

## АНАЛИЗ ДИНАМИКИ РАЗВИТИЯ СТРУКТУР ГЛАЗА ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА (COTURNIX COTURNIX JAPONICA DOM.) УЛЬТРАЗВУКОВЫМИ ВЫСОКОЧАСТОТНЫМИ МЕТОДАМИ

Петронюк Ю.С.<sup>1</sup>, Храмцова Е.А.<sup>1</sup>, Трофимова Н.Н.<sup>1</sup>, Андрюхина О.М.<sup>2</sup>, Рябцева А.А.<sup>2</sup>, Гурьева Т.С.<sup>3</sup>, Дадашева О.А.<sup>3</sup>, Левин В.М.<sup>1</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: jps7@mail.ru

<sup>2</sup> ГБУЗ МО МОНИКИ им. Владимирского  
ул. Щепкина, 61/2, г. Москва, 129110, РФ

<sup>3</sup> Институт медико-биологических проблем РАН  
ш. Хорошевское, 76а, г. Москва, 123007, РФ

Поступила в редакцию: 16.07.2021

**Аннотация.** Одомашненная популяция Японского перепела *Coturnix japonica* является эффективной животной моделью возрастной офтальмологической направленности. В работе приведены результаты измерения размеров глаза цыплят перепела и его структурных элементов методами сканирующей акустической микроскопии (50-100 МГц). Показана динамика развития структур и их формирование в ранних стадиях постнатального развития. Измерения в условиях *in vitro* были выполнены на 10, 20 и 30-ти дневных цыплятах, а также на 65-ти дневных ювенильных птицах. Получены данные о возрастном формировании размеров и сферичности глазного яблока, роговицы, передней камеры, хрусталика, стекловидного тела. Результаты являются основой для дальнейших исследований по выявлению факторов провоцирования и профилактики ранней миопизации глаза.

**Ключевые слова:** онтогенез глаза, японский перепел, акустическая микроскопия.

Цыплята Японского перепела, наравне с цыплятами домашних кур, являются распространенной биомоделью различных форм офтальмопатологии, в том числе при моделировании детской миопии [1-5]. Основным преимуществом такой биомодели оказывается чрезвычайно мощная светорегулируемая циркадная мелатониновая система, что позволяет одновременно выполнять исследование процессов миопизации, изучать возможные светорегуляторные функции мелатонина в этих процессах и проводить эксперименты в максимально короткие сроки. Существует гипотеза, согласно которой миопический рост детского глаза по переднезадней оси стимулируется возбуждением красночувствительных и зеленочувствительных колбочек сетчатки, а возбуждение синечувствительных фоторецепторов тормозит этот рост [6,7]. Для экспериментальных исследований в этой области необходимой базой являются методики наблюдения за развитием живых структур с минимальным вмешательством в процессы их жизнедеятельности. Одним из методов для прямого наблюдения является ультразвуковая визуализация, позволяющая работать неинвазивно в широком диапазоне рабочих частот и разрешающей способности. В данной работе динамика развития глаза японского перепела исследовалось *in situ* неинвазивным высокочастотным ультразвуковым методом акустической микроскопии в период с 10 по 65 сутки. Показана динамика изменения линейных размеров отдельных структур глаза: роговицы, хрусталика, передней и задней камеры глаза, а также проанализировано комплексное изменение всей оптической системы глаза при нормальном развитии.

Акустическая микроскопия традиционно используется для наблюдения структуры тканей и клеток в биологических [8], эмбриологических [9] и медицинских [10] исследованиях. Первоначально применение метода ограничивалось наблюдением микроструктуры поверхности биологических объектов; но с развитием импульсного режима появилась возможность отображения объемной структуры с микронным разрешением. Короткий зондирующий импульс, распространяясь внутри объекта исследования, отражается от границ элементов его внутренней структуры, регистрируется и визуализируется в виде эхограммы с последовательностью пиков от границ на соответствующей глубине. Механическое сканирование зондирующего ультразвукового пучка позволяет отображать структуру объекта послойно в виде поперечных сечений (В-сканы) и по глубине (С-сканы). Принципы метода описаны более подробно в [11].

