Алтайского государственного университета*. 2011. Ч. 2 (69). С. 181-185.

7. Шайдук А.М., Останин С.А. Метод измерения частоты импульсов двигательных единиц по поверхностной электромиограмме // Интернет-ресурс (электронный журнал). Журнал радиоэлектроники. 2011. № 7 / <http://jre.cplire.ru/jre/jul11/1/text.html>.
8. Шайдук А.М., Останин С.А. Влияние фазового сдвига импульсов двигательных единиц на структуру спектра электромиосигнала // Интернет-ресурс (электронный журнал). Журнал радиоэлектроники. 2011. № 6. / <http://jre.cplire.ru/jre/jun11/2/text.html>.
9. Шайдук А.М., Останин С.А. Анализ спектра квазипериодических импульсов электромиограммы // Интернет-ресурс (электронный журнал). Журнал радиоэлектроники. 2011. № 8. / <http://jre.cplire.ru/jre/aug11/5/text.html>.
10. Шайдук А.М., Останин С.А., Юсупов Е.Р. Экспериментальное обнаружение средней частоты следования миоимпульсов по поверхностной электромиограмме // Интернет-ресурс (электронный журнал). Журнал радиоэлектроники. 2011. № 9 / <http://jre.cplire.ru/jre/sep11/6/text.html>.

Сергей Александрович Останин,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
кафедра прикладной информатики в экономике,
государственном и муниципальном управлении,
Алтайский государственный университет,
Александр Михайлович Шайдук,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
зав. кафедрой физики и информатики,
Алтайский государственный медицинский университет,
г. Барнаул,
e-mail: ostanin1963@mail.ru

Н.П. Бакулева, Н.М. Анучина, М.В. Зеливянская, В.Т. Костава, Ж.Е. Кондратенко,
И.Г. Лютова, Д.А. Попов, И.А. Терещенкова

Доклинические испытания диоксида в качестве стерилизующего агента для биопротезов клапанов сердца

Аннотация

Способ стерилизации и консервации биопротезов из аллогенной и ксеногенной ткани в 1%-ном растворе диоксида не изменяет структуру и прочностные характеристики биологической ткани, а также не провоцирует возникновение цитотоксичности биологического материала. Консервация в диоксиде биопротезов из ксеногенной ткани обеспечивает их стерильность в течение гарантийного срока хранения. Экспозиция биопротезов в 1%-ном растворе диоксида для достижения уровня обеспечения стерильности составляет 24 ч. Результаты проведенных доклинических испытаний показали, что 1%-ный раствор диоксида может быть рекомендован в качестве нового универсального стерилизующего и консервирующего средства для биологических протезов клапанов сердца.

Проблема стерилизации биопротезов возникла в 60-е годы прошлого столетия при первом их применении в клинической практике для замещения клапанов сердца. В результате полувеккового поиска универсальных средств и методов для стерилизации биологических протезов клапанов сердца были предложены различные лучевые и химические методы, большинство из которых оказались несостоятельными по разным причинам: деструктивные изменения биологической ткани, дисфункция клапанов, кальцификация биопротезов, сохранение иммуногенности ксеноткани [1].

Современные методы стерилизации и консервации биопротезов из ксеногенной ткани обеспечивают их стерильность, однако большинство стерилизующих средств требуют длительной предимплантационной подготовки ксенопротезов. Обработка биопротезов из аллогенной ткани классическим методом в смеси антибиотиков не может полностью обеспечить стерильность аллогraftов, поскольку антибиотики неэффективны в отношении вирусов, спорообразующих и резистентных форм микроорганизмов.

На сегодняшний день в качестве универсального средства для стерилизации и консервации биологических протезов клапанов сердца может рассматриваться антимикробный препарат диоксидин, совместимый со всеми видами биологической ткани, нетоксичный и соответственно не требующий длительной предимплантационной подготовки биопротезов [2]. Для решения поставленных задач, а именно изучения антимикробной активности и консервирующих свойств 1%-ного раствора диоксида, его влияния на свойства биоткани при стерилизации и хранении, были проведены доклинические испытания [3].

В рассматриваемой работе мы использовали биологические протезы клапанов сердца из аллогенной и ксеногенной ткани. Аллогенные биопротезы девитализировали в соответствии с технологическим регламентом ЛПБ-ТРП-БиоЛАБ-КриоК-11, принятым в НЦССХ им. А.Н. Бакулева, и помещали для стерилизации в 1%-ный раствор диоксида на 24 ч при температуре 22 °С. После экспозиции в стерилизующем средстве аллопротезы промывали в 0,9%-ном растворе хлорида натрия, помещали в криосохраняющую смесь и хранили в криогенных условиях.

