

**АКУСТИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СТРУКТУР ГЛАЗА
ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA*****Зак П.П.¹, Петронюк Ю.С.¹, Храмцова Е.А.¹, Трофимова Н.Н.¹, Мисяков А.Н.¹,
Гурьева Т.С.², Дадашева О.А.², Левин В.М.¹**¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119994, РФ; e-mail: pavelzak@mail.ru² Институт медико-биологических проблем РАН
Хорошевское шоссе, 76А, г. Москва, 123007, РФ

Поступила в редакцию: 19.07.2019

Аннотация. В работе оценивались возможности сканирующих ультразвуковых акустических микроскопов ИБХФ РАН для исследования структур глаза мелких лабораторных животных. Объектом исследования служили цыплята мелкой домашней птицы: японский перепел *Coturnix japonica*. Диапазон размера глаз определялся возрастом птиц от 10-ти до 30-ти дневного возраста. Характеристики акустических микроскопов соответствовали размерам измеряемых глаз 5-10 мм в диаметре с погрешностью измерений до 15 мкм. Поточечное сканирование глаз по плоскости и глубине в условиях *in situ* обеспечивало компьютерную 3-х мерную визуализацию геометрии глаза в целом и основных структур его оптики. Были измерены размеры и форма глазного яблока, передней и задней камеры глаза, хрусталика, толщины роговицы, склеры и хорио-ретиального комплекса. Полученные данные открывают перспективу прижизненных неинвазивных измерений в исследованиях детской миопизации при моделировании на мелких лабораторных животных.

Ключевые слова: глаз, ультразвуковая микроскопия, возраст, японский перепел *Coturnix japonica*.

В настоящее время неинвазивные ультразвуковые исследования (УЗИ) глаз человека являются отработанным и успешным методом диагностической офтальмологии. Однако, стандартная офтальмологическая аппаратура малопригодна для экспериментальных медико-биологических исследований на глазах мелких лабораторных животных. ИБХФ РАН располагает ультразвуковыми сканирующими микроскопами собственной разработки, позволяющими работать с мелкими объектами. Основной задачей настоящей работы было оценить применимость сканирующего акустического микроскопа СИАМ-2018, разработанного в лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН [1, 2] для неинвазивного исследования структур глаза мелких лабораторных животных. В качестве удобного источника по получению глаз разного размера (диаметр 5-10 мм) были использованы разновозрастные цыплята японского перепела *Coturnix japonica* инкубационного разведения в виварии ИМБП РАН. Перспективным развитием выполненных измерений является моделирование процессов миопизации глаза в детском возрасте. Постнатальное развитие японского перепела происходит примерно в 50 раз быстрее, чем у человека. Так, для 10-30 дневных цыплят оказывается возможным исследовать закономерности формирования глаз в детском возрасте, а на птицах старше 9-ти месяцев исследовать старческие возрастные нарушения. В настоящее время такие работы ведутся в ИБХФ РАН в лаборатории физико-химических основ рецепции [3, 4]. Основные знания в этой области получены на тканевом и клеточном уровне методами гистологии, клеточной биологии и биохимии. Необходимой составляющей исследования миопических процессов является возможность визуализации оптики глаза в условиях *in situ* и *in vivo*. В соответствии с этим, нами выполнена настоящая методическая работа по исследованию разрешающей способности ультразвуковых акустических микроскопов собственной разработки на глазах цыплят и взрослых птиц *Coturnix japonica* в условиях *in situ*. Этические нормы по содержанию птиц и выведению их из эксперимента путем декапитации соответствовали требованиям «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Импульсная акустическая микроскопия основывается на применении зондирующих импульсов фокусированного высокочастотного ультразвука. Эхо-сигналы, отражаемые от фактических границ и внутренних элементов объекта исследования, регистрируются и подвергаются селекции по времени задержки. Визуализация структуры объекта происходит за счет механического сканирования зондирующего ультразвукового пучка, которое позволяет отображать амплитуду сигналов и, с ее помощью, визуализировать структуру объекта. В зависимости от задачи можно получить разные виды сканов изображений: С-скан – осуществляется послойно в глубину объекта; В-скан – формируется при помощи поперечных сечений; А-скан – представляет собой эхограмму в произвольно выбранной точке. Использование нескольких видов сканов в комплексе позволяет получить максимальную информацию об объекте при выборе данного метода исследования.

