

5. Пахомушкина Н. В., Семейкин Н. П., Филь В. А. Информационные характеристики сигнала ЛДИС.— В кн.: Материалы II Всесоюз. конф. по методам аэрофизических исследований. Оптические методы исследований газового потока. Минск: изд. Ин-та тепло- и массообмена АН БССР, 1979.
6. Гродзовский Г. Л. Выравнивание неравномерности поля скоростей в осесимметричном турбулентном и ламинарном потоке.— ДАН, 1954, т. XCVII, № 4.

*Поступила в редакцию 22 декабря 1980 г.;
окончательный вариант — 7 декабря 1981 г.*

УДК 53.082.5 : 578.088.5

М. В. ЕВДОКИМОВ, А. В. ПРИЕЗЖЕВ, Ю. М. РОМАНОВСКИЙ

(Москва)

ЛАЗЕРНЫЙ ДОПЛЕРОВСКИЙ АНЕМОМЕТР НА ЛИНИИ С ЭВМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕДЛЕННЫХ ПОТОКОВ ПРОТОПЛАЗМЫ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

В последние годы лазерные доплеровские анемометры (ЛДА) начинают применяться для изучения явлений, выходящих за рамки традиционной гидродинамики. Например, в ряде работ показана возможность применения ЛДА для исследования направленных потоков крови в микрокапиллярах [1] и направленных потоков протоплазмы в живых клетках [2—4], а также электрофоретической подвижности заряженных микрочастиц [5]. Такие измерения необходимы при выполнении как прикладных, так и фундаментальных исследований в области биофизики подвижности.

В настоящей работе описан автоматизированный комплекс «ЛДА — ЭВМ ЕС-1010», построенный для проведения исследований внутриклеточной подвижности в реальном масштабе времени. Целью этих исследований является изучение механизмов, приводящих протоплазму клеток в движение. Сопряжение ЛДА с ЭВМ является лишь первым шагом в построении измерительно-вычислительной системы для комплексного изучения проблемы внутриклеточной подвижности путем одновременной регистрации целого ряда процессов и параметров, таких, как скорость потока протоплазмы, сократительная активность, мембранный потенциал, и др.

Объекты исследования. В качестве биологических объектов использовались крупные клетки пресноводной водоросли *Nitella* и тяжи недифференцированной многоядерной клетки плазмодия миксомицета *Physarum*. Общий характер движения протоплазмы в этих объектах в стационарных условиях описан в монографии [6] по результатам наблюдений, проведенных методами оптической микроскопии и теневых отпечатков.

Так, в клетках *Nitella*, имеющих размеры несколько сантиметров в длину и около 500 мкм в диаметре, наблюдается ламинарный поток протоплазмы в каналах глубиной ~ 20 мкм, причем большинство частиц движется с одинаковой постоянной скоростью ~ 50—80 мкм/с.

В тяжах плазмодия *Physarum*, представляющих собой вязкоупругие трубки с внутренним диаметром от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров, имеет место осесимметричный реверсивный поток со значительным градиентом скорости по сечению. В моменты наиболее интенсивного течения максимальная по сечению скорость потока достигает 2—3 мм/с. Период изменения направления потока составляет около 100 с.

Особенности объектов с точки зрения применения ЛДА. Применение ЛДА для измерения параметров потока протоплазмы в клетках неизбеж-

но наталкивается на определенные сложности, связанные с особенностями объектов. Во-первых, это сложный состав движущейся протоплазмы, состоящей из оптически неоднородных включений, размеры которых различаются на несколько порядков. Концентрация этих включений такова, что при любой схеме ЛДА измерения могут проводиться лишь в существенно многочастичном режиме, причем в ряде случаев (например, в случае больших клеток) нельзя исключить возможность многократного рассеяния. Правда, следует заметить, что низкая степень деполаризации рассеянного света свидетельствует о том, что во всех случаях преобладающим остается однократное рассеяние. Во-вторых, толстые внешние оболочки клеток, имеющие форму, близкую к цилиндрической, содержат светорассеивающие неоднородности. Кроме дополнительного рассеяния наличие оболочек приводит к некоторому искривлению волнового фронта зондирующего пучка. В-третьих, доплеровские сдвиги частоты рассеянного движущейся протоплазмой света лежат в низкочастотной области, и при значительных градиентах скорости в измерительном объеме низкочастотная и сигнальная составляющие доплеровского спектра могут перекрываться. В этой же области частот наиболее сильно проявляются технические шумы лазерного излучения (низкочастотные флуктуации мощности), приводящие к дополнительному искажению спектра. В-четвертых, лазерное излучение при определенных плотностях мощности может ингибировать подвижность протоплазмы в клетках. Поэтому экспериментам по исследованию внутриклеточной гидродинамики должно предшествовать исследование допустимого уровня зондирующего излучения.

