

ма за счет применения двух, а не трех микросхем является более компактной по сравнению с первой схемой, что немало важно для практического использования в клинической практике.

Результаты исследования характеристик усилительного каскада активных электродов ЭКГ и ЭЭГ

На вход усилительного каскада виртуального активного электрода подавались тестовые сигналы амплитудой 100 мкВ в виде последовательности прямоугольных импульсов, которые регистрировались на выходе. Амплитуда импульсов на выходе оказалась равна 9 В. Импульсы на входе и выходе имеют практически одинаковые времена нарастания переднего фронта и спада заднего фронта, что говорит о качестве преобразования сигнала (рис. 3).

Далее сопоставлялись коэффициенты усиления, измеренные в «Multisim», с расчетными и практическими значениями. Параметры виртуальных и практических осциллограмм совпали с точностью 3 %.

Выводы

Сделано заключение о том, что NI «Multisim» позволяет разрабатывать электроды с виртуальными характеристиками, отличающимися от характеристик реальных электродов не более чем на 3 %, что является приемлемым результатом в рамках поставленной задачи.

Список литературы:

1. *Зенков Л.Р., Ронкин М.А.* Функциональная диагностика нервных болезней: руководство для врачей. – М.: Медпресс-Информ, 2013. 488 с.
2. *Хернтер М.Е.* Multisim. Электронное моделирование в Multisim. – М.: ДМК Пресс, 2011. 501 с.
3. *Хернтер М.Е.* Multisim. Современная система компьютерного моделирования и анализа схем электронных устройств. – М.: ДМК Пресс, 2011. 511 с.
4. *Гатауллин А.М., Овчинников А.В.* Применение оборудования «Сомракт R10» и программной среды «LabVIEW» для одновременной регистрации и обработки биоэлектрических сигналов различного типа // Медицинская техника. 2017. № 1 (301). С. 48-52.

*Айрат Мухамедович Гатауллин,
канд. техн. наук, доцент,
кафедра РЗА,*

*ФГБОУ ВО «Казанский государственный
энергетический университет»,*

*Александр Витальевич Овчинников,
канд. мед. наук, врач-нейрофизиолог,*

*ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина»,
г. Казань,*

e-mail: avitov@yandex.ru

Г.Я. Левин, П.А. Шагалова, Э.С. Соколова, А.Н. Поповичева

Измерение деформируемости эритроцитов на основе автоматизированной обработки изображений

Аннотация

Описан новый способ измерения количественных показателей деформируемости эритроцитов путем автоматизированного анализа изображений, полученных с использованием устройства для деформации эритроцитов, позволяющего фиксировать их глютаральдегидом непосредственно в сдвиговом потоке. Способ измерения характеристик деформируемости эритроцитов включает в себя получение изображения с устройства для деформации эритроцитов в сдвиговом потоке и автоматизированный анализ изображения, включающий в себя преобработку, бинаризацию изображения, выделение объектов на изображении и подсчет их количества, аппроксимацию объектов интереса эллипсом. Результатами обработки являются коэффициент деформируемости каждого эритроцита, а также статистические показатели: функция распределения, среднее значение деформируемости, дисперсия, коэффициент асимметрии. Предложенный способ позволяет оценить распределение эритроцитов по деформируемости и тем самым получить дополнительную диагностическую и научную информацию, повысить точность оценки деформируемости эритроцитов.

Введение

Деформируемость – это способность клеток крови изменять свою форму под действием внешних сил. В настоящее время известно несколько способов измерения деформируемости эритроцитов [1]. Это втягивание эритроцитов в микропипетку, растягивание эритроцитов лазерным пинцетом, видеосъемка эритроцитов, деформированных в сдвиговом потоке силами вязкого трения. Однако эти методы являются весьма сложными, трудоемкими и требуют большого времени для измерений и обработки данных.