Для проведения исследования использовался сканирующий импульсный акустический микроскоп СИАМ-2018, разработанный в лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН. Акустические изображения были получены путем перемещения акустической головки прецизионными шаговыми двигателями с шагом 30 мкм и скоростью перемещения до 50 мм/с. Акустический объектив с фокусным расстоянием 13,5 мм обеспечивал рабочий ход по глубине проникновения до 10 мм. В качестве иммерсионной жидкости между объективом и роговицей глаза использовались раствор Рингера (Рингер-СОЛЮфарм) или же стандартный гель для

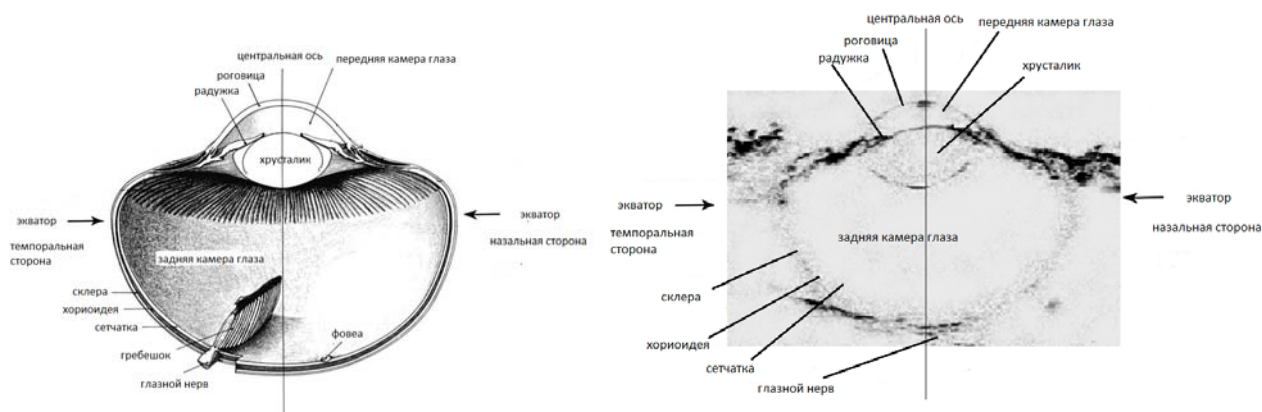


Рисунок 1. Акустическое изображение (BD-scan) глаза цыпленка *Coturnix japonica* на 30-е сутки развития, (правый рисунок), в сопоставлении с известной схемой глаза птиц отряда Galliformes (левый рисунок)

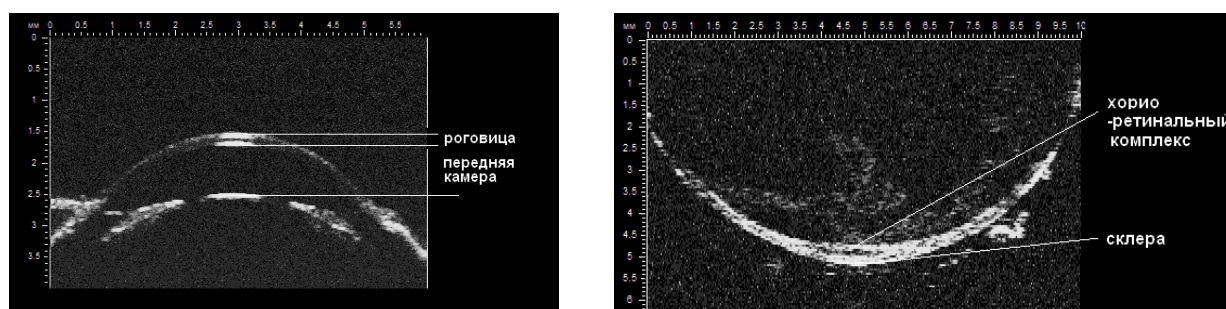


Рисунок 2. BD-scan роговицы (слева) и глазное дно на уровне склеры (справа) взрослого перепела. По осям приборной записи показаны размеры в мм

ультразвуковой медицинской диагностики. Частота акустического импульса 50 МГц позволила оценивать размеры глазных структур с погрешностью до 15 мкм.

