

ВЫСОКОЧАСТОТНАЯ СОНОГРАФИЯ СЕРДЕЧНО СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ В РАННЕМ РАЗВИТИИ НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Бурлаков А.Б., Титов С.А., Зыкова Л.А.

Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН
ул. Бултерова, 15, г. Москва, 117342, РФ; e-mail: burlakovao@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В работе описана методика высокочастотного ультразвукового исследования *in vivo* сердечно сосудистой системы низших позвоночных на ранних стадиях их развития. Основой экспериментальной установки, используемой в исследованиях, является сканирующий акустический микроскоп с пространственным разрешением 20 мкм, совмещенный с оптическим инвертированным микроскопом. Показано, что пространственная и временная разрешающие способности сонографического модуля являются достаточными для визуализации структуры сердца и регистрации движения его компонентов. Экспериментальные работы выполнены на особях *Misgurnus fossilis* и *Danio rerio*, находящихся на предличиночной стадии развития. Исследуемые организмы после иммобилизации помещались в иммерсионную ячейку сонографического модуля, а ультразвуковые данные записывались в зависимости от пространственных координат и времени. Полученные ультразвуковые сканы отчетливо показывают структурные элементы сердца, на них различаются отражения ультразвуковых сигналов от стенок сердца и элементов крови. В сканах выявляется периодичность ультразвукового пространственно–временного сигнала по временной переменной, соответствующая ритму сердечной деятельности. Продемонстрировано, что по выделенным ультразвуковым сигналам можно определить траекторию движения стенок сердца в различных его областях, а также проводить измерения скорости кровотока. Найдено, что вертикальная компонента скорости элементов крови составляет примерно 0,8 и 0,08 мм/с во время систолы и в паузе, соответственно.

Ключевые слова: низшие позвоночные, сердечно сосудистая система, сонография, сканирующий акустический микроскоп.

В настоящее время эмбрионы рыб являются популярным модельным объектом для исследований в области биологии развития, генетики, экологии, медицины [1-3]. Использование эмбриональной модели в исследовательских работах является весьма перспективным, поскольку дает возможность проследить влияние различных факторов на живые системы в период стремительного усложнения, когда даже незначительные возмущающие воздействия могут приводить к нарушениям программы развития и появлению видимых аномалий. Особенно интересны в этом отношении эмбрионы низших позвоночных, развитие которых происходит во внешней среде и доступно для непосредственного наблюдения.

Для исследования процессов развития эмбрионов рыб широко используются оптические методы [4-6]. Однако с их помощью зачастую оказывается затруднительным визуализировать области живых объектов, которые являются малоконтрастными для оптического излучения или располагаются под непрозрачными слоями. В значительной степени преодолеть указанные затруднения позволяют ультразвуковые методы визуализации. Существующие в настоящее время сонографические установки эффективны для исследования сердечно сосудистой системы и измерения параметров кровотока взрослых особей рыб [7-11]. Вместе с тем, исследование сердца эмбриона или личинки рыбы, имеющего характерные размеры 0,10–0,15 мм с помощью подобных приборов представляется затруднительным вследствие недостаточно высокого разрешения. Более высокое пространственное разрешение позволяет достигнуть метод сканирующей акустической микроскопии, который был успешно применен для наблюдения различных структур зародыша, его роста, деления клеток и характеристики упругих свойств тканей [12,13]. В данной работе разработана методика и проведено сонографическое исследование сердечно сосудистой системы эмбрионов и личинок рыбы вьюна *Misgurnus fossilis* с помощью сканирующего акустического микроскопа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на особях вьюна *Misgurnus fossilis*, классическом объекте биологии развития. Самок, отловленных из природы, содержали в холодильнике при температуре 4-5°C. Для ускорения созревания самок применяли гормональную стимуляцию хорионическим гонадотропином (ХГ) при комнатной температуре. Получение половых продуктов и искусственное осеменение проводили по стандартной методике [3]. Оплодотворенные яйцеклетки тщательно промывали двумя порциями свежей воды. После этого зародышей размещали в термостате с температурой 17°C. Стадии развития определяли по таблицам нормального развития вьюна [3]. Эмбрионов на заключительных стадиях развития и вылупившихся личинок использовали для сонографического исследования. Для иммобилизации живых объектов использовали 2 % процентный раствор лидокаина, в который организм помещали на 2 минуты перед перенесением в экспериментальную установку.