Одним из наиболее удобных методов измерения деформируемости эритроцитов является лазерная дифрактометрия эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрия) [2]. Данный метод основан на наблюдении и анализе дифракционных картин, возникающих при рассеянии лазерного пучка на суспензии эритроцитов, деформированных в сдвиговом потоке силами вязкого трения. Этот наиболее распространенный метод измерения деформируемости эритроцитов имеет принципиаль-

ный недостаток: все параметры деформируемости, которые возможно получить данным способом, связаны не с непосредственным измерением характеристик самих эритроцитов, а с наблюдением и анализом дифракционных картин, возникающих при рассеянии лазерного пучка на суспензии эритроцитов, деформированных в сдвиговом потоке. Кроме относительной точности метода, он обладает и другими недостатками. Известно, что в крови любого человека разные эритроциты обладают различной способностью к деформации. Лазерная дифрактометрия не позволяет судить о деформируемости отдельных эритроцитов, не дает возможности характеризовать степень неравномерности распределения эритроцитов по деформируемости, не позволяет оценить число эритроцитов, коэффициент деформируемости которых находится в определенном диапазоне значений (а также произвести расчет других величин, характеризующих ансамбль эритроцитов).

Все перечисленные параметры можно измерять лишь методом прямого наблюдения за эритроцитами, полученными и зафиксированными в сдвиговом потоке. Этот метод возмож-

но осуществить при помощи устройства, в котором, как и в лазерном эктацитометре, происходит деформация эритроцитов в сдвиговом потоке. Принципиальным отличием данного устройства от эктацитометра является то, что деформированные эритроциты фиксируются непосредственно в сдвиговом потоке глутаральдегидом [3], который вводится в суспензию эритроцитов через специальное отверстие. Полученное при помощи такого типа устройства изображение эритроцитов анализируется посредством светового микроскопа. Оценка деформируемости основывается на визуальном определении того, является каждый эритроцит деформированным или нет [4]. Метод субъективен, полностью зависит от субъективного мнения оператора (лаборанта), не позволяет измерять характеристики показателей деформируемости эритроцитов.

Нами разработан новый способ измерения количественных показателей деформируемости эритроцитов путем автоматизированного анализа изображений, полученных с использованием устройства для деформации эритроцитов в сдвиговом потоке. Способ измерения характеристик деформируемости эритроцитов включает в себя получение изображения (цифровой фотографии) с устройства для деформации эритроцитов в сдвиговом потоке и автоматизированный анализ изображения, включающий в себя предобработку и бинаризацию изображения, выделение объектов на изображении и подсчет их количества, аппроксимацию объектов интереса эллипсом. Результатами обработки являются коэффициент деформируемости каждого эритроцита, а также статистические показатели: функция распределения, среднее значение деформируемости, дисперсия, коэффициент асимметрии. Данный способ позволяет оценить распределение эритроцитов по деформируемости и тем самым получить дополнительную диагностическую и научную информацию, повысить точность оценки деформируемости эритроцитов.

Материалы и методы

Суспензию эритроцитов (0,1 мл крови на 1,5 мл физиологического раствора) вводят через отверстие во внутреннем цилиндре (диаметром 35 мм) в зазор между двумя коаксиальными цилиндрами (один из которых неподвижен, а другой может вращаться). Наружный цилиндр (диаметром 36 мм) при введении вращается с небольшой скоростью (~ 1000 об/мин) для предотвращения седиментации эритроцитов. Далее скорость вращения в течение 3...5 с доводят до необходимого значения (4600 об/мин). Еще через 20 с через отверстие во внутреннем цилиндре вводят глутаральдегид для фиксации эритроцитов, а еще через 10 с вращение прекращают, исследуемый образец помещают под микроскоп («Carl Zeiss Primo Star») и выполняют снимок деформированных в сдвиговом потоке эритроцитов цифровой камерой с характеристиками: CMOS-матрица формата 1/2 дюйма, цветная, 3,1 Мпикселя, размер кадра 2048 x 1536 пикселей, формат кадра png.

Распределение скорости в зазоре между цилиндрами является линейным. Это связано с тем, что в данном приборе вращается наружный, а не внутренний цилиндр. Кроме того, при используемых скоростях вращения число Рейнольдса не превышает критического значения, а сама вытянутая форма эритроцитов подтверждает, что течение в зазоре ламинарное.

