

**Шамик Виктор Борисович** – ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России; e-mail: prof.shamik@pochta.ru; 344091, г. Ростов-на-Дону, ул. 339-Стрелковой Дивизии, 14, ГБУ РО «Областная детская больница»; тел.: 88632970682, +79185577736; кафедра детской хирургии и ортопедии; д.мед.н.; профессор.

**Давуд Башар Ахмад** – e-mail: bashar\_amd@hotmail.com; тел.: 88632970682, +79885620309; кафедра детской хирургии и ортопедии; аспирант.

**Shamik Viktor Borisovich** – GBOU VPO "Rostov State Medical University" Health Ministry of Russia; e-mail: prof.shamik@pochta.ru; 14, 339<sup>th</sup> Rifle Division street, Rostov-on-Don, 344091, Russia; phones: +78632970682, +79185577736; the department of pediatric surgery and orthopedics; dr. of med. sc.; professor.

**Bashar Ahmad Dawood** – e-mail: bashar\_amd@hotmail.com; phones: +78632970682, +79885620309; the department of pediatric surgery and orthopedics; postgraduate student.

УДК 004.9+007:57+615.47

**Д.С. Алексеев, Е.П. Попечителев**

### **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МУКОЦИЛИАРНОГО АППАРАТА**

*Рассматриваются методы изучения и оценки численных характеристик двигательной активности цилиарного аппарата (ДАЦА), предназначенного для очищения слизистых оболочек организма от вредных компонентов, поступающих из внешней среды, с учетом специфики мерцательного аппарата как объекта исследования. Приведена общая классификация методов исследования ДАЦА. При этом основное внимание обращено на: метод с применением макромаркеров, помещаемых на слизистую, метод ускоренной видеосъемки, и метод пространственно-временного спектрального анализа изображения мерцательного эпителия. Обсуждаются пути развития систем исследования ДАЦА, основанных на различных вариантах спектрального анализа, для целей диагностики ринологических патологий.*

*Двигательная активность цилиарного аппарата; метод с применением макромаркеров; метод ускоренной видеосъемки; метод пространственно-временного спектрального анализа.*

**D.S. Alekseev, E.P. Popchitelev**

### **METHODS OF THE RESEARCH OF THE MUCOCILIARY APPARATUS MOTOR ACTIVITY**

*The methods of examination and evaluation of numerical characteristics of the ciliary apparatus motor activity (CAMA), intended to cleanse the mucous membranes of the body from harmful components originating from the external environment, specific to ciliated apparatus as an object of study. The general classification of research methods of the CAMA is given. The main attention is drawn to: the method using macromarkers placed on the mucosa, the method of high speed video, and the method of the space-time spectral analysis of images of ciliated epithelium. We discuss the development of systems researching CAMA based on different versions of the spectral analysis for diagnostic purposes rhinological pathologies.*

*Motor activity of the ciliary apparatus; a method using macromarkers; the method of high speed video; the method of the space-time spectral analysis.*

**Мукоцилиарный аппарат как защитный механизм.** Полости организма, контактирующие с внешней средой, подвержены атаке вредоносных факторов – пыли, микроорганизмов и другие составляющих. Мерцательный эпителий (например, полости носа, ушей, рта, бронхов и т.п.) является барьером на пути проникно-

вения этих факторов во внутреннюю среду организма [1]. В частности, первым барьером на пути проникновения инфекционных агентов в организм человека через систему дыхания является эпителий слизистой оболочки полости носа. На слизистой носа ежесекундно осаждаются сотни или даже тысячи микробов и частиц пыли. Этот барьер успешно противостоит большинству из этих агентов, которые выводятся из организма, не причиняя человеку никакого вреда, тогда как другие становятся задачей следующих защитных барьеров.

Мерцательный эпителий представляет собой ткань слизистой у животных и человека, клетки которой снабжены ресничками. Ресничка представляет собой тонкий цилиндрический вырост цитоплазмы диаметром около 300 нм длиной несколько мкм. Внутри располагается так называемая аксонема, состоящая из микротрубочек. Микротрубочки представляют собой полые цилиндры диаметром 25 нм, стенка которых состоит из полимеризованных молекул тубулина.