Изготовление ксеноперикардиальных биопротезов клапанов сердца проводили в соответствии с технологическим регламентом ЛПБ-ТРП-БиоЛАБ-КС-11. Для стерилизации и консервации готовые ксенопротезы закладывали в контейнеры с 1%-ным раствором диоксида, хранение которых проводилось в течение 13,5 мес. в термостате с охлаждением («Maxi Artic», «Jouan») при температуре 22 °С. Контроль стерильности хранившихся биопротезов проводился каждые 2-3 мес. двумя методами: методом «прямого посева» и методом оценки стерильности вытяжки из гомогената исследуемого образца с использованием питательных сред – тиогликолевой и жидкой среды Сабуро. Посевы инкубировались в течение 14 дней с ежедневным просмотром и контрольным высевом на плотные питательные среды по окончании инкубации [4].

Для оценки влияния стерилизующих средств и методов обработки на упруго-прочностные характеристики биологических тканей были проведены сравнительные исследования с использованием стандартных методов испытаний образцов на растяжение и определение модулей упругости на универсальной разрывной машине фирмы «ZWICK» (Z2.5/TN1S), ФРГ.

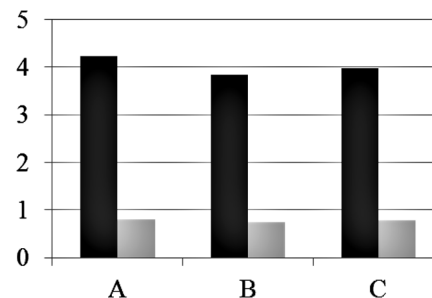
Токсикологические исследования биопротезов после стерилизации в 1%-ном растворе диоксида проводили в аккредитованной Росздравнадзором испытательной лаборатории доклинических исследований «БИОМИР» АНО «ИМБИИТ». В испытаниях на цитотоксичность *in vitro* определяли влияние вытяжек из образцов биоткани на выживаемость суспензионной кратковременной культуры подвижных клеток [5].

Антимикробную активность диоксида изучали в отношении контролируемой микробной нагрузки биологических протезов, используя методы искусственной инокуляции биологической ткани, методы оценки популяции микроорганизмов на продукции [6]. В качестве тест-культур были выбраны резистентные госпитальные штаммы: *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, а также спорообразующая культура *Bacillus cereus*.

Биологические протезы инокулировали суспензиями тест-культур в концентрации 10^6 кл/мл (по McFarland, с использованием прибора «Densi-La-Meter», фирма «bioMerieux», Франция) и выдерживали при условиях, обеспечивающих надежную адгезию микроорганизмов. По окончании экспозиции биопротезы с искусственной микробной нагрузкой помещали: опытные – в 1%-ный раствор диоксида, контрольные – в глюкозный бульон. Через каждые 3 ч в течение суток биопротезы извлекали: контрольные – из глюкозного бульона, опытные – из раствора диоксида, однократно погружая их в стерильный 0,9%-ный раствор хлорида натрия для удаления остатков антимикробного средства. Далее оценивали количество жизнеспособных клеток тест-культур на опытных и контрольных образцах, используя метод дезинтеграции с целью наиболее полного извлечения микробных клеток из исследуемого материала. Полученные гомогенаты помещали на соответствующие плотные питательные среды и в глюкозный бульон. Посевы выдерживали в термостате при температурных режимах, оптимальных для тест-культур: на плотных питательных средах – в течение 24...48 ч, на глюкозном бульоне – в течение 10 дней с ежедневным просмотром и контрольным высевом по окончании инкубации. С целью выявления жизнеспособных клеток тест-микроорганизмов в растворе диоксида (после извлечения исследуемых образцов) последний пропускали через мембранные фильтры («Millipore») с размерами пор

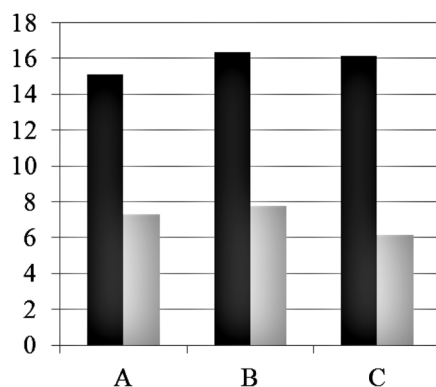
0,45 мкм, которые помещали на поверхность плотной питательной среды и инкубировали в течение 24...48 ч.