Проведенный анализ научных работ в области автоматизации задач анализа медицинских изображений показал, что успешно используемым инструментом для поиска объектов интереса на изображениях является бинаризация. Причем для улучшения качества бинаризации авторы часто дополнительно используют медианный фильтр и морфологические операции. В связи с этим было проведено исследование и принято решение использовать данные алгоритмы компьютерного зрения для поиска деформированных эритроцитов на изображении.

Таблица 1

Влияние термической травмы на деформируемость эритроцитов

Параметры деформируемости	Контроль	3...5-е сутки после ожога	12...16-е сутки после ожога	20-е и более сутки после ожога
Максимально удлиненные клетки, %	19,6 ± 1,51	4,9 ± 0,57*	5,92 ± 0,62*	6,81 ± 0,74*
Дисперсия	1,19 ± 0,15	0,53 ± 0,049*	0,55 ± 0,061*	0,72 ± 0,069*
Общая деформируемость, %	91,04 ± 6,35	78,3 ± 13,75*	75,71 ± 12,71*	72,91 ± 16,64*
Коэффициент деформируемости	2,76 ± 0,22	2,34 ± 0,36*	2,32 ± 0,34*	2,27 ± 0,34*
Коэффициент удлинения	0,42 ± 0,04	0,36 ± 0,06*	0,35 ± 0,06*	0,34 ± 0,07*

Примечание: * $p < 0,05$ – сравнение с контролем, критерий Манна-Уитни.

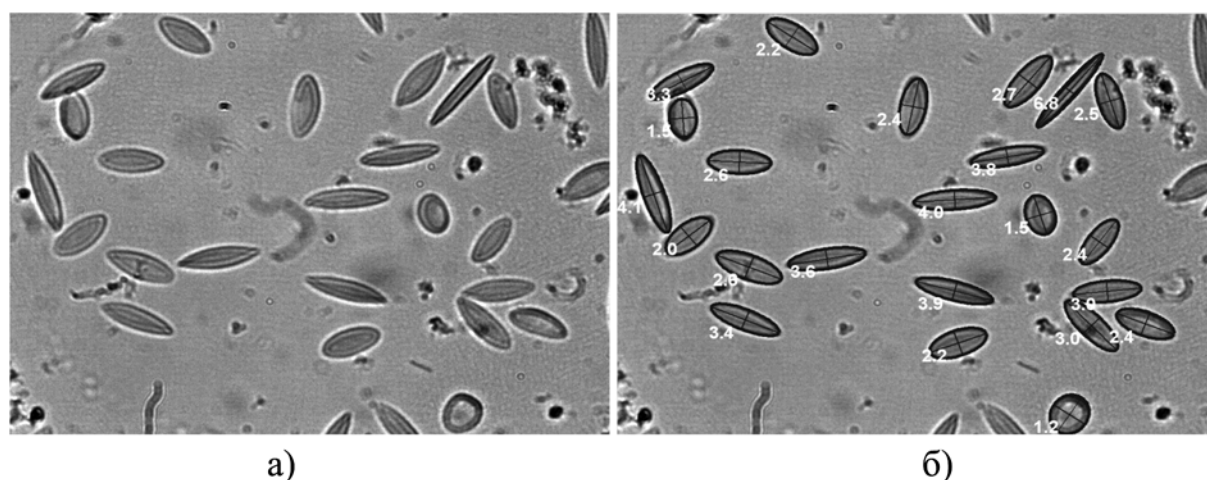


Рис. 1. Исходное изображение эритроцитов, полученных в сдвиговом потоке (а); результат автоматизированной обработки изображения эритроцитов, полученных в сдвиговом потоке (б)

Для корректной обработки результатов бинаризации в нашей задаче, в отличие от других задач обработки изображений, необходимо учесть несколько факторов. Во-первых, искомыми объектами – деформируемые эритроциты – имеют форму эллипса и оценка деформируемости каждого эритроцита проводится по параметрам эллипса – его полуосям. Во-вторых, несмотря на то что после подготовки исследуемого материала деформированные эритроциты являются основными объектами, на изображении в то же время могут присутствовать мелкие вкрапления или наблюдаться визуальные перекрытия объектов. Описанные случаи влияют на результат бинаризации и могут быть ошибочно трактованы как объекты, что требует дополнительной обработки объектов изображения после его бинаризации.