В данной работе для исследования структуры и геометрии глаза перепела применялся импульсный акустический микроскоп, разработанный в ИБХФ РАН (СИАМ-2018, РФ). Использовался акустический объектив с рабочей частотой 50–100 МГц, малой угловой апертурой 22° и диаметром фокальной перетяжки 50 мкм. Перемещение акустической линзы осуществлялось прецизионными двигателями с шагом 25 мкм. Основными режимами визуализации было традиционное в медицинской практике А, В и В/D сканирование в виде сечений по глубине [5]. Режим динамической фокусировки - В/D-скан, использовался для обеспечения высокого уровня контрастности акустических изображений по всей глубине сечения. Эхо-импульсным методом измерялись продольные размеры структур глаза с погрешностью порядка ±15 мкм. В качестве иммерсии использовался ультразвуковой гель низкой вязкости и бидистиллят. Исследования проводились при комнатной температуре 23 ± 2°C. Время проведения одного эксперимента составляет около 10 минут.

Исследовались глаза японского перепела в возрасте 10, 20, 30 и 65 суток развития в норме. Для получения наиболее достоверной информации при сравнительном анализе ультразвуковых данных птенцы перепела взвешивались и калибровались по весу  $\pm 10$  г с точностью  $\pm 1$  г.

Исследования проводились *in vitro* со стороны роговицы при их естественном положении в глазных орбитах. Эхограмма сигналов (А-скан) вдоль оптической оси позволяла измерять размер глаза в целом, толщину роговицы и склеры, хрусталика, передней камеры и стекловидного тела. Система сканирования позволила позиционировать акустическую линзу максимально точно по центру глазного яблока, а также измерять размеры глаза в двух перпендикулярных оси направлениях – диаметрах экватора. Измерения проводились для левого и правого глаза для выборки из пары цыплят для каждого возраста 10, 20, 30 и 65 суток.

Эксперимент проводился в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных и приказу Минздравсоцразвития № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики».

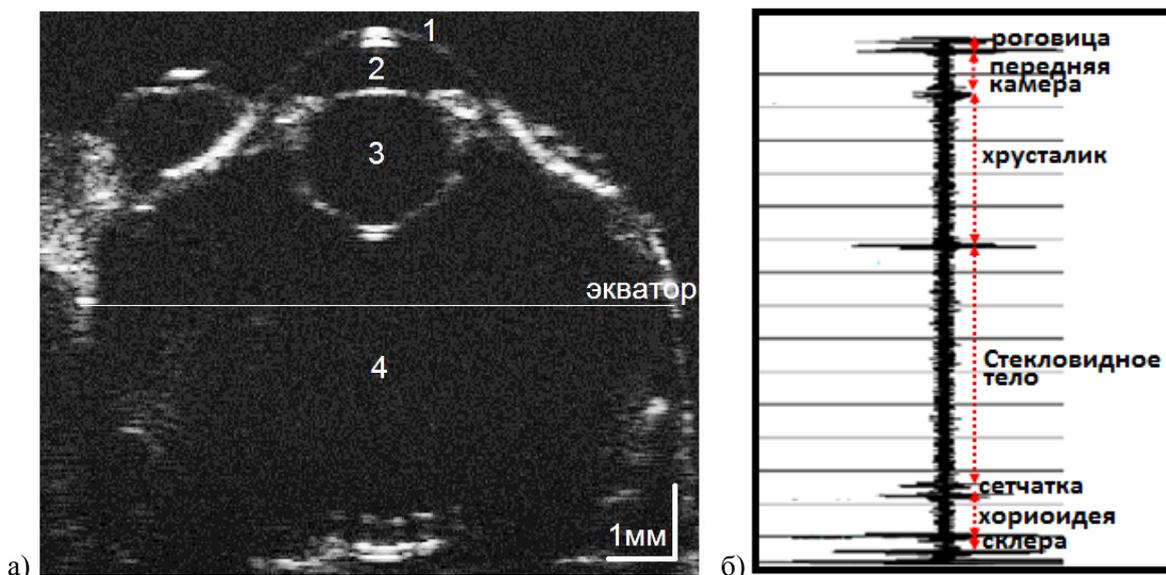
На рисунке 1а представлено акустическое изображение (В/D-скан) глаза цыпленка перепела возрастом 10 суток. На изображении видны структуры глаза – роговица, передняя камера, хрусталик, стекловидное тело. На рисунке 1б приведена эхограмма импульсов, отраженных от границ структурных элементов. Измерение времени задержки между импульсами с учетом данных о скорости звука позволяет получить расстояние между границами, а именно толщину структурных элементов.

$$d = 0,5 (v \cdot t),$$

где  $d$  – толщина измеряемого структурного элемента,  $v$  – скорость звука,  $t$  – время пробега между границами элемента.