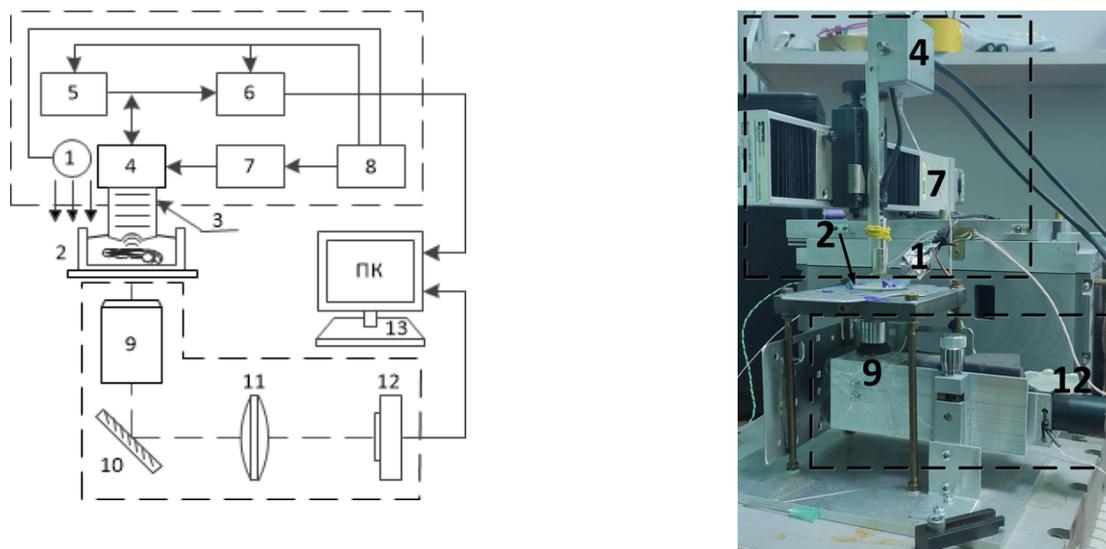


Рисунок 1. Схема экспериментальной установки: 1 – светодиод; 2 – исследуемый объект; 3 – акустическая линза; 4 – ультразвуковой преобразователь; 5 – генератор сигналов; 6 – приемный блок с АЦП; 7 – механический сканер; 8 – контроллер; 9 – микрообъектив; 10 – зеркало; 11 – линза; 12 – камера; 13 – компьютер

Схема установки приведена на рисунке 1. Личинку 2 погружали в воду, служащей в качестве иммерсионной жидкости. Акустический объектив, состоящий из ультразвукового преобразователя 4 и линзы 3, генерировал зондирующие импульсные волны и принимал отраженные от объекта эхо-сигналы. Для возбуждения преобразователя использовался генератор электрических импульсов 5, а прием отраженных сигналов осуществлялся с помощью приемного блока 6, состоящего из малошумящего широкополосного усилителя, аналогового фильтра и аналого-цифрового преобразователя. Для получения ультразвукового изображения акустический объектив механически перемещался в поперечных направлениях посредством двух-координатного сканера 7.

Частотный диапазон акустического микроскопа, определяемый используемым ультразвуковым объективом, составлял 70 ± 30 МГц, а угловая апертура – 40° . Данные параметры прибора обеспечивали пространственное продольное и поперечное разрешение примерно 20 мкм [13].

Описанный сонографический модуль был совмещен с инвертированным оптическим микроскопом, состоящим из микрообъектива 9, зеркала 10 и линзы 11, формирующей изображение в плоскости цифровой видеокамеры 12. Изображение объекта 2 регистрировалось снизу через прозрачное дно иммерсионной ячейки. Для освещения объекта использовался светодиод 1. Получаемые оптические изображения объекта совместно с ультразвуковыми данными передавались в компьютер 13 для дальнейшей обработки и визуализации. Наличие оптического микроскопа позволяло производить настройку положения личинки, контролировать ее состояние в процессе эксперимента и использовать получаемые видеоданные при интерпретации результатов эксперимента.

МЕТОДИКА УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СЕРДЦА

Ультразвуковое наблюдение движения органов организмов в области сердца основано на записи отраженных эхо-сигналов в зависимости от продольной координаты z и времени T . Регистрация таких пространственно-временных сигналов, называемых М-сканами, производится при различных положениях продольной оси акустического объектива x , y относительно исследуемой области организма (рис. 2 (а)). Время записи одного М-скана покрывало несколько периодов биения сердца и составляло в данном эксперименте 2,5 с. Пример типичного М-скана показан на рисунке 2 (б) в виде полутонового изображения, в котором уровень сигнала отображается градациями серого. По вертикали изображения откладывается продольная координата z , по горизонтали – время T .

