

УДК 004.9+007:57+615.47

К вопросу о стробоскопии при исследовании двигательной активности цилиарного аппарата

Д.С. Алексеев

Научно-производственная компания «Азимут»

Аннотация: С точки зрения исследования двигательной активности цилиарного аппарата обсуждается стробоскопический метод в сравнении с основным сейчас методом скоростного видео, в их развитии. Показаны трудности стробоскопического метода. Выявляются технические параметры, которые требуются для создания комплекса исследования со стробоскопическим каналом на современном этапе развития методов на новой доступной элементной базе.

Ключевые слова: двигательная активность цилиарного аппарата; стробоскопический эффект; метод компьютерной видеомикроскопии

Периодические движения начиная с частот выше нескольких герц недоступны для изучения невооружённым глазом при обычном освещении из-за инерционности зрения. В начале XIX в. был открыт принцип стробоскопического метода, который стал применяться физиками для изучения законов движения колеблющихся тел. Стробоскопический эффект позволяет изучать периодические движения, при этом видимая частота колебания в стробоскопе равна разности между частотой изучаемого колебания и частотой импульсного освещения (в случае близости этих частот). В медицине стробоскопический метод был применён для изучения колебаний барабанных перепонок, а затем для изучения движения голосовых связок у человека [1].

Для изучения двигательной активности цилиарного аппарата (ДАЦА) стробоскопический метод был введён в серии работ Дж. Грэя [2]. К тому времени для исследования ДАЦА уже стали применять фотоэлектрический метод, который не даёт движущегося изображения и поэтому в статье детально не рассматривается, и метод скоростной киносъёмки, который тоже даёт возможность просмотра колебаний в замедленном режиме и который

стали предпочитать. Причиной этого предпочтения являются бурное развитие скоростной кинотехники и то обстоятельство, что для эффективных стробоскопических измерений колебания должны совершаться с фиксированной скоростью в течение некоторого времени, то есть стабильность частоты колебательного процесса должна быть не хуже частоты наблюдения, которая для прямых стробоскопических наблюдений например голосовых связок обычно около 0,2 Гц.

Проблема стабильности колебаний

Звуковые колебания могут приближаться к уровню стабильности в десятые доли герца; к тому же возможна автоподстройка фазы стробоскопических вспышек по звуку, что в итоге привело к тому, что в фониатрии стробоскопия для исследования работы голосовых связок стала рутинной процедурой.

Что же касается исследований ДАЦА, то уже Дж. Грэй обсуждает проблему нестабильности колебаний для стробоскопии колебания ресничек (см. рис. 1).

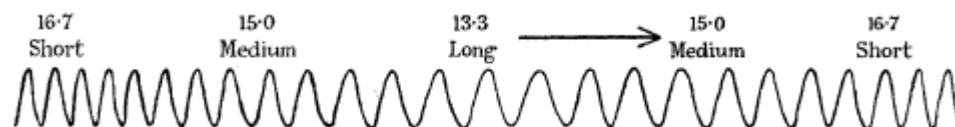


Рис. 1. - Пример хода колебания ресничек (утрированный) в работе [2] по стробоскопическому исследованию двигательной активности цилиарного аппарата мидии. Частота колебания меняется от 13,3 до 16,7 Гц при среднем значении 15,0 Гц; среднеквадратичное отклонение около 1 Гц. Чтобы удерживать наблюдение в стробоскопическом режиме, исследователю необходимо выработать навык регулировки частоты следования вспышек света, успевая подстраивать её с точностью не хуже 0,1 Гц со временем реакции в доли секунды.

В последующем встречаются единичные работы, упоминающие стробоскоп. Более того, встречаются измерения частоты колебаний стробоскопическим методом с точностью в доли герца [например, 3]. Исследователи ДАЦА время от времени пробовали использовать стробоскопию по Грэю; при этом в работах, обобщающих этот опыт, стробоскопический метод оценивался как уступающий методу скоростного видео в следующих формулировках: «Хотя стробоскопический метод удобен для анализа движений, которые повторяются с равномерной скоростью, таких как нормальные движения жгутиков и ресничек, невозможно обнаружить переходные процессы, которые могут привести к более глубокому пониманию механизмов, лежащих в основе этих явлений» [4].

