

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Храмцова Елена Александровна

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ АКУСТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ
ИССЛЕДОВАНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Специальность: 03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель: **Левин Вадим Моисеевич**, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией акустической микроскопии ФГБУН Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Акопян Валентин Бабкенович**, доктор биологических наук, профессор по кафедре медико-технических информационных технологий факультета биомедицинской техники ФГБОУ ВО «Московского государственного технического университета имени Н. Э. Баумана (национальный исследовательский университет)»

Яковенко Леонид Владимирович, доктор физико-математических наук, доцент, старший научный сотрудник кафедры биофизики физического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Ведущая организация: Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение [ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»»]

Защита состоится «__» _____ 20__ года в ____ часов ____ минут на заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на сайте https://ibcp.chph.ras.ru/docs/Dissertacia_Khramtsova.pdf

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук

Мазалецкая Л.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Развитие современной биологии и медицины требует постоянного совершенствования методов и технологий исследования живых объектов. Биологические системы являются наиболее сложными в исследовании, а большинство применяемых методов не дают возможность изучать биологические объекты без активного вмешательства в процессы их жизнедеятельности. Поиск и разработка новых методов, приближающих нас к исследованию живых систем в их естественном состоянии, сохраняют свою актуальность.

Для неинвазивного прижизненного анализа морфологического и микроанатомического строения организмов перспективными являются методы, основанные на применении ультразвука. Ультразвук легко проникает в толщу плотных непрозрачных тканей; изображения, получаемые с помощью ультразвуковой техники, обладают хорошим контрастом без применения красителей; ультразвуковое излучение низкой интенсивности не оказывает негативного влияния на объект и на исследователя [1]. Однако применение ультразвука в биологии до недавнего времени сдерживалось низкой разрешающей способностью. Разработка нового класса приборов – акустических микроскопов, - открыла новые возможности применения ультразвуковых методов в биологии развития [2].

Несмотря на несомненную перспективность применения акустической микроскопии, в литературе опубликованы лишь единичные статьи, посвященные исследованию живых организмов в процессе раннего онтогенеза [3-6]. Внедрение акустической микроскопии в экспериментальную биологию для исследования биологических объектов *in vivo* и в динамике сдерживается, прежде всего, отсутствием специализированных методов, учитывающих особенности тех или иных объектов. Наиболее сложной проблемой является интерпретация получаемых результатов, для которой необходимо углубленное понимание механизмов взаимодействия ультразвукового пучка с неоднородными по своему составу и строению объектами.

Отдельной задачей является необходимость сбора систематизированной информации о последовательных стадиях развития биологических объектов. Это относится в первую очередь к получению акустических изображений на разных

стадиях развития. Кроме того, наблюдение объектов в динамике позволит проанализировать изменение акустических свойств тканей по мере их роста и развития, что предоставит возможность использовать акустическую микроскопию наравне с классическими гистологическими техниками.

В качестве объектов исследования были выбраны эмбрионы японского перепела (*Coturnix coturnix japonica dom.*) на стадии развития с 1 по 11 сутки. Данный выбор обусловлен несколькими факторами. Японский перепел является классическим объектом биологии развития, его анатомия и гистология достаточно хорошо изучены, что позволяет использовать эти данные для анализа ультразвуковых изображений. Вследствие того, что японский перепел является объектом космической биологии, разработка нового метода быстрого качественного и количественного анализа состояния этих животных позволит существенно упростить и ускорить исследование биологического материала как после космических полетов, так и в ходе наземных экспериментов по подготовке космических полетов.

Цель работы: разработка научно-методических основ применения акустической микроскопии для совокупного анализа микроанатомического строения и биофизических свойств тканей многоклеточных организмов в процессе эмбрионального развития в норме и при патологических изменениях на примере японского перепела *Coturnix coturnix japonica dom.*

Для этого были поставлены следующие **задачи:**

1. Разработать специализированные неинвазивные методы визуализации на основе акустической микроскопии для структурно-функционального анализа эмбриональных тканей и органов.
2. Изучить механизмы формирования акустических изображений микроанатомического строения эмбрионов перепела *Coturnix coturnix japonica dom.* на разных стадиях эмбриогенеза.
3. Оценить влияние иммерсионных сред и гистологических фиксаторов на акустические свойства эмбриональных тканей.
4. Исследовать особенности развития тканей и органов перепела *Coturnix coturnix japonica dom.* в процессе нормального эмбрионального развития на основании данных акустической микроскопии.