В приведенном М-скане выделяются несколько характерных ультразвуковых откликов, порождаемых отражениями от акустических неоднородностей. Отклик А (рис. 2 (б)), расположенный наиболее близко к поверхности организма, образован отражением ультразвука от наружной стенки сердца, отклики S и D производятся рассеянием волн на элементах крови, а отклик В образован отражениями от противоположной стенки сердца и других более глубоко расположенных тканей. Наблюдается очевидная периодичность двигательной активности стенок с периодом примерно 0,8 с. В пространстве между стенками имеют место сигналы, отраженные от движущихся элементов крови. Тонкая структура этих сигналов показывает разнородность пространственного распределения элементов крови. Характер движения крови изменяется в зависимости от функционального периода в сердечном ритме, что позволяет выделить фазы систолы S и диастолы D.

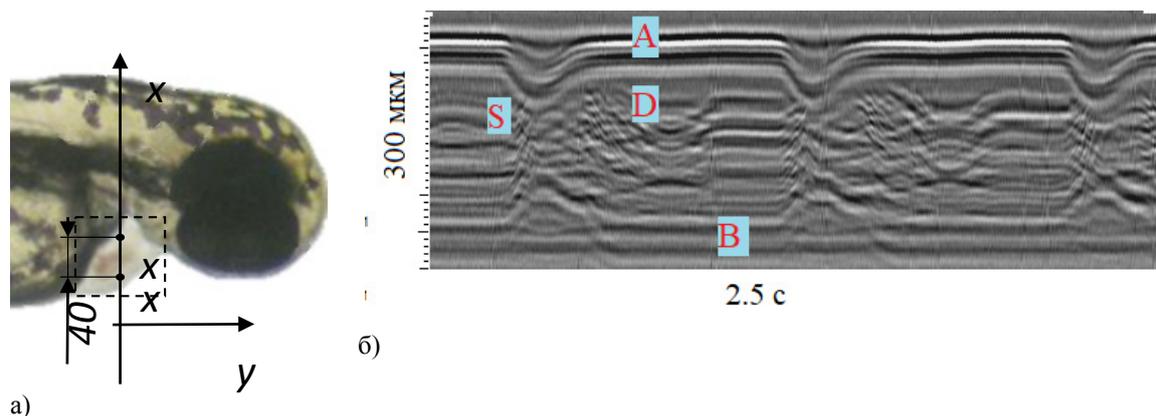


Рисунок 2. Оптическое изображение области сердца (а) и ультразвуковой пространственно временной сигнал (М-скан) (б)

Для визуализации поперечного сечения сердца, измерение производится в других положениях объектива x , и путем цифровой обработки данных осуществляется синхронизация М-сканов по отношению к фазам сердечного ритма. Трехмерная визуализация работающего сердца возможна путем регистрации данных в зависимости не только от x , но и от y .

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Разработанная методика была применена для *Danio rerio* на предличиночной стадии развития спустя сутки после вылупления из икринки. Оптическое изображение объекта (рисунок 2(а)) дает наглядное представление об исследуемой области сердца. На рисунке показано сечение, вдоль которого располагались точки регистрации ультразвуковых сигналов x_i . Некоторые из ультразвуковых М-сканов, полученных на протяжении нескольких секунд каждый, показаны на рисунке 3 в формате $s(t, T)$, где t – задержка сигналов при распространении волны вдоль оси z вглубь организма. Показанные сканы измерены с шагом 8 мкм в диапазоне 40 мкм между соседними точками x_{32} и x_{42} .

На изображениях можно обнаружить и распознать несколько характерных ультразвуковых эхосигналов, демонстрирующих явную периодичность движения. Период данного сигнала ΔT_h составляет примерно 0,6 с, что соответствует естественному ритму сердца. В данном случае поверхностный сигнал R практически стабилен, наблюдаются лишь незначительные смещения. Вместе с тем, непосредственно под поверхностью обнаруживается еще один слой, претерпевающий заметные смещения с частотой биения сердца. Сигнал H показывает периодическое движение внутренних мышечных стенок сердца. Между стенками сердца генерируется сигналы В, которые являются отраженными от движущихся элементов крови. Видно, что расстояние между сигналами R и H меняются не только в зависимости от времени, но и от расстояния, что обусловлено формой сердца.