Множество ресничек, принадлежащих одной клетке и даже одной области, совершают синхронные движения [2, 3]. Эти движения могут быть охарактеризованы как гребок, состоящий из двух фаз, получивших названия эффективной и возвратной. В эффективную фазу ресничка движется в слое перилиарной жидкости как прямой жесткий стержень, верхний конец которого описывает дугу, достигая поверхности покрывающего его слоя слизи и проталкивая его. В возвратную фазу ресничка движется в противоположную сторону в слое перилиарной жидкости, не касаясь слоя слизи, как гибкая нить, прижимаясь свободным концом к поверхности клетки. В первой фазе ресничка осуществляет быстрое перемещение (взмах), во второй фазе ресничка медленно возвращается в исходное положение.

Поверхность слоя мерцательных клеток покрыта тонким слоем перилиарной жидкости. Над этим слоем лежит слой слизи, продуцируемой бокаловидными клетками. Цилиарный (реснитчатый) аппарат (ЦА) мерцательных клеток, слой перилиарной жидкости и слой слизи образуют своеобразный транспортный механизм, который обеспечивает перемещение слоя слизи и оседающих на ее поверхности микроорганизмов и различных чужеродных частиц в сторону из носоглотки, осуществляя таким путем ее постоянное очищение. Искажение ритма движения (биения, мерцания, колебаний) или изменение частоты биения ресничек приводит к нарушению работы ЦА, в результате чего возникают болезни ЛОР-тракта, бронхов и т.д. Кроме того, нарушения механизма ЦА часто задолго предшествуют во времени таким симптомам, как отёк и насморк.

Численной характеристикой двигательной активности цилиарного аппарата (ДАЦА) является его скорость, имеющая типичные величины в десятки-сотни мкм в секунду. С ней прямо связаны другие два измеряемых параметра – время перемещения на стандартном промежутке, имеющее типичные величины в несколько десятков минут, и в настоящее время наиболее часто измеряемый параметр ДАЦА – частота биения ресничек (ЧБР), имеющая типичные величины от менее десятка до более двух десятков герц. Описаны также измерения других параметров – амплитуды биений, длины мукоцилиарной волны и др., но эти параметры пока не нашли широкого применения в диагностике ДАЦА.

**Методы исследования двигательной активности цилиарного аппарата.** Из всех известных методов изучения исследования ДАЦА наибольшее распространение получили на три группы:

- ◆ методы с применением маркеров;
- ◆ методы ускоренной видеосъемки;
- ◆ методы спектрального анализа.

Исследования с применением маркеров сводятся к нанесению на слизистую крупинки маркера и последующему наблюдению за передвижением маркера. Данный метод не предполагает рассматривания ресничек в деталях, и в слу-

чае использования микроскопа наблюдение ведётся при небольших увеличениях. При этом в качестве маркеров применяются кармин, пенопласт, карбоксиметилцеллюлоза, уголь, радиоактивные препараты [4]. Измеряемой величиной обычно является визуально наблюдаемая скорость ДАЦА. "Золотым" стандартом исследования ДАЦА у человека в настоящее время считается сахариновый тест, который впервые был предложен в 1984 году Ambille J. и др. [5]. Его преимущество в том, что нет необходимости непрерывно следить за положением маркера. Будучи помещенной в определённое начальное положение, крупинка сахарина через несколько десятков минут оказывается в зоне вкусового рецептора, и пациент сообщает об этом. Измеряемым параметром в данном случае является время перемещения на стандартном промежутке. Однако определённую трудность составляет калибровка таких измерений. Кроме того, методы маркерного измерения скорости при помощи индикаторного вещества приводят к длительному ожиданию, являются недостаточно оперативными и не могут диагностировать быстрых изменений в работе цилиарного механизма. Тем не менее, эти методы сохраняют своё значение там, где не требуется оперативность, а также как принятый эталон для сравнения.