Стробоскопия на кратной частоте

Ещё одной причиной редкости стробоскопических исследований ДАЦА можно положить то обстоятельство, что в отличие например от классического кинотеатра, где вспышки идут на частоте 24 Гц, импульсы света с типичной для мерцательного эпителия частотой несколько выше 10 Гц по ощущению не сливаются, и импульсный характер освещения на такой частоте не комфортен для наблюдателя. Одним из вариантов ухода от этого является стробоскопия на кратной частоте. При освещении на удвоенной или утроенной частоте проблема дискомфорта устраняется. Однако при этом исследователь видит одновременно наложенные друг на друга две или три фазы движения (или более, соответственно целочисленному соотношению частот). При определённом навыке такой способ позволяет и измерять частоту колебаний, и наблюдать форму ресничек и жгутиков, и такие единичные исследования проводились (см. рис. 2, 3).

В модификациях фотоэлектрического метода для исследования ДАЦА стали использовать преобразование Фурье [например, 7], что не даёт

исследовать движущееся изображение и в результате не даёт никакой иной характеристики колебаний, кроме основной частоты. В конце прошлого века при взрывном развитии компьютерной техники метод скоростной съёмки стал частью нового метода — компьютерной видеомикроскопии, который в силу этого часто именуется по-старому методом скоростного видео (high speed video), понимая под этим по умолчанию последующую оцифровку и компьютерную обработку оцифрованного движущегося изображения на основе преобразования Фурье [например, 8]. Это дало хорошую повторяемость результатов и превратило метод компьютерной видеомикроскопии в разряд стандартной техники исследования ДАЦА.

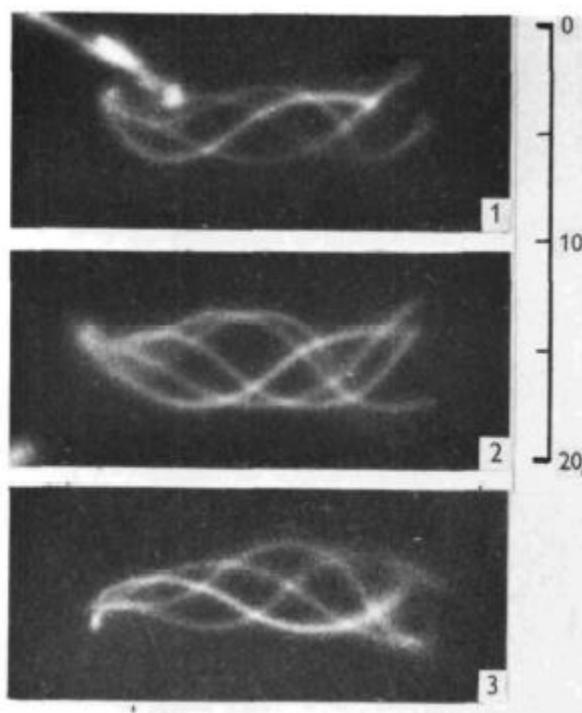


Рис. 2. - Одноклеточная водоросль *Polytoma uvella* [5]

Частота наблюдения 60 Гц, кратность частот 5, частота колебания жгутика 12 Гц.



Рис. 3. - Хламидомонада Рейнхардта [6]. Кратность 3

Однако при всех плюсах метода скоростного компьютерного видео у него остаются и недостатки:

- нет наблюдения и измерения в реальном времени;
- исследования *in vitro* дают существенные искажения движения против *in vivo*;
- по-прежнему массовым результатом исследований является одна лишь частота колебаний.

Остановимся на этом подробнее.

Проблема наблюдения и измерения в реальном времени

При исследовании методом скоростной съёмки и выросшим из него методом компьютерной видеомикроскопии последовательно происходит сначала скоростная съёмка, а затем замедленное воспроизведение (и подсчёт). Стробоскопия — метод, принципиально обеспечивающий наблюдение в реальном времени, и таким образом исследователь видит процесс, более близкий к реальным явлениям.

Для компьютерного подсчёта используется однажды произведённая видеозапись. Поскольку о работе в реальном времени уже речи нет, то компьютерные программы и не ставят задачи работать со скоростью реального времени. Массовая компьютерная техника и не даёт такой возможности.