Схема ЛДА. Описанные особенности требуют вспомогательных измерений на модельных объектах с последующим выбором оптимальной оптической схемы и метода обработки выходного сигнала фотоприемника ЛДА. Такие измерения проводились нами на цилиндрических стеклянных капиллярах разных диаметров с разной толщиной стенок, по которым пропусклась вода с частицами латекса полистирола разной концентрации. Сравнивались различные схемы: дифференциальная, дифференциальная компенсационная и с опорным пучком. Хотя дифференциальные схемы имеют свои преимущества (позволяют измерять знак скорости и устранять низкочастотную составляющую спектра) и нами была показана их применимость к регистрации внутриклеточной подвижности [7], для систематических исследований была выбрана однолучевая схема с опорным пучком, аналогичная схеме, использованной в работах [3, 5]. Опорным пучком служит излучение, рассеянное на неподвижных стенках капилляров. Как показывает опыт, его интенсивность как в случае стеклянных капилляров, так и в случае живых клеток существенно превышает интенсивность света, рассеянного на движущихся частицах, и является достаточной для выполнения необходимых условий гетеродинамирования. С другой стороны, невозможность устранения этого опорного излучения и определяет отказ от использования двухлучевых схем.

Метод обработки сигнала. Характер выходного сигнала фотоприемника, являющегося в большинстве случаев нестационарным по частоте, определил выбор цифрового спектрального анализа в качестве метода обработки. Анализатором спектра при этом служит ЭВМ ЕС-1010, выполняющая в то же время остальные функции по сбору, обработке и выводу экспериментальной информации. После усиления и предварительной аналоговой фильтрации широкополосных шумов сигнал ЛДА подается на многоканальный АЦП. Дискретные выборки сигнала длительностью от 2^5 до 2^{11} точек поступают из АЦП через цифровые входы в оперативное запоминающее устройство и далее обрабатываются цифровыми методами. Типичная обработка состоит в разбиении первоначальной выборки на 8—16 более коротких реализаций, вычитании линейного тренда, нахождении энергетического спектра каждой реализации методом БПФ [8], усреднении по реализациям, фильтрации и аппроксимации полученного

спектра и нахождении по результирующему спектру характерной скорости. Спектр мощности выводится на экран запоминающего осциллоскопа, а цифровая информация — на экран алфавитно-цифрового дисплея и АЦПУ. Часть информации переписывается на диск для хранения и последующей дополнительной обработки и анализа. После этого повторяется цикл записи новой выборки и ее обработки. При продолжительности эксперимента 30 мин можно получить $\sim 10^3$ точек временной зависимости модуля скорости, что, как правило, достаточно для исследования переходных процессов. После окончания эксперимента проводится вторичная обработка, включающая, в частности, спектральный и взаимно-корреляционный анализ полученных зависимостей. Соответствующие кривые выводятся на дисплей и графопостроитель. Режим работы комплекса задается программно в диалоговой форме. Гибкая система программ, написанных на языках Ассемблер и ФОРТРАН, позволяет оперативно изменять схему проведения эксперимента и, в частности, осуществлять управление измерителем. Наиболее простым видом управления является автоматическое перекрывание зондирующего пучка в промежутках времени, когда не происходит считывания информации, для устранения излишнего воздействия когерентного излучения на объект.

