

**ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ТИПОВ ОСВЕЩЕНИЯ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СКЛЕРЫ НА ПРИМЕРЕ ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA*****Храмцова Е.А.<sup>1</sup>, Крашенинников С.В.<sup>2</sup>, Петронюк Ю.С.<sup>1</sup>, Трофимова Н.Н.<sup>1</sup>, Гурьева Т.С.<sup>3</sup>, Дадашева О.А.<sup>3</sup>, Левин В.М.<sup>1</sup>, Григорьев Т.Е.<sup>2</sup>, Зак П.П.<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: alyonushk@gmail.com

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

пл. Академика Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ

<sup>3</sup> Институт медико-биологических проблем РАН

ш. Хорошевское, 76а, г. Москва, 123007, РФ

Поступила в редакцию: 10.07.2020

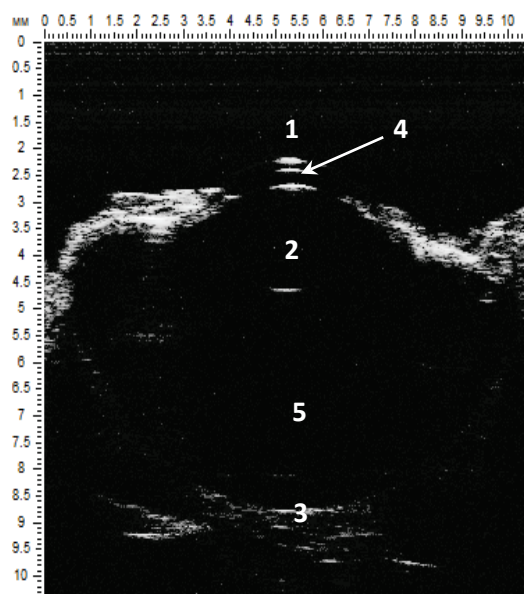
**Аннотация.** В работе представлены предварительные данные о влиянии спектрального состава повседневного освещения (синее освещение – 450 нм; красное освещение – 630 нм, дневной свет лампы накаливания для контрольной группы) на постнатальное развитие склеры глаза японского перепела *Coturnix coturnix japonica dom.*, как широко используемой модели для исследования развития структур глаза и модели заболеваний зрительного аппарата. В условиях *in situ* исследованы толщины склер неинвазивными методами с использованием импульсной акустической микроскопии, что позволяет провести измерения с минимальными искажениями. После выделения склер были проведены механические испытания и определены основные физико-механические характеристики. Показано, что на 23 сутки постнатального развития при синем освещении при сравнении с красным наблюдается уменьшение толщины склеры ( $\Delta 14\%$ ) в сочетании с понижением ее эластичности ( $\Delta 7\%$ ). Результаты механических испытаний были проинтерпретированы в рамках модели высокоэластичности, основанной на не-Гауссовой статистике, оценивающей расположение основных структурных элементов склеры (внеклеточного матрикса) и выдвинуты предположения об особенностях развития склер при разном спектральном освещении. Работа выполнена в рамках задач по моделированию детской миопии.

**Ключевые слова:** склера, японский перепел, внеклеточный матрикс, акустическая микроскопия, физико-механические свойства, нативная ткань.

Склера совместно с роговицей образуют непрерывную соединительно-тканную капсулу, обеспечивающую помимо механической защиты и поддержки структурных элементов глаза, эмметропию глаза в условиях постоянно меняющихся внешних условий. В процессе эмбриогенеза склера дифференцируется из нейроэктодермы и мезодермы, общность происхождения склеры и хрящевой ткани сказывается при системных заболеваниях в виде отклонений в зрительном аппарате [1]. У взрослого организма склера состоит из коллагеновых фибрилл, организованных в пластины, протеогликанов, неколлагеновых гликопротеинов и фибробластов. Склера динамически ремоделируется с целью изменения размеров глаза и обеспечения рефракции всю жизнь. Одним из нарушений зрения, связанным с изменением размеров глаза, является миопия – широко распространенное заболевание, затрагивающее структуру склеры в том числе.