In vitro против in vivo

Проба, изъятая из слизистой, в которой обеспечивался мукоцилиарный транспорт, после помещения *in vitro* оказывается без зацепления со слоем слизи и начинает работать в режиме холостого хода. Это обуславливает повышение частоты колебаний и изменение формы колебаний. В литературе встречаются констатации того, что при точности измерений частоты колебаний в доли герца средние значения частот, полученные различными методами, отличаются друг от друга с систематическим отклонением в герц и более [3]. Уже одно это является достаточной иллюстрацией того, что процедура приготовления препаратов *in vitro* вносит качественные искажения в тот процесс, который мы изучаем. Поэтому необходимо иметь в виду научно обоснованные поправки, а при разработке новых средств исследования обращать внимания на те методы, которые можно использовать *in vivo*. И это имеет отношение к различию метода компьютерной видеомикроскопии, как правило предполагающего приготовление препаратов *in vitro*, и метода стробоскопии, работающего в реальном времени и который можно использовать для исследования ДАЦА *in vivo*.

О результатах исследований ДАЦА

По-прежнему массовым результатом исследований методом компьютерной видеомикроскопии является одна лишь частота колебаний. Это связано с распространённостью преобразования Фурье и похожих методов для анализа периодических движений, дающих на выходе спектр частот. Массовые скоростные видеокамеры, используемые для этих исследований, имеют частоту кадров порядка 100 Гц. На соседних кадрах полученной таким образом записи изображения реснички находятся в резко отличных друг от друга дискретных фазах. Для обработки при помощи преобразования Фурье это допустимо, но даёт результаты только в виде частотного спектра. Стробоскопический же метод даёт увидеть плавные

изменения; регулируя девиацию, можно менять скорость колебания, остановить его в интересующей фазе, запустить в обратном направлении — и всё это в реальном времени на реальном живом объекте.

Снова стробоскопия?

В связи с этим возникает вопрос, какие научно обусловленные технические параметры можно предъявить современному комплексу для наблюдения ДАЦА со стробоскопическим каналом. Тем более что для целей импульсного освещения операционного поля у нас теперь есть доступные долговечные светодиоды против дорогих капризных импульсных газоразрядных ламп с очень ограниченным ресурсом, что были раньше.

Кратность частот

При исследовании движения такого коллективного движения, каким являются колебания мерцательного эпителия, представляется, что комплекс должен иметь возможность наблюдения при кратности частот 1, 2 и 3 — не более, поскольку при больших значениях кратности изображение большого числа ресничек будет неразборчивым (в этом отличие от наблюдения за колебанием например жгутика одноклеточного организма, которое удобно исследовать и при большем значении кратности частот).

Скважность

В литературе авторы нечасто указывают эту характеристику импульсного освещения. В качестве примера можно привести наблюдение при частоте следования импульсов 80 Гц с указанной длительностью вспышки 1 мс [9], что даёт скважность 12,5. Представляется, что значение скважности импульсов около 10 является обычным, и его и нужно предъявить в виде требуемого параметра, наряду с возможностью наблюдения в непрерывном режиме.

Автоподстройка / внешнее задание фазы

Результаты многочисленных исследований в статистическом количестве показывают, что стабильность частоты колебания ДАЦА полости носа человека составляет около 1 Гц при наблюдении в течение нескольких десятков секунд [10]. Для компьютерной видеомикроскопии это приемлемо, а для наблюдений в стробоскопическом режиме без автоподстройки фазы придётся ловить непродолжительные периоды в несколько секунд, в течение которых стабильность колебания окажется в пределах необходимых десятых долей герца. При этом в стробоскопическом режиме удастся наблюдать всего несколько периодов колебания. В связи с нестабильностью колебаний цилиарного аппарата следует предусмотреть возможность построения комплекса наподобие фониатрического, в котором осуществляется автоподстройка фазы стробоскопического освещения по звуку.

Таким образом, стробоскопический комплекс должен иметь возможность как автономной работы, так и с захватом фазы частоты, задаваемой внешним источником, с последующей регулируемой отстройкой частоты следования импульсов света от задающей. Это позволяет получить исследовательский комплекс, работающий вне зависимости от того, каким образом получен задающий сигнал, либо вовсе без него.

Девиация частоты

Комплекс должен иметь блок отстройки частоты от внешней задающей с регулируемой девиацией в пределах плюс-минус 1 Гц с шагом не грубее 0,1 Гц.

Выводы

Построенный таким образом комплекс для исследования ДАЦА вероятно сможет обойти перечисленные трудности стробоскопического метода и дать качественно новые результаты в исследовании колебаний



мерцательного эпителия, недоступные методу компьютерной видеомикроскопии.