В таблице 1 приведены усредненные литературные данные о скорости звука внутри тканей глаза. Ткани глаза являются сильно обводненными, и величина скорости звука в них приближается к значению, характерному для воды – 1500 м/с. В таблице указаны значения скорости звука для роговицы, хрусталика и склеры, поскольку эти ткани имеют более плотную структуру и, соответственно, эта величина в них несколько отличается от значения для воды. Приведенные данные (табл. 1) использовались для определения толщины структурных элементов глаза вдоль переднезадней оси глаза.

В таблице 2 приведены результаты ультразвуковых измерений – осевая длина, диаметр экватора, толщины роговицы, передней камеры, хрусталика, стекловидного тела. Коэффициент сферичности определялся из соотношения диаметра экватора глаза к осевой длине (переднезадняя ось).



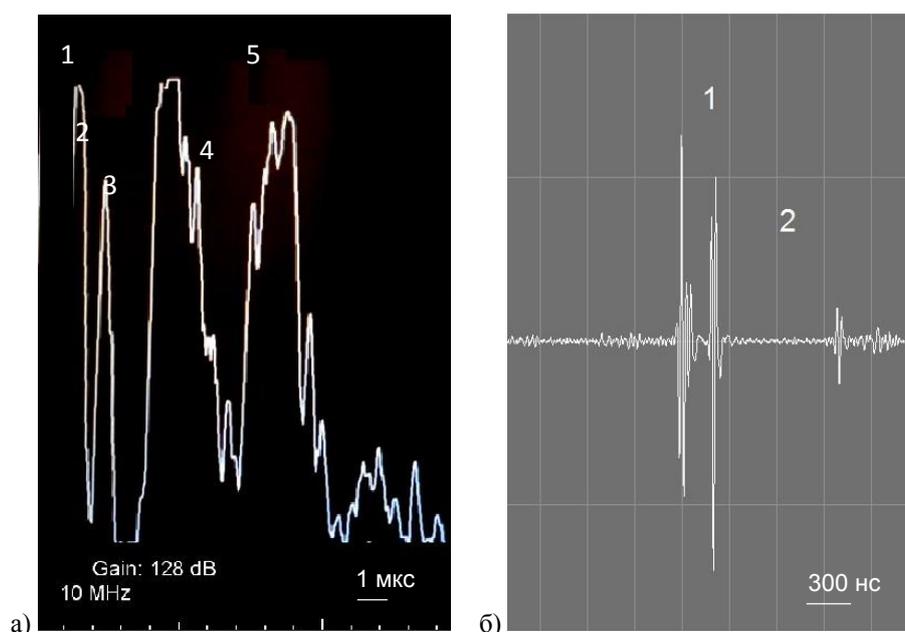
**Рисунок 1.** Акустическое изображения глаза перепела возрастом 10 дней. (а) – В/D-скан; (б) – эхограмма импульсов переднего отдела глаза. 1 – роговица, 2 – передняя камера глаза, 3 – хрусталик, 4 – стекловидное тело

**Таблица 1** Скорости звука в частях глаза по данным из литературы, м/с

Значение	роговица	хрусталик	склера	Стекловидное тело	Вода
среднее	1562,5	1629	1639	1519,5	1500
минимальное	1550	1585	1622	1495	-
максимальное	1575	1673	1656	1544	-

**Таблица 2.** Результаты ультразвуковых морфометрических измерений глаза *Coturnix japonica* в условиях *in situ*. Приведено среднее значение в миллиметрах для выборки из пары цыплят (4 глаза) для каждого возраста. Величина СКО варьируется внутри погрешности измерения ( $\pm 15$  мкм)

Возраст, сутки	Осевая длина $L$ , мм	Диаметр экватора $D$ , мм	Коэффициент сферичности $L/D$	Передняя камера, мм	Роговица, мм	Хрусталик, мм	Стекловидное тело, мм
10	5,85	8,24	0,71	0,60	0,135	1,85	3,05
20	6,45	8,72	0,74	0,58	0,135	2,01	3,55
30	7,20	9,86	0,73	0,61	0,158	2,05	3,97
65	8,15	10,1	0,81	0,85	0,141	2,72	4,37



**Рисунок 2.** Эхограмма глаза Японского перепела при А-сканировании: а) офтальмологический ультразвуковой сканер HiScan OPTICON, (б) – ультразвуковой микроскоп SIAM (ИБХФ РАН), 1 – роговица, 2 – передняя камера, 3 – хрусталик, 4 – стекловидное тело, 5 – склера.