В наблюдаемых сигналах распознаются фазы систолы, когда имеет место встречное движение сигналов, и фазы диастолы, когда стенки движутся в противоположных направлениях. Сигналы показывают, что плавные смещения сменяются резкими движениями с большими скоростями и ускорениями, особенно в начале систолы. Движение крови В также носит импульсный характер, причем вертикальная скорость движения элементов крови может превосходить скорость движения стенок.

ИЗМЕРЕНИЕ СКОРОСТИ КРОВОТОКА

По ультразвуковому отклику В можно исследовать течение крови, характер которой меняется на различных участках со временем T , а также проводить измерения скорости кровотока. Способ измерения скорости движения элементов крови в сердце предличинки проиллюстрирован на рисунке 4. За некоторое время ΔT_b частицы проходят по вертикали расстояние, пропорциональное изменению задержки ультразвукового сигнала.

Зная скорость распространения звука в среде C_W , скорость движения частиц крови можно рассчитать по формуле:

$$V = \frac{\Delta t \cdot C_W}{2\Delta T_b}, \quad (1)$$

где Δt – изменение задержки ультразвукового сигнала за время ΔT_b , а в качестве скорости звука в тканях организма можно использовать приближенную величину $C_W \approx 1500$ м/с, полученную ранее для эмбриона вьюна [12]. Значения вертикальной компоненты скорости крови составили: $V=0,083$ мм/с в паузе между ударами сердца (область В₁) и $V=0,75$ мм/с во время систолы (область В₂).