Методы ускоренной видеосъёмки сводятся к наблюдению за движением ресничек при больших увеличениях, позволяющих рассмотреть их ориентацию. Однако, поскольку частота их биения сравнительно высока для фиксации и последующего анализа человеческим глазом, производится видеозапись и последующее ее замедленное воспроизведение. Согласно методу ускоренной видеосъёмки, описанному в [6], изображение мерцательного эпителия через камеру передавалось на видеоманитофон и записывалось. Затем скорость воспроизведения изображения на видеоманитофоне замедлялась в несколько раз, что позволяло исследователю считать частоту колебания реснички за одну секунду. Основными недостатками этого метода являются субъективность счета биений ресничек, а также большое количество времени на проведение исследования.

Больше методические возможности исследования ДАЦА связаны с применением математических методов обработки изображений мерцательного эпителия, выполняемых с помощью технологий обработки сигналов, провозвестником которого был метод изучения ДАЦА посредством светового микроскопа и фотодиода [7]. Принцип этого метода основан на измерении интенсивности отраженного света, предварительно направленного на поверхность слизистой оболочки. Полученный фотоэлектрический сигнал можно изучать при помощи осциллографа, частотомера и спектроанализатора. Близким к этому является метод трансиллюминационного ринологического мониторинга [8]. Суть метода состоит в исследовании изменений оптической плотности с помощью микроизлучателя и фотопреобразователя, герметично вмонтированных в зонд диаметром 3 мм. Регистрацию производили с помощью электрокардиографа. В качестве параметров ДАЦА использовали амплитуду мукоцилиарной волны и ширину мукоцилиарной волны.

Методы спектрального анализа. Эти методы основаны на разных вариантах спектрального анализе двумерных изображений мерцательного эпителия; они позволяют предложить пути развития систем исследования ДАЦА для целей диагностики различных ринологических патологий. Качественно новым развитием метода стало применение компьютерного пространственно-временного спектрального анализа с записью движущегося изображения биения ресничек в память компьютера и последующим программным анализом полученных данных. В качестве математической основы для подобных анализов, как правило, применялось одномерное временное преобразование Фурье, а измеряемой величиной является частота биений ресничек. Известный пример реализации метода описан в работе [9].

Метод пространственно-временного анализа изображений мерцательного эпителия. Направление развития систем исследования ДАЦА, основанных на разных вариантах спектрального анализа, для целей диагностики ринологических патологий, связано с совершенствованием методов пространственно-временного спектрального анализа изображений с изменяющимся во времени содержанием. В основу нового оперативного метода исследования ДАЦА положено исследование мерцательного эпителия *in vitro* по биопробе, помещаемой в среду физиологического раствора, для регистрации колебательных процессов с целью дальнейшей обработки и анализа спектральных характеристик.

Реализация метода [10, 11] предусматривает исследование изображения микроскопической пробы, колебательные процессы в которой регистрируются с помощью специализированной скоростной видеокамеры с кадровой частотой до 200 герц. Структурная схема комплекса для исследования ДАЦА методом пространственно-временного анализа изображений мерцательного эпителия приведена на рис. 1.

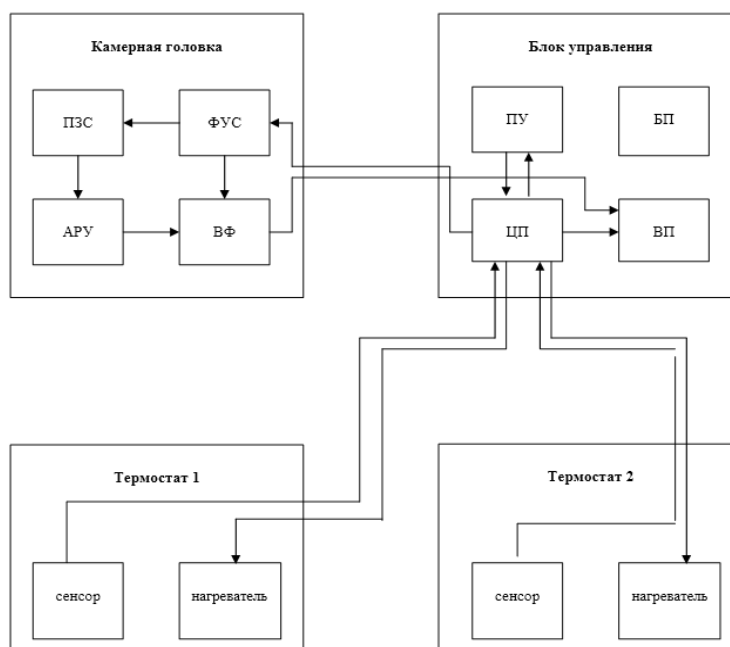


Рис. 1. Структурная схема комплекса для исследования ДАЦА методом пространственно-временного анализа изображений мерцательного эпителия