Все доклинические исследования проводили в 12 повторностях. Статистическую достоверность различий между группами оценивали по критерию Стьюдента. Все вычисления выполняли с помощью прикладного пакета Statistica 8 («StatSoft Inc.», США).



■ Предел прочности осевой, МПа
■ Предел прочности радиальный, МПа

Рис. 1. Биомеханические свойства аллоткани, $p < 0,001$: А – аллоткань без обработки; В – аллоткань, прошедшая стерилизацию в смеси антибиотиков: клафоран – 1 г, цефазолин – 1 г, амикацин – 500 мг, гентамицин – 80 мг, ампиокс – 500 мг, ванкомицин – 500 мг, метронидазол – 4 мл, RPMI 1640 – до 200 мл; С – аллоткань после стерилизации в 1%-ном растворе диоксида



■ Предел прочности осевой, МПа
■ Предел прочности радиальный, МПа

Рис. 2. Упруго-прочностные свойства ксеноткани, $p < 0,001$: А – ксеноткань, прошедшая обработку по регламенту: 0,625%-ный раствор глутарового альдегида + 1%-ный раствор додецилсульфата натрия; В – ксеноткань после стерилизации в 4%-ном растворе формалина; С – ксеноткань после стерилизации в 1%-ном растворе диоксида

При выборе оптимальных стерилизующих и консервирующих средств предпочтение отдается агентам, которые не изменяют функциональные характеристики биопротезов и не влияют на свойства биоткани. Проведенные сравнительные исследования упруго-прочностных характеристик биологической ткани показали, что пределы прочности, модули упругости,

Таблица 1

Токсикологические испытания биологических протезов

Вид ткани	Способ стерилизации	Наименование показателя	Количество выживших клеток, %	
			Допустимое значение	Результат испытаний
Ксеноткань	4%-ный р-р формалина	Цитотоксичность на суспензионной кратковременной культуре подвижных клеток	70...120	50 ± 5
Ксеноткань	1%-ный раствор диоксида		70...120	85 ± 5
Аллоткань			70...120	85 ± 5

запасы деформативной способности (деформация нарушения сплошности) не имеют статистически значимых различий ($p < 0,001$) при хранении в формалине и диоксидине за весь период исследований (рис. 1, 2). При этом биопротезы из ксеногенной ткани сохраняют стерильность в течение гарантийного срока хранения.

В свою очередь, требования биологической безопасности предъявляются не только к стерилизующим агентам, но и к биопротезам, которые не должны оказывать токсического действия на организм пациента при имплантации изделия. По результатам токсикологических исследований выживаемость клеток суспензионной кратковременной культуры после стерилизации биоткани в 1%-ном растворе диоксидаина и последующей отмывки от стерилизующего средства в течение 1 мин превышает на $(35 \pm 5) \%$ выживаемость клеток после стерилизации образцов в формалине (табл. 1).

Особенности строения и физико-химические свойства диоксидаина определяют его биологические свойства, высокую антимикробную активность препарата, которая повышается в условиях анаэробнозиса. Диоксидин относится к производным ди-N-окси хиноксалина, является препаратом с бактерицидным типом действия, в основе которого лежит повреждение биосинтеза ДНК микробной клетки с глубокими нарушениями структуры нуклеоида уже при действии субингибирующих концентраций [7]. Исследования, выполненные в последние годы в различных центрах, показали, что существенных различий в чувствительности к диоксидину микроорганизмов одного вида, выделенных из различных биоматериалов, выявлено не было, что может свидетельствовать об отсутствии формирования и распространения приобретенной резистентности [8].

При изучении антимикробной активности диоксидаина санация биопротезов, искусственно инокулированных тест-культурами, включая спорообразующий *B. cereus*, наблюдается после 12-часовой экспозиции в 1%-ном растворе диоксидаина (табл. 2). При этом контроль дает сливной рост соответствующих культур.

Фильтрация раствора диоксидаина после извлечения из него опытных биопротезов не выявляет жизнеспособных клеток тест-культур. В свою очередь, фильтрация глюкозного бульона после удаления контрольных биопротезов дает сливной рост соответствующих микроорганизмов.