В качестве экспериментальных объектов в данном исследовании использовались японские перепела *Coturnix coturnix japonica dom.* на разных сроках постнатального развития (10, 23 и 65 суток). Японский перепел – широко используемая модель для медико-биологических исследований, связанных с возрастными особенностями развития различных систем организма, обладает рядом преимуществ, в том числе короткий жизненный цикл, что позволяет в течение года получить данные, соответствующие разным возрастным группам, удобство содержания, высокая яйценоскость, широкое использование птиц отряда куриные как модельных объектов для исследования зрительной системы и влияния освещения на ее развитие [2-4]. С момента вылупления птенцы находились при разных видах повседневного LED-освещения с интенсивностью излучения  $0,04 \text{ мВт/см}^2$ . Красное светодиодное освещение с длиной волны 630 нм, синее светодиодное освещение с длиной волны 450 нм и дневной свет лампы накаливания для контрольной группы [5]. Суточные ритмы составляли 9 часов темноты (ночь) и 15 часов освещения (день).

Глаза перепелов исследовались с помощью акустической микроскопии *in situ* для получения данных о толщине и состоянии склеры в нативном состоянии. Акустическая микроскопия является широко используемым и хорошо зарекомендовавшим себя методом в офтальмологии. Преимуществами данного метода является неинвазивность, возможность проводить исследования в динамике на живых объектах по несколько раз, естественный акустический контраст биологических тканей, отсутствие артефактов в результате гистологической проводки и изготовления срезов. Кроме того, полученные с помощью акустической микроскопии изображения, отражают не только форму, размер и строение исследуемого объекта, но и его упруго-механические характеристики, что является важным диагностическим признаком многих патологических состояний [6].



**Рисунок 1.** Акустическое изображение (B/D-скан) глаза перепела *in situ*. 1 – роговица, 2 – хрусталик, 3 – склера, 4 – передняя камера глаза, 5 – стекловидное тело

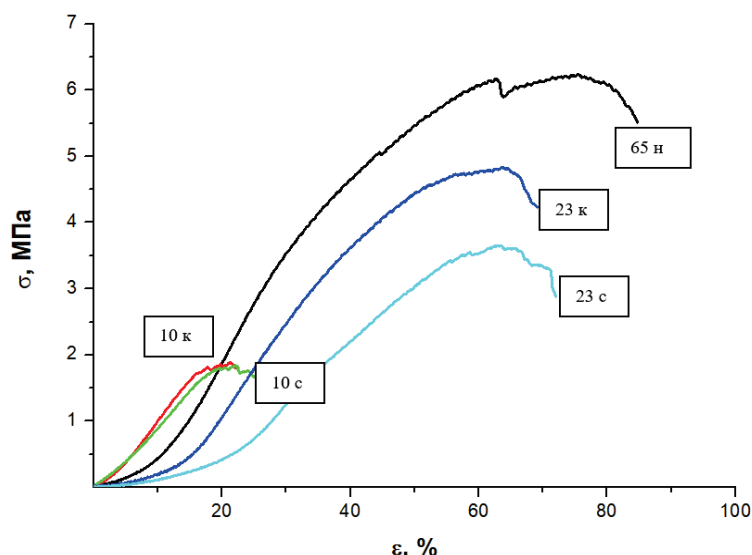
Измерения проводились с помощью сканирующего импульсного акустического микроскопа SIAM-2011, разработанного в лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН. Для данного эксперимента использовались длиннофокусные линзы с рабочей частотой 50-100 МГц. Такой тип линз является оптимальным для большинства биологических исследований и обеспечивает детальные изображения без потери качества в фокальной области на глубине до нескольких миллиметров. Разработанное программное обеспечение позволяет получать массив данных, соответствующий поперечному гистологическому срезу через глаз с использованием динамической фокусировки – B/D-скан, таким образом, что на одном акустическом изображении отображаются с высоким разрешением все структурные элементы глаза: роговица, передняя камера глаза, хрусталик, задняя камера глаза, стекловидное тело, склера (рис. 1). Исследования проводились при комнатной температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , в качестве иммерсионной жидкости использовался бидистиллированная вода. Время проведения одного эксперимента составляет около 10 минут. Оценка толщины склер *in situ* проводилась с помощью акустомикроскопических методик, что позволило добиться большей точности по сравнению с измерениями, выполненными с помощью микрометра, т.к. образец не сминается во время измерения и находится в нативном состоянии. Полученные данные о толщине склер представлены в таблице 1. После акустомикроскопических исследований глаза были энуклеированы и из них выделялись склеры для дальнейших испытаний.