Видеокамера выполнена на основе матрицы светочувствительных элементов с зарядовой связью (ПЗС-структура). Конструктивно ПЗС-матрица расположена в камерной головке, устанавливаемой на месте микрофотонасадки микроскопа. Камерная головка соединяется кабелем с отдельным блоком управления. В комплекте предусмотрен также блок термостоллика (термостат 1), монтируемый на предметном столике микроскопа, и блок подогревателя резервуара физиологического раствора (термостат 2). Оба блока термостата соединяются с блоком управления.

В камерной головке видеосигнал с выхода ПЗС матрицы поступает одновременно в блок выборки-хранения и автоматической регулировки усиления (АРУ). Полученный нормированный по амплитуде сигнал поступает в выходной формирователь (ВФ), предназначенный для придания видеосигналу параметров, пригодных для его передачи в программу обработки. Сигналы, управляющие ПЗС и ВП,

вырабатываются формирователем управляющих сигналов (ФУС), режим работы которого в свою очередь определяется командами, передаваемыми из блока управления. Основой программной части блока управления является центральный процессор (ЦП). ЦП обменивается информацией с пультом управления (ПУ), на котором размещены кнопки и семисегментные индикаторы, обеспечивающие связь комплекса с оператором. ЦП управляет работой выходного преобразователя (ВП), на который из камерной головки поступает видеосигнал; ВП предназначен для преобразования сигналов в стандарт, пригодный для компьютерной обработки. Блок питания обеспечивает узлы видеокамеры необходимыми питающими напряжениями. В каждом блоке термостата расположен сенсор, передающий зависящий от измеряемой температуры калиброванный сигнал в блок управления, и нагреватель, предназначенный для приведения температуры к заданной величине. Управление термостатами производится также центральным процессором (ЦП).

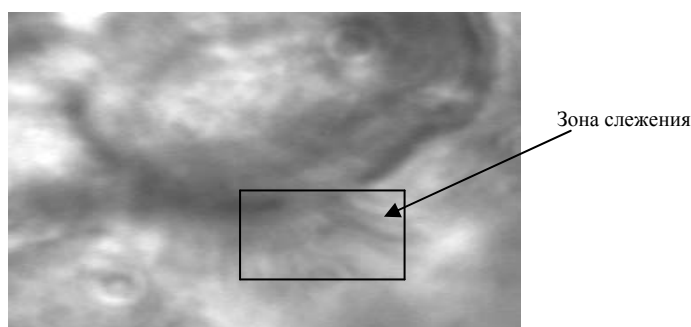


Рис. 2. Типичное микроскопическое изображение пробы мерцательного эпителия.

Сами реснички на изображении не видны, однако их перемещение сопровождается изменениями яркости элементов изображения. Возникают перемещающиеся в пространстве и во времени волны яркости (мерцающий фон), параметры которых и необходимо определить. Подсчет средней частоты биения ресничек и определение других параметров, характеризующих пространственное движение ресничек, осуществляется при помощи специальной компьютерной программы. Она позволяет:

- ◆ просматривая всю запись кадров (на рис. 2 представлен один кадр анализируемого изображения и выбрана зона слежения за движением ресничек);
- ◆ проводить покадровый просмотр зафиксированного изображения;
- ◆ выбирать конкретную по размерам зону эпителия для слежения за движением ресничек и анализа параметров этого движения;
- ◆ изучать пространственно-временной спектр биений в выбранной зоне слежения;
- ◆ проводить большой точностью подсчет основной частоты биений.

Результатом развития рассмотренного методов исследований ДАЦА до создания опытного образца установки спектрального анализа изображений мерцательного эпителия стало то, что на сегодняшний день он уже стал инструментом, дающим ринологам объективные данные о состоянии мерцательного эпителия, а измерение частоты биения ресничек уже стало распространенной процедурой.