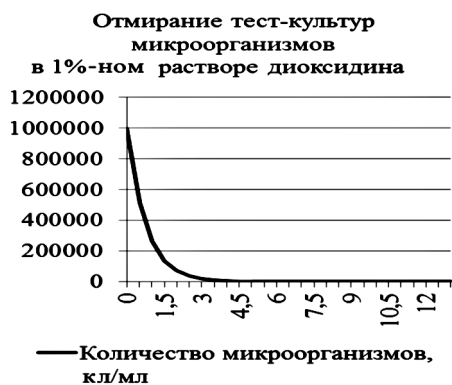


Рис. 3. Отмирание тест-культур микроорганизмов под воздействием 1%-ного раствора диоксидаина: ось абсцисс – время в часах; ось ординат – количество жизнеспособных клеток тест-культур на искусственно инокулированных биопротезах

Известно, что отмирание чистой культуры микроорганизмов при стерилизации медицинских изделий химическими агентами приближенно описывается экспоненциальным законом, т. е. время гибели микроорганизмов под воздействием растворов химических средств зависит от концентрации микроорганизмов, увеличиваясь при возрастании последней. Наличие микроорганизмов после процесса стерилизации выражается в вероятностном виде (10^{-n}) через уровень обеспечения стерильности – SAL [9]. Экспериментально полученное время отмирания тест-культур в 1%-ном растворе диоксидаина позволяет рассчитать фактическое время выдержки биопротезов в этом стерилизующем средстве для достижения уровня обеспечения стерильности SAL 10^{-6} (рис. 3). Фактическая экспозиция биопротезов в 1%-ном растворе диоксидаина составляет 20,2 ч или 24 ч – в практическом применении.

Проведенные доклинические испытания показали, что предложенный способ стерилизации и консервации в 1%-ном растворе диоксидаина достоверно не ухудшает упруго-прочностные свойства биологической ткани протезов, не провоцирует возникновение цитотоксичности биологического материала и соответственно сокращает время подготовки ксенопротезов перед имплантацией до нескольких минут. Все вышесказанное, а также высокая бактерицидная и споридная активность 1%-ного раствора диоксидаина позволяют рассматривать этот препарат в качестве нового универсального стерилизующего и консервирующего средства для биологических протезов клапанов сердца.

Список литературы:

1. Орловский П.И., Гриценко В.В., Юхнев А.Д., Евдокимов С.В., Гавриленко В.И. Искусственные клапаны сердца. – СПб.: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп», 2007. С. 140-150.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей. Т. 2. – М.: Новая Волна, 2001. С. 298-299.
3. Костава В.Т., Бакулева Н.П., Лютова И.Г., Анучина Н.М., Кондратенко Ж.Е., Зеливанская М.В., Терещенкова И.А. Способ стерилизации и предимплантационного хранения биологических протезов из ксеногенной и аллогенной ткани для сердечно-сосудистой хирургии / Патент RU 2457867 С1. 2012.
4. МУК 4.2.2942-11 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях.
5. ГОСТ ISO 10993-5-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы in vitro.
6. ГОСТ Р ИСО 11737-1-2000 Стерилизация медицинских изделий. Микробиологические методы. Часть 1. Оценка популяции микроорганизмов на продукции.
7. Падейская Е.Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции // Инфекция и антимикробная терапия. 2001. № 5. С. 150-155.
8. Попов Д.А., Анучина Н.М., Терентьев А.А., Костюк Г.В., Блатун Л.А., Русанова Е.В. и др. Диоксидин: антимикробная активность и перспективы клинического применения на современном этапе // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58. С. 3-4.

Таблица 2

Эффективность стерилизации биопротезов в 1%-ном растворе диоксидаина

Эффективность стерилизации	Экспозиция, ч							
	3	6	9	12	15	18	21	24
Общее число тест-изделий, подвергшихся обработке диоксидином/число стерильных тест-изделий	6/0	6/0	6/0	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Доля стерильных изделий, %	0	0	0	100	100	100	100	100

9. ГОСТ Р ИСО 14160-2003 Стерилизация одноразовых медицинских изделий, содержащих материалы животного происхождения. Валидация и текущий контроль стерилизации с помощью жидких стерилизующих средств.