Результаты эксперимента. На рис. 1 приведены доплеровские спектры, полученные от потока воды с частицами латекса полистирола в стеклянном капилляре с внутренним диаметром 200 мкм при разных интенсивностях потока. На рис. 2 приведены аналогичные спектры от клетки *Nitella* при двух значениях угла рассеяния. Измерение проводилось на одиночной клетке, выдержанной в течение суток после отделения ее от куска водоросли в отстоянной водопроводной воде и закрепленной в специальном неповреждающем держателе. Диаметр зондирующего пучка в перетяжке, куда помещалась клетка, составлял 100 мкм, плотность мощности излучения в измерительном объеме — 0,1 Вт/см². Продолжительность измерения 1 мин. Видно, что при стационарном потоке в капилляре и клетке сигнальная составляющая четко проявляется, и наиболее вероятную скорость частиц можно определить с точностью не хуже 3—5% при данной длительности накопления сигнала. Проверка линейности зависимости положения сигнальной составляющей спектра от синуса угла рассеяния показала незначительность вклада диффузии в результирующее движение частиц в потоке. Отличие спектров, приведенных на рис. 1, 2, состоит в более пологой форме сигнальной составляющей спектра клетки и в большем перекрытии ее с низкочастотной

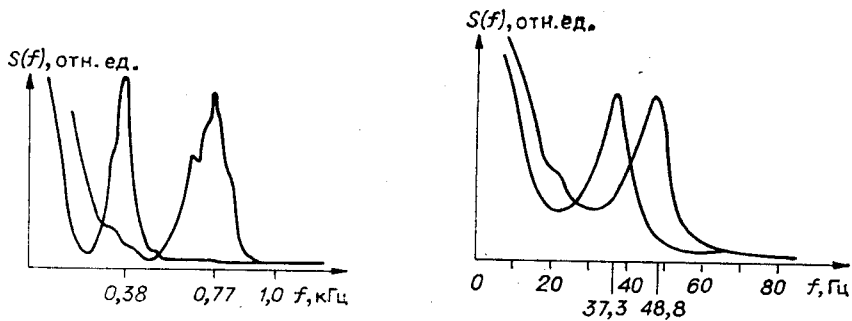


Рис. 1. Доплеровские спектры от низкоскоростного потока воды с частицами латекса полистирола в стеклянном капилляре с внутренним диаметром 200 мкм, соответствующие двум скоростям течения:

$V_1=0,38$ и $V_2=0,77$ мм/с. Частота дискретизации аналогового сигнала $f_{\text{АЦП}}=2$ кГц, расстояние между гармониками спектра $\Delta f=8$ Гц.

Рис. 2. Доплеровские спектры от потока протоплазмы в клетке водоросли *Nitella* при двух углах рассеяния: $\theta_1=40^\circ$ и $\theta_2=50^\circ$. Частота дискретизации $f_{\text{АЦП}}=170$ Гц, расстояние между гармониками спектров $\Delta f=0,66$ Гц.

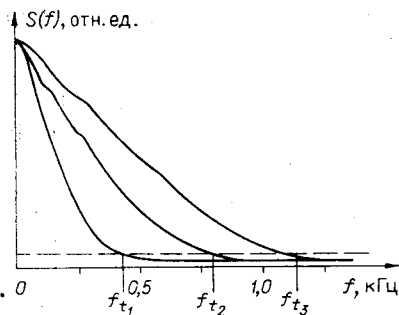


Рис. 3. Характерные доплеровские спектры от потока протоплазмы в тяже плазмодия *Physarum* диаметром 100 мкм, выращенном на агаровой подложке.

Спектры сняты с интервалом в 10 с и соответствуют разным интенсивностям потока. Значения частот f_{t_1} , f_{t_2} и f_{t_3} пропорциональны значениям «эффективной» скорости потока в моменты времени t_1 , t_2 и t_3 .

составляющей. Причиной этого может служить разброс скоростей, соответствующих протоплазматическим включениям разных размеров, а также вклад многократно рассеянного света.

При механическом и электрическом воздействиях на клетку течение протоплазмы в ней практически мгновенно останавливается. Длительность остановки зависит от силы воздействия, а восстановление потока носит осциллирующий характер.