5. Применить методы акустической микроскопии для неповреждающего контроля эмбриотропных эффектов измененных газовых сред и условий космического полета.

Научная новизна

1. Разработан новый комплексный подход, позволяющий проводить акустомикроскопические исследования эмбрионов птиц на разных стадиях развития.
2. По данным акустической микроскопии впервые составлены таблицы нормального развития эмбрионов японского перепела.
3. Изучены функциональные изменения акустических свойств ряда тканей и органов в процессе онтогенеза и проведено сравнение с гистологическими данными.
4. Впервые получены данные акустических исследований эмбрионов, находившихся в процессе эмбриогенеза в состоянии невесомости и развивавшихся в измененных газовых средах.

Практическая значимость

1. Полученные таблицы акустических изображений нормального развития, подтвержденные гистологическим анализом, могут использоваться как эталонные для дальнейшего исследования эмбрионов птиц в ходе различных экспериментов.
2. Данные о влиянии фиксирующих агентов на акустические свойства биологических тканей применяются для количественной оценки скорости звука и акустического импеданса в эмбриональных тканях при сравнительном анализе.
3. Разработанный новый метод фиксации положения эмбриональных объектов во время сканирования позволяет работать как с эмбрионами на ранних стадиях развития, так и при различных патологических изменениях (некроз, отеки и т.д.).
4. Разработанные методики объемной ультразвуковой визуализации объектов биологии развития могут быть использованы для анализа влияния экспериментальных условий на гистологию, морфологию и анатомию изучаемого объекта.

Методология и методы исследования. Для исследования микроанатомического строения эмбрионов в интактном состоянии использовался метод акустической

микроскопии. Кроме того, полученные данные на тех же образцах подтверждались методами классической гистологической техники с изготовлением тотальных препаратов, окраски срезов по Маллори и просветлением тканей по методу Доусона.

Положения, выносимые на защиту

1. Подходы для проведения неинвазивных ультразвуковых исследований и визуализации высокого разрешения эмбрионов (тканей и внутренних органов) и их функционального состояния.
2. Новая методика иммобилизации биологических объектов, в том числе эмбрионов, не оказывающая негативного воздействия на объекты для проведения экспериментальных ультразвуковых исследований.
3. Оптимальный гистологический фиксатор для проведения акустомикроскопических исследований мягких тканей эмбриона.
4. Влияние упругих свойств тканей, а также формы и морфологии внутренних органов эмбриона на формирование акустических изображений в процессе онтогенеза.
5. Эффективность разработанных подходов акустической микроскопии для анализа скорости развития эмбрионов в зависимости от применяемых эмбриотропных газовых сред.
6. Выявление нарушений развития эмбрионов и их преждевременной гибели в результате пребывания в условиях космического полета методами ультразвуковой визуализации высокого разрешения.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в постановке задач диссертационной работы. Экспериментальные данные, приведенные в диссертационной работе, получены автором лично или при его непосредственном участии. Препараты скелета японского перепела, полученные по методу Доусона были изготовлены совместно с Институтом медико-биологических проблем РАН под руководством Гурьевой Т.С. и Дадашевой О.А. Исследование эмбрионов оптическими методами, а также получение гистологических препаратов проводилось автором совместно с кафедрой эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством Никерясовой Е.Н., Неклюдовой И.В., Слепцовой Л.А.

Достоверность и обоснованность результатов. Достоверность полученных в работе результатов и обоснованность выводов обеспечивается использованием общепринятых и современных методов исследования, таких как акустическая микроскопия, световая микроскопия и гистологическая техника для изготовления препаратов. При этом данные, полученные разными экспериментальными методами, согласуются между собой и с данными из литературы.

Апробация работы

Основные результаты исследований докладывались на следующих международных и всероссийских конференциях: I Троицкая конференция по медицинской физике (19-21 мая, 2004, Троицк, Московская область), IV-V Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН – ВУЗы (25-26 ноября, 2004; 4-5 ноября, 2005, Москва, Россия), 36th Annual Meeting of the European Society of Dermatology Research (September 6-7, 2006, Paris, France), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2014 секция Биология (7-11 апреля, 2014, Москва, Россия), Всероссийская с международным участием конференция и школа для молодых ученых Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты (4-9 октября, 2015, Московская область), AIS-2016 and AIS-2018 Atmosphere, Ionosphere, Safety V and VI International conference (19-25 июня, 2016; 3-9 июня, 2018, Калининград, Россия), 8th and 9th International Conference on Times of Polymers and Composites, (June 19-23, 2016; June 17-21, 2018 Ischia, Italy), II Всероссийская акустическая конференция (6 -9 июня, 2017, Нижний Новгород, Россия), XVII Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы. Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (14-15 ноября, 2018, Россия, Москва).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 статей в рецензируемых российских и иностранных журналах и тезисы 12 докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, включающих в себя обзор литературы, описания материалов и методов, собственных методических разработок и результатов экспериментальных исследований, обсуждения, заключения,