Учитывая вышесказанное, алгоритм решения поставленной задачи включает в себя:

- поиск объектов на изображении;
- аппроксимацию контура каждого объекта эллипсом;
- удаление объектов неэллипсоидальной формы, появившихся из-за неоднородности фона, шума, дефектов, визуального перекрытия одних эритроцитов другими;
- оценку деформируемости эритроцитов (по полуосям эллипсов).

Реализация программы, осуществляющей обработку изображения, выполнена в среде MATLAB. Входные изображения имеют размер 2048 x 1536 пикселей, в результате обработки снимка стандартными средствами языка MATLAB размер снимка не изменяется. Рассмотрим каждый шаг разработанного алгоритма.

С целью повышения качества распознавания показателей деформируемости эритроцитов на первом шаге выполняется предобработка изображения встроенной функцией *medfilt2*, основанная на применении медианного фильтра, устраняющего импульсный шум. Перед применением медианного фильтра изображение переводится из полноцветного изображения в изображение в оттенках серого посредством стандартной функции *rgb2gray*.

Для бинаризации изображений в результате исследований был выбран адаптивный алгоритм Брэдли [5]. Исследуемое изображение разбивается на области со сторонами, ширина которых равна $1/8$ изображения. Для каждой области вычисляется среднее значение яркости пикселей (Im), к которому прибавляется значение t (10 % от среднего значения). Полученная величина $Im + t$ является порогом бинаризации данной области, с которым сравнивается яркость каждого пикселя. Так как реализация алгоритма бинаризации методом Брэдли в MATLAB отсутствует, был написан скрипт *binarization_bradley*, реализующий данный алгоритм.

К полученному бинаризованному изображению применяются морфологические операции: морфологическое закрытие – с целью сгладить разрывы внутри распознаваемых объектов, морфологическое открытие – с целью удаления мелких объектов, не являющихся эритроцитами. Реализация морфологических операций выполнена с использованием встроенной функции *bwmorph*.

Для определения контуров объектов, полученных в результате бинаризации, предложено использовать стандартный алгоритм, реализованный в функции *bwboundaries*. Дальнейшую обработку реализуем следующим образом: аппроксимируем контур каждого объекта, найденного в результате бинаризации, эллипсом (вытянутые в сдвиге потока эритроциты моделируются как эллипсы). Контур каждого объекта представляет собой множество точек в декартовой системе координат. Подставляя поочередно каждую точку контура в уравнение эллипса, получаем неопределенную систему уравнений, где количество уравнений больше, чем количество переменных. Решая систему уравнений методом наименьших квадратов, найдем наилучший эллипс, покрывающий набор точек контура рассматриваемого объекта. Подробное описание процесса аппроксимации точечных значений функции эллипсом с использованием метода наименьших квадратов представлено

в [6]. Для реализации предложенного метода аппроксимации написан собственный скрипт *fit_ellipse*.

Таким образом, для каждого объекта получены контур и аппроксимирующий его эллипс. Алгоритм проверки того, являются ли найденные объекты искомыми деформированными эритроцитами, заключается в следующем. Исходный объект ограничивается выпуклым многоугольником, и находится отношение площади эллипса, аппроксимирующего данный объект, к площади многоугольника. Если отношение площадей отличается от единицы меньше, чем на 5 % (значение подобрано эмпирическим путем при анализе множества из 150 изображений), то считается, что объект является искомым объектом – деформированным эритроцитом. Для построения выпуклого многоугольника был использован стандартный метод построения минимальных выпуклых оболочек Грэхема, где обход контура реализован против часовой стрелки с отбрасыванием точек, в которых выполняется правый поворот. Использование программной реализации данного метода в среде MATLAB дает многоугольник, границы которого изменяются достаточно гладко: количество сторон многоугольника при аппроксимации одного объекта лежит в интервале от 20 до 30, при этом длина одной стороны составляет 3...4 пикселя.