На рис. 3 приведены типичные доплеровские спектры от нестационарного потока протоплазмы в тяже плазмодия *Physarum* при разных интенсивностях течения. Длительность выборки, по которой строится один спектр, не превышает 1 с. Отсутствие явно выраженной сигнальной составляющей в этих спектрах свидетельствует о большем градиенте скорости в потоке и о большем вкладе многократного рассеяния (главным образом в области больших частот). Поэтому в данном случае имеет смысл говорить не о наиболее вероятной, а о некоторой «эффективной» скорости, определяемой по ширине спектра на заданном уровне, превышающем уровень шума.

Регистрируя временные зависимости этой эффективной скорости (см., например, рис. 4), можно исследовать внутриклеточные ритмы, характерные для данного объекта, синхронизацию ритмов в связанных тяхах и многие другие вопросы, представляющие интерес для биофизики.

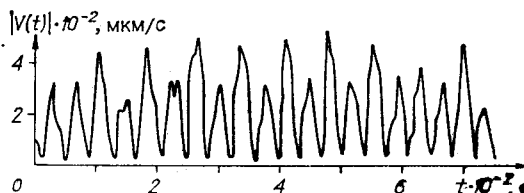
Проблема точности измерений скорости в данном случае является более сложной. Исследование систематической и случайной погрешностей показывает, что при фиксированных параметрах записи и обработки выборки сигнала ЛДА высокие скорости измеряются более точно, чем низкие. Верхняя оценка среднеквадратичной погрешности составляет 8—10% от измеряемой скорости. Такая точность, низкая для традиционных измерений, проводимых с помощью ЛДА, оказывается вполне приемлемой для описываемых экспериментов, так как превышает точность других известных методов, применяемых в подобных исследованиях. В то же время этот метод представляет несравненно большие удобства и оперативность измерений, без которых большинство исследований, представляющих интерес для биофизики, не может быть выполнено.

В заключение отметим, что на описанном комплексе уже проведены многочисленные эксперименты, выходящие за рамки чисто методических. Результаты, представляющие биофизический интерес, будут опубликованы в журнале «Биофизика».

Настоящее исследование начато по инициативе С. А. Ахманова, которому авторы благодарны за постоянное внимание и помощь в работе.

Рис. 4. Пример временной зависимости модуля «эффективной» скорости течения протоплазмы в тяже плазмодия *Physarum*.

Частота и амплитуда колебаний скорости зависят от температуры, химического состава среды и других факторов и являются чувствительными параметрами жизнедеятельности организма.



ЛИТЕРАТУРА

1. Tanaka T., Riva C., Ben-Sira I. Blood Velocity Measurements in Human Retinal Vessels.— Science, 1974, vol. 186, p. 830.
2. Cummins H. Z. Intensity Fluctuation Spectroscopy of Motile Organisms.— In: Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry/Ed. H. Z. Cummins, E. R. Pike. N. Y.— L.: Plenum Press, 1977.
3. Mustacich R. V., Ware B. R. A Study of Protoplasmic Streaming in Physarum by Laser Doppler Spectroscopy.— Protoplasma, 1977, vol. 91, p. 351.
4. Приезжев А. В., Романовский Ю. М. Лазерная доплеровская спектроскопия и ее применение в биологии.— Квант. электроника, 1978, т. 5, с. 2237.
5. Uzgiris E. E. Laser Doppler Spectrometer for Study of Electrokinetic Phenomena.— Rev. Sci. Instrum., 1974, vol. 45, p. 74.
6. Камия Н. Движение протоплазмы.— М.: ИЛ, 1962.
7. Приезжев А. В., Романовский Ю. М., Тихомиров А. Г., Пентегова Л. И. Исследование нестационарного течения протоплазмы плазмодия миксомицета методом лазерной доплеровской анемометрии.— Биофизика, 1978, т. 23, № 3.
8. Рабинер Л., Гоулд Б. Теория и применение цифровой обработки сигналов.— М.: Мир, 1978.

*Поступила в редакцию 28 января 1981 г.;
окончательный вариант — 21 октября 1981 г.*