На рисунке 2 показаны эхограммы импульсов, полученных *in vivo* для глаза перепела возрастом 65 суток с использованием ультразвукового офтальмологического сканера HiScan OPTICON, 10 МГц (а) и акустического микроскопа SIAM, 50 МГц (б). На эхограммах видно, что измерения на частоте 10 МГц (HiScan) не позволяют исследовать тонкие структуры глаза, такие как склера и роговица, из-за высокой погрешности  $\pm 0,3$  мм. Акустическая микроскопия использует более высокочастотные, сфокусированные и короткие зондирующие импульсы, что позволяет уверенно разделять эхосигналы от более тонких структур и получать данные о размерах структур глаза с точностью  $\pm 15$  мкм.

Проведенные измерения показывают, что при нормальном развитии в первой трети жизни глаза перепелов растут пропорционально (коэффициент сферичности) и линейно. Полученные данные о соотношении размеров основных оптических структур глаза перепела могут использоваться в качестве сравнительной шкалы при миопических рефракционных нарушениях. Предполагается дальнейшее исследование влияния спектрального состава освещения на формирование глаза в раннем постнатальном периоде в рамках задач по моделированию детской миопии.

*Экспериментальная часть работ выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание).*

#### Список литературы/References:

1. Зак П.П. и др. Экспериментальная модель для исследования механизмов возрастных и дегенеративных изменений в сетчатке глаза человека (японский перепел *C. japonica*). *Доклады Академии наук*, 2010, т. 434, № 2, с. 272-274. [Zach P.P. et al. Experimental model for studying the mechanisms of age-related and degenerative changes in the human retina (Japanese quail *C. japonica*). *Reports of the Academy of Sciences*, 2010, vol. 434, no. 2, pp. 272-274. (In Russ.)]

2. Wisely C. et al. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2017, vol. 61, pp. 72-97.

3. Sarfare S. et al. The effects of brief high intensity light on ocular growth in chicks developing myopia vary with time of day. *Exp Eye Res.*, 2020, vol. 195, art: 108039.
4. Sayed J. et al. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2017, vol. 61, pp. 72-97
5. Rucker F. Monochromatic and white light and the G regulation of eye growth. *Experimental Eye Research*, 2019, vol. 184, pp. 172-182.
6. Qian Y.S. et al. Incidence of myopia in high school students with and without red-green color vision deficiency. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, vol. 50, no. 4, pp. 1598-1605
7. Liu R. et al. The effects of monochromatic illumination on early eye development in rhesus monkeys. *Investig. Ophthalm. and Visual Science*, March, 2014, vol. 55, pp. 1901-1909.
8. Lemons R.A., Quate C.F. Acoustic microscopy: biomedical applications. *Science*, 1974, vol. 188, pp. 905-911.
9. Foster F.S., Zhang M.Y., Duckett A.S., Cucevic V., Pavlin C.J. In vivo imaging of embryoni development in the mouse eye by ultrasound biomicroscopy. *Investig. Ophthalm. and Visual Science*, 2003, vol. 44, pp. 2361-2366.
10. Sasaki H., Saijo Y., Tanaka M., Nitta S., Terasawa Y., Yambe T., Taguma Y. Acoustic properties of dialysed kidney by scanning acoustic microscopy. *Nephrol. Dial. Transplant*, 1997, vol. 12, pp. 2151-2154.
11. Zakutailov K.V. et al. *Inorganic Materials*, 2010, vol. 46, p. 1655.

#### ANALYZING THE DYNAMICS OF THE JAPANESE QUAIL EYE STRUCTURES DEVELOPMENT BY SCANNING ACOUSTIC MICROSCOPY TECHNIQUE

Petrynyuk Y.S.<sup>1</sup>, Khrantsova E.A.<sup>1</sup>, Trofimova N.N.<sup>1</sup>, Andriukhina O.M.<sup>2</sup>, Ryabtseva A.A.<sup>2</sup>, Gurieva T.S.<sup>3</sup>, Dadasheva O.A.<sup>3</sup>, Levin V.M.<sup>1</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: jps7@mail.ru

<sup>2</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute "MONIKI"  
Shchepkin str. 61/2, Moscow, 129110, Russia

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

**Abstract.** The domesticated population of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica dom.*) is an effective animal model of age-related ophthalmological orientation. The paper presents the results of the size measuring of quail chickens eye and its structural elements using scanning acoustic microscopy technique (50-100 MHz). The dynamics of the eye structures development and their formation in the early stages of postnatal development are shown. In vitro measurements were performed at 10, 20 and 30-day-old chickens, as well as on 65-day-old juvenile birds. Data on the age-related formation of the size and configuration of the eyeball, cornea, anterior chamber, lens, vitreous body were obtained. The results are the basis for further research to identify factors that provoke and prevent early myopization of the eye.

**Key words:** ontogeny of the eye, Japanese quail, acoustic microscopy.