На практике из-за неоднородности эритроцитов на изображениях могут встречаться мелкие объекты внутри деформированных эритроцитов. Их также исключаем из рассмотрения, проверяя попарно найденные объекты и определяя, лежат ли точки контура одного объекта внутри многоугольника, ограничивающего другой объект, при помощи встроенной функции *inpolygon*.

Данные о найденных эритроцитах и аппроксимирующих их эллипсах используются для вычисления коэффициента их деформируемости, равного отношению большей оси эллипса к малой оси, а также альтернативной оценки деформируемости – коэффициента удлинения, вычисляемого как отношение разности полуосей эллипса к их сумме. Определяем среднее значение коэффициента деформируемости для всей совокупности эритроцитов, значение дисперсии, коэффициент асимметрии и строим график распределения эритроцитов по коэффициентам деформируемости.

Пример обработки изображения эритроцитов представлен на рис. 1, где выделены распознанные программой эритроциты и указаны соответствующие им коэффициенты деформируемости.

Результаты

Приведем клинические примеры, полученные путем автоматизированного способа обработки изображений, деформированных в сдвиге потока.

1. Донор П. Возраст – 27 лет.

Деформируемость эритроцитов (число эритроцитов, значение коэффициента деформируемости которых более чем $1/2$) – 93,6 %.

Среднее значение коэффициента деформируемости – 3,09.

Количество максимально удлиненных клеток (значение коэффициента деформируемости которых более 4,0) – 19,6 %.

Дисперсия – 1,19.

Среднее значение коэффициента удлинения – 0,47.

2. Большой Т. Возраст – 10 лет, ожог 1-3 степени площадью 20 % поверхности тела. Анализ через 4 дня после травмы в стадии ожоговой токсемии.

Деформируемость эритроцитов – 80,7 %.

Среднее значение коэффициента деформируемости – 2,5.

Количество максимально удлиненных клеток – 5,3 %.

Дисперсия – 0,56.

Среднее значение коэффициента удлинения – 0,36.

3. Тот же больной через 32 дня после лечения, при выписке.

Деформируемость эритроцитов – 85,6 %.

Среднее значение коэффициента деформируемости – 2,7.

Количество максимально удлиненных клеток – 4,2 %.

Дисперсия – 0,54.

Среднее значение коэффициента удлинения – 0,37.

Таким образом, у данного больного отмечено значительное ухудшение всех параметров деформируемости эритроцитов в период ожоговой токсемии. Наиболее значимым является снижение количества наиболее удлиненных (деформированных) эритроцитов, что отражается и на показателе дисперсии. Отметим, что это невозможно оценить с использованием существующих способов измерения деформируемости эритроцитов. Важное значение имеют данные, полученные при выписке больного. Удалось выяснить, что в этом случае при выписке больного остаются значимыми данные о сниженной деформируемости эритроцитов даже после проведенного лечения, при полностью закрытых ожоговых ранах. Нарушенная деформируемость эритроцитов при выписке может являться причиной анемии, нарушения микроциркуляции, а отсюда – сохранения органной недостаточности.

Безусловно, у рассматриваемого алгоритма имеется перспектива практического использования в клинической медицинской практике. Уже в настоящее время он применяется в исследовании на тему «Реологические свойства крови у детей с воспалительными заболеваниями кишечника» и в работе «Реологические свойства крови при острой и хронической гипоксии». Приведем пример его использования при острой гипоксии.

Заключение

Предложенный способ позволяет провести анализ количественных характеристик деформируемости эритроцитов, что позволяет значительно повысить точность метода и получить дополнительную информацию о процессе деформируемости красных клеток крови. Это имеет не только важное практическое значение, так как позволяет оценить особенности патогенеза заболевания, эффективность лечения, но и важное научное значение. Конечной целью познания ключевых универсальных механизмов повреждения мембран клеток (которую характеризует деформируемость эритроцитов) может явиться разработка патогенетически обоснованной стратегии восстановления функциональных свойств клеток при патологии.