**Заключение.** Опыт развития пространственно-временных спектральных методов исследования ДАЦА и достигнутые при этом результаты позволяют определить главные направления их дальнейшего развития:

1) разработка технических приемов и адаптация методов исследования ДАЦА для доведения аппаратных и программных средств до уровня метрологически обоснованных исследований;

2) разработка технических приёмов и методов анализа на основе быстрого двумерного преобразования Фурье в реальном масштабе времени, без записи и замедленного воспроизведения;

3) применение новых математических методов и программных средств на основе вейвлет-анализа, позволяющих определить иные параметры ДАЦА, кроме частоты биения ресничек, что даст возможность улучшить качество диагностики, в том числе обеспечить диагностику ранее не диагностируемых патологий ЦА.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Попечителей Е.П. Системный анализ медико-биологических исследований – Саратов: Научная книга. – 2009. – 368 с.
2. Пискунов С.З. Актуальные проблемы ринологии и пути их решения // Российская ринология. 1995, № 3–4. – С. 6-12.
3. Плужников М.С., Шантуров А.Г., Лавренова Г.В., Носуля Е.В. Слизистая оболочка носа. Механизмы гомеостаза и гомокинеза. – СПб.: 1995. – С. 5-18.
4. Козлов В.С., Крамной А.И., Аверин А.А., Лукашевич Ю.А., Алексеев Д.С. Исследование двигательной активности цилиарного аппарата мерцательного эпителия слизистой оболочки полости носа человека in vitro // Материалы V научно-практической конференции “Актуальные вопросы разработки и внедрения информационных технологий двойного применения”. Ярославль: 2004. – С. 3-8.
5. Ambille J., Bordiga E., Sardi L. Taraturatel test bella saccarino per la valutazione della clearance mucociliare della fossanasoli // Otorinolaringologia. 1984; 34, 5. – P. 469-472.
6. Riechelmann H., Klimek L., Mann W. Objective measures of nasal function // Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck. Surg. 1995; 3. – P. 207-13.
7. Dalhamn T., Rylander R. Frequency of ciliary beat measured with a photosensitive cell // Nature. 196. – 1962. – P. 592-599.
8. Кравчук А.П., Крылов А.И., Бояринцева А.В. К вопросу о мониторинге мукоцилиарного транспорта // Российская ринология. – 2001. – № 2. – С. 172.
9. Sisson J.H., Stoner J.A., Ammons B.A., Wyatt T.A. All-digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency // J. of Microscopy. 2003; 211. – P. 103.
10. Алексеев Д.С., Баду Е.И., Козлов В.С., Крамной А.И., Куликов Д.Г. Устройство для исследования двигательной активности цилиарного транспорта / Решение о выдаче патента на полезную модель №2005113734/22(015785) от 29.11.2005.
11. Козлов В.С., Крамной А.И., Аверин А.А., Лукашевич Ю.А., Алексеев Д.С. Исследование двигательной активности цилиарного аппарата мерцательного эпителия полости носа in vitro // Российская ринология. – 2005. – № 3. – С. 30-33.

Статью рекомендовал к опубликованию д.т.н., профессор В.В. Дубаренко.

**Алексеев Дмитрий Станиславович** – Научно-производственная компания «Азимут»; e-mail: nyen@ya.ru; 194223, г. Санкт-Петербург, ул. Курчатова, 10; тел.: 88125529203; гл. инженер.

**Попечителей Евгений Парфирович** – Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»; e-mail: eugeny\_p@mail.ru; 197376, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 5; тел.: 88122343012; кафедра биотехнических систем; засл. деятель науки РФ; д.т.н.; профессор.

**Alekseev Dmitriy Stanislavovich** – Azimut NPK; e-mail: nyen@ya.ru; 10, Kurchatova street; St. Petersburg, 194223, Russia; phone: +78125529203; senior engineer.

**Popechitelev Evgeniy Parfirovich** – Saint-Petersburg state electrotechnical university «LETI»; e-mail: eugeny\_p@mail.ru; 5, professor Popova street, St. Petersburg, 197376, Russia; phone: +78122343012; the department of biotechnical systems; figure of science of the Russian federation; dr. of eng. sc.; professor.