Автор приносит глубокую благодарность д.т.н., проф. Е.П. Попечителеву за поддержку этой работы.

Литература

1. Oertel M. Ueber eine neues laryngostroboskopische Untersuchungsmethode des Kehlkopfes. Centralblatt Medizinischen Wiss., 16: 81–82 (1878).
2. Gray J. Photographic and Stroboscopic Analysis of Ciliary Movement Proceedings of The Royal Society of London. Series B, Containing Papers of A Biological Character, 01/1930; 107(751): 313-332 (1930).
3. Yager J., Chen T.M., Dulfano M.J. Measurement of frequency of ciliary beats of human respiratory epithelium. Chest. 1978 May; 73(5): 627-33 (1978).
4. Holwill M.E.J. The Motion of Strigomonas Oncopelti. The Journal of Experimental Biology, 42: 125-137 (1965).
5. Brokaw C.J. Movement of the Flagella of Polytoma Uvella. The Journal of Experimental Biology, 40, 149–156 (1963).
6. Kamiya R., Okamoto M. A Mutant of Chlamydomonas Reinhardtii that Lacks the Flagellar Outer Dynein Arm but Can Swim. Journal of Cell Science, 74: 181-191 (1985)
7. Teichtahl H., Wright P.L., Kirsner R.L. Measurement of in vitro ciliary beat frequency: a television-video modification of the transmitted light technique. Medical & Biological Engineering & Computing. 1986 Mar; 24(2): 193-196 (1986).
8. Sisson J.H., Stoner J.A., Ammons B.A., Wyatt T.A. All-digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. Journal of Microscopy V. 211 (2003), Issue 2: 103–111.



9. Mogami Y., Sekiguchi Sh., Baba Sh. Beating of cilia of sea urchin embryos - A critical comparison of the normal and reversed beating of cilia of isolated cells. *Journal Of Experimental Biology*, 175: 251-266 (1993).

10. Козлов В.С., Державина Л.Л., Аверин А.А., Крамной А.И., Лукашевич Ю.А. Исследование мерцательного эпителия полости носа *in vitro*. *Российская ринология*, 2005№4: 22-25 (2005).

References

1. Oertel M. Ueber eine neues laryngostroboskopische Untersuchungsmethode des Kehlkopfes. *Centralblatt Medizinischen Wiss.*, 16: 81–82 (1878).

2. Gray J. Photographic and Stroboscopic Analysis of Ciliary Movement *Proceedings of The Royal Society of London. Series B, Containing Papers of A Biological Character*, 01/1930; 107(751): 313-332 (1930).

3. Yager J., Chen T.M., Dulfano M.J. Measurement of frequency of ciliary beats of human respiratory epithelium. *Chest*. 1978 May; 73(5): 627-33 (1978).

4. Holwill M.E.J. The Motion of *Strigomonas Oncopelti*. *The Journal of Experimental Biology*, 42: 125-137 (1965).

5. Brokaw C.J. Movement of the Flagella of *Polytoma Uvella*. *The Journal of Experimental Biology*, 40, 149–156 (1963).

6. Kamiya R., Okamoto M. A Mutant of *Chlamydomonas Reinhardtii* that Lacks the Flagellar Outer Dynein Arm but Can Swim. *Journal of Cell Science*, 74: 181-191 (1985)

7. Teichtahl H., Wright P.L., Kirsner R.L. Measurement of *in vitro* ciliary beat frequency: a television-video modification of the transmitted light technique. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 1986 Mar; 24(2): 193-196 (1986).



8. Sisson J.H., Stoner J.A., Ammons B.A., Wyatt T.A. All-digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. *Journal of Microscopy* V. 211 (2003), Issue 2: 103–111.

9. Mogami Y., Sekiguchi Sh., Baba Sh. Beating of cilia of sea urchin embryos - A critical comparison of the normal and reversed beating of cilia of isolated cells. *Journal Of Experimental Biology*, 175: 251-266 (1993).

10. Kozlov V.S., Derzhavina L.L., Averin A.A., Kramnoj A.I., Lukashevich Ju.A. Issledovanie mercatel'nogo jepitelija polosti nosa in vitro. *Rossijskaja rinologija*, 2005№4: 22-25 (2005).