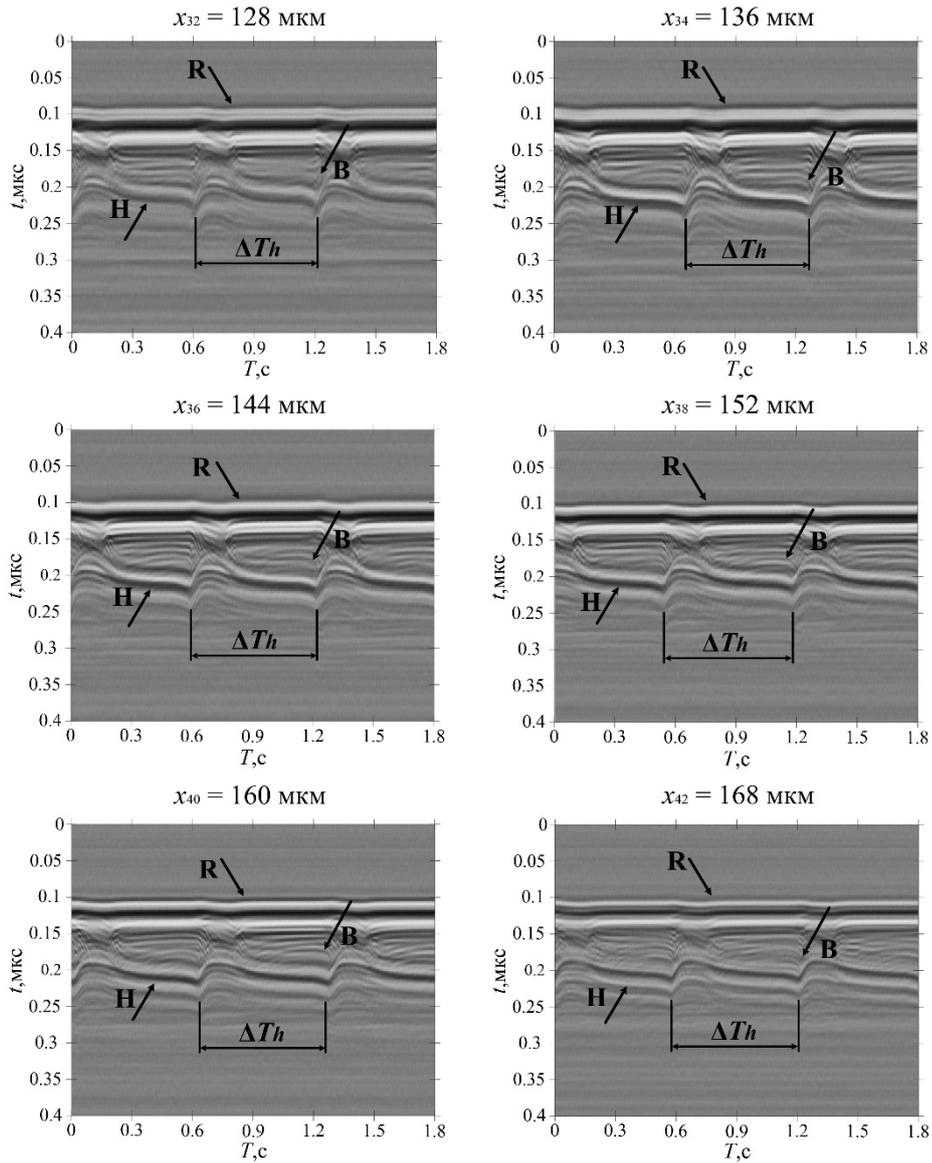


Рисунок 3. Ультразвуковые сигналы, измеренные в различных точках сердца

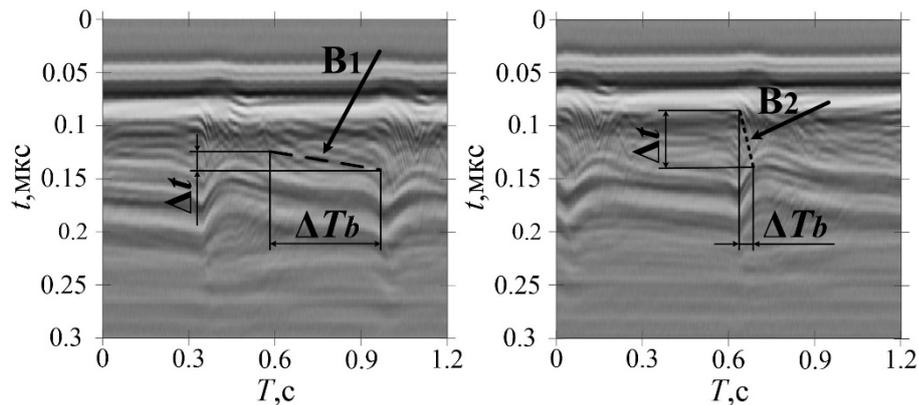


Рисунок 4. Измерение скорости кровотока по ультразвуковым данным

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что разработанная методика сонографического исследования *in vivo* малых организмов может быть использована для визуализации сердечно сосудистой системы низших позвоночных на ранних стадиях развития. Показано, что пространственное и временное разрешение ультразвукового модуля являются достаточными для наблюдения структуры сердца и движения его

компонентов, продемонстрировано, что по ультразвуковым данным можно проводить измерения скорости движения стенок сердца и элементов крови на разных фазах сердечного периода.

Вместе с тем следует отметить, что полученные результаты являются предварительными и развитие предложенной методики позволит существенно расширить ее возможности. Так путем цифровой обработки массивов ультразвуковых данных представляется возможным получать анимационные двухмерные и трехмерные изображения работающего сердца, строить карту скоростей движения элементов крови, вычислять интегральные параметры сердечно-сосудистой системы, принятые в кардиологических исследованиях. Объединение и совместная обработка ультразвуковых и видео данных, которые могут одновременно регистрироваться с помощью разработанной экспериментальной установки, потенциально могут существенно повысить информативность проводимых исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Государственного задания № 0069-2019-0009.

Список литературы / References:

1. Giardoglou P., Beis D. On Zebrafish Disease Models and Matters of the Heart. *Biomedicines*, 2019, vol. 7, no. 1, p. 15.
2. Бурлаков А.Б., Мачихин А.С., Хохлов Д.Д., Гадзаов А.Ф. Использование акустооптики для выявления локальной гетерогенности желтка в период подготовки к появлению спонтанной двигательной активности у эмбрионов вьюна, *Misgurnus fossilis*. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2019, № 2, с. 47-53. [Burlakov A.B., Machikhin A.S., Khokhlov D.D., Gadzaov A.F. Using acousto-optics to identify local heterogeneity of the yolk in preparation for the appearance of spontaneous locomotor activity in embryos of the loach, *Misgurnus fossilis*. *Biomeditsinskaya radioelektronika*, 2019, no. 2, pp.47-53. (In Russ.)]
3. Костомарова А.А. *Объекты биологии развития*. М.: Наука, 1975, с. 321. [Kostomarova A.A. *Developmental biology objects*. М.: Nauka, 1975, p. 321. (In Russ.)]
4. Daetwyler S., Günther U., Modes C.D., Harrington K., Huisken J. Multi-sample SPIM image acquisition, processing and analysis of vascular growth in zebrafish. *Development*, 2019, vol. 146, no. 6, dev173757, pp. 1-10.
5. Keller P.J., Schmidt A.D., Wittbrodt J., Stelzer E.H.K. Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science*, 2008, vol. 322, no. 5904, pp. 1065-1069.
6. Salman H.E., Yalcin H.C. Advanced blood flow assessment in Zebrafish via experimental digital particle image velocimetry and computational fluid dynamics modeling. *Micron*, 2020, vol. 130, no. 3, 10280.
7. Sun L., Lien C.L., Xu X., Kirk Shung. K. In Vivo Cardiac Imaging of Adult Zebrafish Using High Frequency Ultrasound (45-75 MHz). *Ultras. Med. Biol.* 2008, vol. 34, no. 1, pp. 31-39.
8. Huang C.C., Su T.H., Shih C.C. High-resolution tissue Doppler imaging of the zebrafish heart during its regeneration. *Zebrafish*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 48-57.
9. Wang L.W., Huttner I.G., Santiago C.F., Kesteven S.H., Yu Z.Y., Feneley M.P., Fatkin D. Standardized echocardiographic assessment of cardiac function in normal adult zebrafish and heart disease models. *Dis. Model. Mech.*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 63-76.
10. Fanga Y., Suna Y., Luo C., Gu J., Shi Z., Lu G., Silvestre J.-S., Chen Z. Evaluation of cardiac dysfunction in adult zebrafish using high frequency echocardiography. *Life Sciences*, 2020, vol. 253, p. 117732.
11. Evangelisti A., Schimmel K., Joshi S., Shah K., Fisch S., Alexander K.M., Liao R., Morgado I. High-Frequency Ultrasound Echocardiography to Assess Zebrafish Cardiac Function. *J. Vis. Exp.*, 2020, Mar 12, vol. 157, e60976.
12. Титов С.А., Бурлаков А.Б., Зинин П.В., Богаченков А.Н. Измерение скорости звука в тканях эмбрионов костистых рыб. *Изв. РАН. Сер. Физическая*, 2021, том 85, № 1, с. 140-144. [Burlakov A.B., Titov S.A., Zinin P.V., Bogachenkov A.N. Measuring the Speed of Sound in Tissues of Teleost Fish Embryos. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2021, vol. 85, no. 1, pp. 103-107. (In Russ.)]
13. Burlakov A.B., Titov S.A., Bogachenkov A.N. Ultrasonic monitoring of early development of lower vertebrate embryos. *J. of Physics: Conf. Series*, 2020, vol. 1679.

HIGH FREQUENCY SONOGRAPHY OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM IN THE EARLY DEVELOPMENT OF THE LOWER VERTEBRATES**Burlakov A.B., Titov S.A., Zykova L.A.**Scientific and Technological Center of Unique Instrumentation of RAS
Butlerova str., 15, Moscow, 117342, Russia; e-mail: burlakovao@mail.ru

Abstract. The paper describes the technique of high-frequency ultrasound examination *in vivo* of the cardiovascular system of lower vertebrates at the early stages of their development. The basis of the experimental setup used in the research is a scanning acoustic microscope with a spatial resolution of 20 μm , combined with an optical inverted microscope. It is shown that the spatial and temporal resolution of the sonographic module is sufficient for visualizing the structure of the heart and recording the movement of its components. Experimental work was carried out on individuals of *Misgurnus fossilis* and *Danio rerio* at the larval stage of development. The studied organisms after immobilization were placed in the immersion cell of the sonographic module, and the ultrasound data was recorded depending on the spatial coordinates and time. The received ultrasound scans clearly show the structural elements of the heart, they differ in the reflections of ultrasound signals from the walls of the heart and blood elements. The scans reveal the frequency of the ultrasonic spatio-temporal signal in terms of the temporal variable, which corresponds to the rhythm of cardiac activity. It has been demonstrated that the selected ultrasound signals can be used to determine the trajectory of the heart walls in its various regions, as well as to measure the blood flow velocity. It was found that the vertical component of the velocity of blood elements is approximately 0.8 and 0.08 mm / s during systole and in pause, respectively.

Key words: lower vertebrates, cardiovascular system, sonography, scanning acoustic microscope.