Исследование механических свойств образцов склер проводили на универсальной испытательной машине производства фирмы Инстрон (США) модель 5965, укомплектованной датчиком нагрузки  $\pm 50$  Н (серия 2530). Испытания проводили в режиме одноосного растяжения на прямоугольных образцах. Длина рабочей части образца 3 мм, ширина 4 мм. Образцы склер для механических испытаний вырезались таким образом, чтобы в исследуемую область на включались участки с гребешком, т.к. механические свойства этих участков сильно отличаются от остальной склеры и могут оказывать влияние на результат эксперимента как концентраторы напряжения. Скорость испытаний составляла 6 мм/мин. Преднагрузка была 0,02 Н. Испытания проводили на воздухе при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Статистическая выборка выполнена по пяти образцам.

По полученным в результате испытаний деформационным кривым (рис. 2) в координатах напряжение – деформация определяли основные механические параметры: прочность, модуль упругости, деформацию разрушения (табл. 2).

**Таблица 1.** Определение толщины склеры перепела с помощью акустической микроскопии *in situ*

Тип освещения	Возраст, сутки	Толщина склеры, мкм
Красный	10	145±10
	23	140±10
Синий	10	150±10
	23	120±10
Естественный (контроль)	65	180±10



**Рисунок 2.** Типичные кривые деформации склер перепела: 10 к – 10 суток при красном освещении, 10 с – 10 суток при синем освещении, 23 к – 23 суток при красном освещении, 23 с – 23 суток при синем освещении, 65 н – 65 суток при естественном освещении (норма)

Результаты механических испытаний были проинтерпретированы в рамках модели высокоэластичности, основанной на не-Гауссовой статистике [7]. Эта двухпараметрическая модель представляет полимерную сетку как совокупность кубических элементов, в геометрическом центре каждого из которых находится узел. От узла в вершины куба отходят 8 цепей (поэтому часто эти модели называют «8-ми цепочечными»). Определяемыми параметрами являются: количество 8-ми цепочечных элементов ( $N_8$ ) и начальный модуль сдвига ( $\mu_0$ ) (табл. 2). Показано, что на ранних этапах (10-ые сутки) формируется жесткий каркас внеклеточного матрикса, обладающий небольшим количеством узлов ( $N_8$ ), дальнейший рост склеры (до 23-х суток) сопровождается увеличением количества узлов, однако, начальный модуль сдвига, характеризующий жесткость соединяющих их эластических сегментов, падает. Можно предположить, что это отражает процесс формирования высокоэластической сетки неколлагеновых гликопротеинов и протеогликанов, связывающей в единую систему пластины фибриллярного коллагена [8-10]. В тоже время, характеристики модуля упругости и прочности, показывают стабильность жесткого коллагенового каркаса при красном освещении и его изменение при синем освещении.

При развитии глаза в условиях естественного освещения 65-ым суткам происходит рост жесткости высокоэластической сетки, соединяющей коллагеновые пластины, и количество узлов шивки.

Полученные данные (табл. 1 и 2) свидетельствуют о том, что формирование склеры в ранний постнатальный период может зависеть от спектрального состава повседневного освещения. Так, у 23-суточных цыплят перепела при повседневном синем освещении толщина склеры несколько снижена в сравнении с красным освещением ( $\Delta 14\%$ ), в сочетании со снижением ее эластичности и прочности ( $\Delta 7\%$ ). Таким образом, показано, что спектральный состав освещения оказывает влияние на физико-механические свойства матрикса склеры. Предполагаются дальнейшие исследования влияния спектрального состава освещения на формирование глаза в раннем постнатальном периоде рамках задач по моделированию детской миопии.

#### Список литературы / References:

1. Summers Rada J., Shelton S., Norton T. The sclera and myopia. *Experimental Eye Research*, 2006, vol. 82, pp. 185-200.
2. Wisely C., Sayed J., Tamez H., Zelinka C., Abdel-Rahman M., Fischer A., Cebulla C. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *J. Prog Retin Eye Res*, 2017, vol. 61, pp. 72-97.