Наталья Петровна Бакулева,
канд. хим. наук, зав. лабораторией производства биопротезов, НПО медицинской биотехнологии,
Неля Михайловна Анучина,
научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и антимикробной терапии,
Марина Викторовна Зеливянская,
операционная медицинская сестра лаборатории научных исследований по разработке биопротезов, НПО медицинской биотехнологии,
Вахтанг Тенгизович Костава,
канд. биолог. наук, заведующий, НПО медицинской биотехнологии,

Жаннета Ерофеевна Кондратенко,
ст. научный сотрудник лаборатории научных исследований по разработке биопротезов, НПО медицинской биотехнологии,
Ирина Геннадиевна Лютова,
врач-бактериолог лаборатории производства биопротезов, НПО медицинской биотехнологии,
Дмитрий Александрович Попов,
канд. мед. наук, зав. лабораторией клинической микробиологии и антимикробной терапии,
Ирина Александровна Терещенкова,
ведущий технолог лаборатории научных исследований по разработке биопротезов, НПО медицинской биотехнологии,
ФГБУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева»,
г. Москва, e-mail: nrbakuleva@yandex.ru

Г.А. Дмитриев, А.В. Кирсанова, В.А. Аль-бахели

Автоматизация распознавания границ инсультов головного мозга на основе пороговой обработки магнитно-резонансных изображений

Аннотация

Предлагается алгоритм для обработки изображений магнитно-резонансной томографии, который может эффективно выделить область инсульта головного мозга и рассчитать ее размер путем поиска оптимального порога между областями инсульта и здоровыми тканями головного мозга. Потенциальное преимущество нашего алгоритма заключается в обеспечении высокой точности вычисления размера инсульта головного мозга и сокращении времени анализа изображения, чтобы помочь врачу быстро и эффективно принять решение.

Инсульты головного мозга имеют большое значение для общества по ряду причин: распространенности, высокого уровня инвалидности и смертности. Магнитно-резонансная томография обладает большими диагностическими возможностями в ранней диагностике инсультов головного мозга по сравнению с другими методами лучевой диагностики. Точное определение локализации и размера инсульта головного мозга обладает важной диагностической значимостью, поэтому врачи традиционно используют ручной метод сегментации изображений магнитно-резонансной томографии, который является эффективным, но требует больших временных затрат, и его результат зависит от субъективной интерпретации. Для решения этой проблемы мы предлагаем полностью автоматизированный алгоритм для точного выделения области инсульта головного мозга и вычисления ее размера в пикселах.

На первом этапе проводится предобработка изображения. Она заключается в использовании морфологических методов обработки изображений для удаления тканей кости, которые создают сигнал высокой яркости, затрудняющий процесс распознавания области интереса [9], [10]. Для облегчения работы с изображением оно преобразуется из формата unit16, в котором элементы изображения находятся в интервале {0,65535}, в формат double, при котором пиксели изображения лежат в интервале {0,1} [3].

На втором этапе происходит векторизация изображения, где изображение преобразуется из графического вида в векторный так, что длина вектора равна числу пикселей изображения.

На третьем этапе алгоритма происходит разделение яркости изображения на $L = 10$ уровней и определяется количество точек на каждом уровне [6].

После нескольких десятков экспериментальных измерений уровня яркости МРТ-изображений (T1-взвешенность) [7], [8] было установлено, что точки спинномозговой жидкости имеют яркость меньше 0,2 от уровня сигнала жировой ткани на изображении. Таким образом, можно найти изображение, ко-

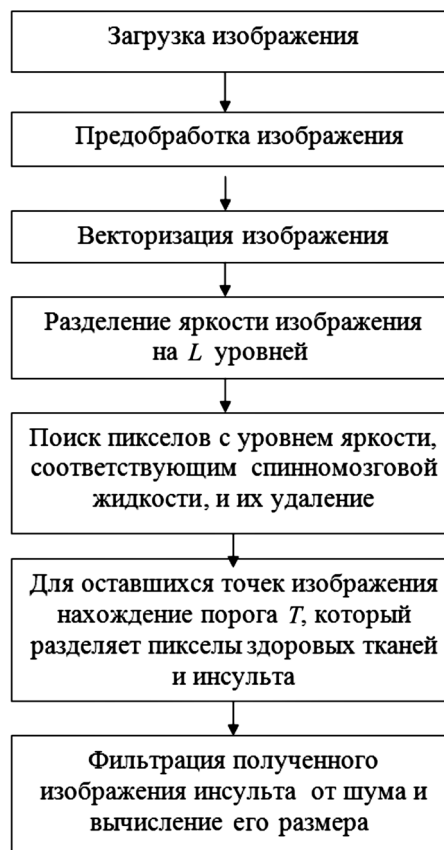


Рис. 1. Алгоритм выделения области инсульта