Были исследованы глаза цыплят и взрослых птиц *Coturnix japonica*. Измерения проводились на декапитированных головах со стороны роговицы при их естественном положении в глазных орбитах. На рисунке 1 сопоставлены известный схематический рисунок глаза птиц семейства Galliformes и полученное нами акустическое изображение глаза *Coturnix japonica*. На этом эхолокационном изображении хорошо различима геометрия и размеры глаза в целом, а также основные значимые элементы оптики глаза: роговица, радужка, передняя камера глаза, хрусталик, задняя камера глаза, глазное дно. Хорошо визуализируются внешние оболочки глаза: роговица и склера (рис. 2). Измерение общего размера глаза вдоль его оптической оси выполнялось по положению крайнего эхоимпульса, соответствующего дну склеры. Амплитуда акустического эхосигнала давала представление об относительной плотности наблюдаемой структуры. При этом интенсивность акустического контраста на изображении определяется, в том числе, кривизной структурных элементов и наличием микронных и субмикронных неоднородностей в них, таких как уплотнения, отслоения, искривления, смещение относительно оптической оси.

Эхолокационные точечные сигналы, направленные перпендикулярно по центру роговицы позволили измерять размеры и положение основных рефракционных составляющих по аксиальной оси глаза (рис. 3).

Измерения были проведены для цыплят 3-х возрастов и взрослой птицы, для левого и правого глаза, на выборке из пары цыплят с одинаковым весом для каждого возраста. В каждой группе определялась величина среднеквадратичного отклонения, величина которой варьировалась внутри интервала погрешности ультразвукового измерения (± 15 мкм). Компьютерное изображение глаза, сформированное в результате эхолокационного поточечного сканирования, позволяло уверенно визуализировать форму и размеры глаза в целом, роговицы и склеры, хрусталика и стекловидного тела. В таблице 1 приведены размеры этих структур для цыплят 3-х возрастов и взрослой птицы *Coturnix japonica*.

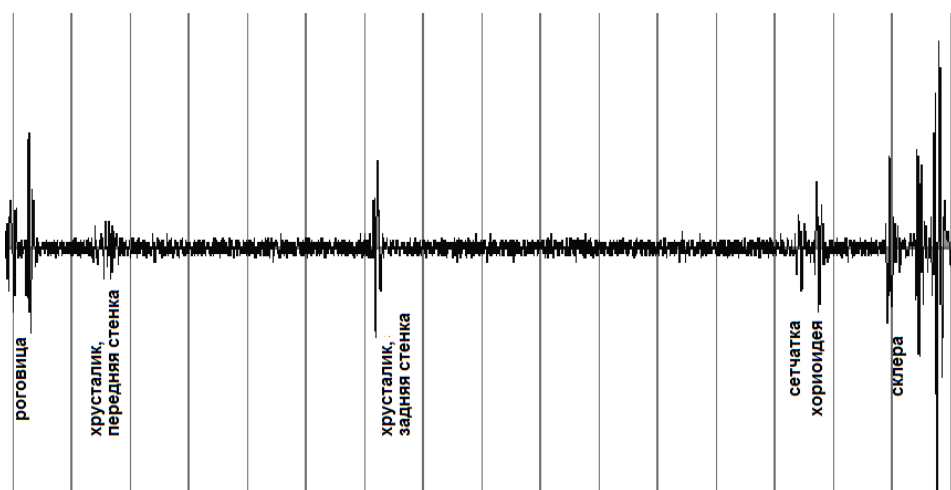


Рисунок 3. Эхограмма глаза перепела при одноточечном А-сканировании. По горизонтальной развертке размеры, вычисляемые по времени возвращения эхолокационного ответа. Амплитуда ответов соответствует относительной механической плотности данной структуры

Таблица 1. Результаты морфометрических измерений глаз *Coturnix japonica* в условиях *in situ*. Приведено среднее значение в миллиметрах для выборки по 2-м птицам (4 глаза) каждого возраста. Величина квадратичного отклонения варьируется внутри погрешность измерения (± 15 мкм)

Возраст, сутки	Размер глаза по аксиальной оси	Диаметр глаза по экватору	Толщина роговицы	*Передняя камера, граничные значения.	Хрусталик по аксиальной оси	Задняя камера по аксиальной оси	Склера
10	5.8	8,3	0,13	0,55-0,83	1,7	3,25	0,125
20	6.6	8,7	0,135	0,56-0,88	1,85	3,95	0,125
30	7.1	10,1	0,17	0,23-0,69	1,9	4,4	0,145
>100	8.5	10,8	0,23	0,95	2,5	4,7	0,150

*Разбросы по измерениям размеров передней камеры, вероятно, связаны с падением внутриглазного давления в условиях *in situ*. Наиболее близкими к реальным размерам являются максимальные значения измерений.