**Таблица 2.** Физико-механические характеристики склер перепела

	Возраст, сутки	$N_8$	$\mu_0$ , МПа	E, МПа	$\sigma_p$ , МПа	$\epsilon_p$ , %
красный	10	9,170	0,058	11,6±2,8	1,86±0,64	22±2
	23	9,428	0,041	12,4±2,1	4,06±0,84	65±5
синий	10	9,289	0,093	11,3±3,2	1,83±0,15	21±4
	23	9,370	0,038	8,7±0,6	3,31±0,96	55±9
контроль	65	9,452	0,105	20,4±5,1	5,98±1,57	53±14

3. Ostrin L. Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure. *Clin. Exp. Opt.*, 2019, vol. 102, pp. 99-108.
4. Sereznikova N., Pogodina L., Lipina T., Trofimova N., Gurieva T., Zak P. Age-related adaptive responses of mitochondria of the retinal pigment epithelium to the everyday blue LED lighting. *Doklady Biological Sciences*, 2017, vol. 475, no. 1, pp. 141-143.
5. Rucker F. Monochromatic and white light and the regulation of eye growth, *Exp. Eye Res.*, 2019, vol. 184, pp. 172-182.
6. Khramtsova E.A., Zak P.P., Petronyuk J.S., Trofimova N.N., Krashennnikov S.V., Titiov S.A., Gurieva T.S., Dadasheva O.A., Grigoriev T.E., Levin V.M. Light induced myopia in Japanese quail chicks by acoustic microscopy. *Proceedings of VII International Conference AIS-2020*, in press.
7. Elias-Zuniga A. A non-Gaussian network model for rubber elasticity. *Polymer*, 2006, vol. 47, pp. 907-914.
8. Fratzl P. (eds), *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer, Boston, 2008, pp. 359-397.
9. Khramtsova E., Morokov E., Lukanina K., Grigoriev T., Petronyuk Y., Shepelev A., Gubareva E., Kuevda E., Levin V., Chvalun S. Impulse acoustic microscopy: A new approach for investigation of polymer and natural scaffolds. *Polymer Engineering and Science*, 2017, vol. 57, no. 7, pp. 709-715.
10. Morokov E., Khramtsova E., E. Kuevda, Gubareva E., Grigoriev T., Lukanina K., Levin V. Noninvasive ultrasound imaging for assessment of intact microstructure of extracellular matrix in tissue engineering. *Artif Organs*, 2019, vol. 43, no. 11, pp. 1104-1110.

#### THE INFLUENCE OF ILLUMINATION SPECTRA ON SCLERA PHYSICO-MECHANICAL PROPERTIES ON JAPANESE QUAIL CHICK MODEL

Khramtsova E.A.<sup>1</sup>, Krashennnikov S.V.<sup>2</sup>, Petronyuk Y.S.<sup>1</sup>, Trofimova N.N.<sup>1</sup>, Gurieva T.S.<sup>3</sup>, Dadasheva O.A.<sup>3</sup>, Levin V.M.<sup>1</sup>, Grigoriev T.E.<sup>2</sup>, Zak P.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences  
Kosygin st., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: alyonushk@gmail.com

<sup>2</sup> National Research Centre "Kurchatov Institute"  
Akademika Kurchatova pl. 1, Moscow, 123182, Russia

<sup>3</sup> Research Center Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences  
Khoroshevskoe Shosse, 76a, Moscow, 123007, Russia

**Abstract.** The research presents preliminary data about influence of everyday illumination spectra on the postnatal development of the sclera (blue light - 450 nm; long-wave red light - 630 nm and daylight for the control group). Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica dom.*) are widely used animal model for studying of eye development structures and various eye disorders. The thickness of sclera was studied by non-invasive methods using scanning impulse acoustic microscopy, which allows to take measurements with minimal distortion *in situ*. After the sclera was isolated, mechanical tests were carried out and the main physico-mechanical characteristics were determined. It was shown that on the 23rd day of postnatal development in blue light conditions the decrease in the thickness of the sclera ( $\Delta 14\%$ ) is observed in combination with a decrease in its elasticity ( $\Delta 7\%$ ). Interpretation of mechanical test results was made via a model of high elasticity based on non-Gaussian statistics that estimates the locations of the main structural elements of the sclera (extracellular matrix). The model revealed some features of the sclera development under different spectral illumination. The work was performed as part of the tasks of kid's myopia modeling.  
**Key words:** sclera, quail, extracellular matrix, ultrasound microscopy, physico-mechanical characteristics, native tissue.