Список литературы:

1. *Dobbe J.G.G., Hardeman M.R., Streekstra G.J., Starckee J., Ince C., Grimbergen C.A.* Analyzing red blood cell-deformability distributions // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2002. Vol. 28. № 3. PP. 373-384.
2. *Bessis M., Mohandas N.* A diffractometric method for the measurement of cellular deformability // *Blood cells*. 1975. Vol. 2. № 1. PP. 307-313.
3. *Левин Г.Я., Яхно В.Г., Царевский Н.Н., Котяева Н.П.* Устройство для деформации эритроцитов в сдвиговом потоке / А. с. 1363065. Опубликовано 30.12.1987 г. Бюл. № 48.
4. *Левин Г.Я., Царевский Н.Н., Котяева Н.П.* Способ определения деформируемости эритроцитов / А. с. 1377111. Опубликовано 29.02.1988. Бюл. № 8.
5. *Bradley D., Roth G.* Adapting Thresholding Using the Integral Image // *Journal of Graphics Tools*. 2007. Vol. 12. №. 2. PP. 13-21.
6. *Margalit D., Rabinoff J.* Interactive Linear Algebra. – Georgia Institute of Technology, 2017. P. 430.

*Григорий Яковлевич Левин,
д-р мед. наук, профессор, руководитель,
отделение гравитационной хирургии и гемодиализа,
ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский
медицинский университет» Минздрава России,
Полина Анатольевна Шагалова,
ст. преподаватель,
Элеонора Станиславовна Соколова,
д-р техн. наук, профессор, зав. кафедрой,
кафедра «Информатика и системы управления»,
Нижегородский государственный технический
университет им. Р.Е. Алексеева,
Александра Николаевна Поповичева,
мл. научный сотрудник,
отделение гравитационной хирургии и гемодиализа,
ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский
медицинский университет» Минздрава России,
г. Н.-Новгород,
e-mail: polli-shagalova@yandex.ru*

*В.С. Чудинов, И.В. Кондюрина, В.Н. Терпугов, И.Н. Шардаков,
В.В. Маслова, С.Ю. Солодников, И.В. Фефилова, А.В. Кондюрин*

Плазменно-ионная обработка полиуретановых имплантатов для уменьшения реакции отторжения организма

Аннотация

Полиуретан медицинского назначения на основе СКУ-ПФЛ обработан ионами азота с энергией 20 кэВ и имплантирован в организм крыс. После одного месяца образцы тканей с имплантированным полиуретаном извлекали и проводили гистологический анализ. Статистически показано, что толщина капсулы, которая образуется как результат реакции организма на инородное тело, значительно меньше для обработанных образцов полиуретана.

Введение

Плазменно-ионная обработка полиуретановых имплантатов позволила активировать их поверхность до появления карбонизованных областей, содержащих конденсированные ароматические структуры с неспаренным электроном при атоме углерода на краю ароматического кластера [1]. Ранее было показано, что такой углеродный атом способен обеспечить ковалентную связь с молекулой белка, адсорбированной на поверхности полиуретанового имплантата [2]. Высокая поверхностная энергия обработанного полиуретана и, в частности, высокая полярная компонента поверхностной энергии обеспечили адсорбцию воды на поверхности имплантата и полярные межмолекулярные взаимодействия молекулы белка с по-

верхностью обработанного полиуретана [3]. В результате такого взаимодействия конформация белка и его биологическая активность сохраняются при адсорбции белка на поверхности обработанного полиуретана. Это подтверждается высокой адгезией и высокой степенью пролиферации клеток из клеточных культур в экспериментах *in vitro* [4]. В данной статье представлены результаты по вживлению таких обработанных полиуретановых имплантатов в организм лабораторных животных.

Материалы и методы

Синтез медицинского полиуретана СКУ-ПФЛ проводился по методике, описанной в работе [5]. Полученные пленки полиуретана обрабатывались ионами азота с энергией 20 кэВ с