Были также выполнены успешные предварительные измерения *in vivo* при фиксированном положении головы интактных животных. В целом, проведенная работа показала эффективность ультразвуковой акустической микроскопии для определения рефракционных составляющих оптики глаза мелких лабораторных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-00708.

Список литературы / References:

1. Патент РФ № 2112969 *Малогобаритный акустический микроскоп*. Дата публикации 1998.06.10. [Patent RF № 2112969 *Compact Acoustic Microscope* 1998.06.10. (In Russ.)]
2. Субочев П.В., Орлова А.Г., Турчин И.В., Петронюк Ю.С., Храмова Е.А., Левин В.М. Ультразвуковые технологии высокого разрешения для исследования биологических объектов. *Известия РАН Серия Физическая*, 2018, т. 82, № 5, с. 572-577. [Subochev P.V., Orlova A.G., Turchin I.V., Petronyuk Yu.S., Khramtsova E.A., Levin V.M. High-resolution ultrasound technology for the study of biological objects. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2018, vol. 82, no. 5, pp. 572-577. (In Russ.)]
3. Сигаева А.О., Сержникова Н.Б., Погодина Л.С., Трофимова Н.Н., Дадашева О.А., Гурьева Т.С., Зак П.П. Изменения сосудистой оболочки глаза разновозрастных групп японского перепела *Coturnix japonica* в зависимости от спектрального состава освещения. *Сен. сис.*, 2015, т. 29, № 4, с. 354-361. [Sigaeva A.O., Serezhnikova N.B., Pogodina L.S., Trofimova N.N., Dadasheva O.A., Gurieva T.C., Zak P.P. Changes in the choroid of different age groups of the Japanese quail *Coturnix japonica* depending on the spectral composition of illumination. *Sensory Systems*, 2015, vol. 29, no. 4, pp. 354-361. (In Russ.)]
4. Сержникова Н.Б., Погодина Л.С., Липина Т.В., Трофимова Н.Н., Гурьева Т.С., Дадашева О.А., Зак П.П. Возрастные изменения пигментного эпителия сетчатки японского перепела *Coturnix japonica* при повседневном освещении синим светом. *Клиническая и экспериментальная морфология*, 2017, т. 21, № 1, с. 48-53. [Serezhnikova N.B., Pogodina L.S., Lipina T.V., Trofimova N.N., Gurieva T.C., Dadasheva O.A., Zak P.P. Age-related changes in retinal pigment epithelium of Japanese quail *Coturnix japonica* by everyday blue light. *Clinical and experimental morphology*, 2017, vol. 21, no. 1, pp. 48-53. (In Russ.)]

ACOUSTIC-MICROSCOPIC STUDY OF AGE-RELATED CHANGES IN EYE STRUCTURES OF JAPANESE QUAIL *COTURNIX JAPONICA***Zak P.P.¹, Petronuk Yu.S.¹, Khramtsova E.A.¹, Trofimova N.N.¹, Misiakov A.N.¹, Gurieva T.S.², Dadasheva O.A.², Levin V.M.¹**¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics (IBCP), RAS
*Kosygina str., 4, Moscow, 119994, Russia; e-mail: pavelzak@mail.*²Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences
Khoroshevskoye av., 76A, Moscow, 123007, Russia

Abstract. The studies was evaluated the capabilities of scanning ultrasonic microscopes invented in Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS for studies of the structures of the eye small laboratory animals. The object of the study were chicks of Japanese quail *Coturnix japonica*. The range of eye size was determined by the age of birds from 10 to 30 days of age. Characteristics of ultrasonic microscopes were adequate to the sizes of the measured eyes 5-10 mm in diameter with measurement error up to 15 microns. Point-by-point scanning of the eye for plane and depth in terms of in situ provided the computer-generated 3-dimensional visualization of the general geometry of eyes, and the basic structures of the eye optics. The size and shape of the eyeball, anterior and posterior chamber of the eye, lens, corneal thickness, sclera and chorio-retinal complex were measured. These data offer the prospect of in vivo non-invasive measurements in modeling of experimental child myopia on chicks of Japanese quail.

Key words: *eye, ultrasonic microscopy, age, Japanese quail Coturnix japonica.*