выводов, благодарностей, списка цитируемой литературы из 170 наименований и приложения. Работа содержит 136 страниц, включая приложение, в нее входят 74 рисунка и 10 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность научного исследования, определены цель, задачи и структура работы.

Глава 1 содержит обзор основных экспериментальных результатов по теме диссертации, отраженных в источниках литературы. Рассматриваются наиболее современные, распространенные и информативные методы исследования биологических объектов. Особенное внимание уделено методам неинвазивного исследования живых объектов, применяемым к объектам биологии развития. Подробно представлены акустомикроскопические исследования различных биологических объектов и технические особенности проведения подобных экспериментов. Рассмотрено влияние ультразвука на различные типы биологических объектов *in vivo*.

В **Главе 2** описано устройство и принцип работы сканирующего акустического микроскопа и стандартные экспериментальные методики. Рассмотрены традиционные формы представления ультразвуковых данных (А, В и С-скан).

Приведена таблица с объемом проведенных исследований на эмбрионах японского перепела *Coturnix coturnix japonica dom.* Подробно описаны методы гистологической обработки биологических объектов (фиксация в смеси формалин : спирт : ледяная уксусная кислота (ФСУ), окраска гистологических срезов по Маллори, окрашивание скелета по методике Доусона). Перечислены используемые установки для изучения влияния на объекты факторов космического полета и измененных газовых сред.

В **Главе 3** представлены результаты разработки специализированных методик акустической микроскопии для исследования объектов биологии развития. Проанализировано влияние разных типов иммерсионных жидкостей, подложек и фиксаторов на качество получаемых акустических изображений. Представлены результаты и сравнительный анализ ультразвуковых, гистологических и микроанатомических экспериментальных исследований

японского перепела в период с 1 по 11-е сутки нормального развития. Описаны результаты ультразвуковых исследований эмбрионов в различных патологических состояниях, вызванных влиянием факторов космического полета и газовых смесей.

Таблица 1. Скорость продольного распространения ультразвука, плотность и удельное акустическое сопротивление для некоторых веществ и биологических тканей.

Материал	Скорость звука C , м/с	Плотность ρ , 10^6 кг/м ³	Импеданс $Z=\rho C$, 10^6 кг/(м ² *с)	Источник
стекло	5470	2.50	13.675	собственные измерения
пластик	2250	3.10	6.975	собственные измерения
вода	1500	1.00	1.509	собственные измерения
желатин	1600	1.20	1.902	собственные измерения, [7]
скелетные мышцы	1540	1.10	1.694	собственные измерения
минерализованные ткани	4042	1.95	7.890	[8]
коллаген	1730	1.25	2.162	[7]
спинно-мозговая жидкость	1510	1.05	1.580	[8]
спирт	1180	0.80	0.890	[8]
формалин	1587	1.30	2.063	[9]

В п. 3.1.1 выполнен анализ вспомогательных средств при исследованиях биологических образцов. Объекты биологии развития являются относительно новыми и сложными для анализа объектами акустомикроскопического исследования и нуждаются в разработке целого комплекса специализированных научно-методических подходов. В частности, необходимо учитывать влияние иммерсионных жидкостей, подложек и фиксаторов на ультразвуковые данные. В таблице 1 представлен обзор экспериментальных измерений и литературных данных акустических параметров стандартных материалов и биологических тканей. Показано, что оптимальной иммерсионной средой для проведения экспериментов является дистиллированная вода комнатной температуры. На основе данных об акустическом импедансе различных сред и объектов было оценено влияние методики проведения эксперимента на качество получаемого изображения. Одним из возможных способов проведения ультразвукового исследования биологического образца является визуализация структур за счет приема сигнала, прошедшего через объем объекта и отраженного от

подложки [2]. Выбор материала подложки в этом случае оказывает влияние на качество получаемого изображения. Проведенный теоретический анализ показал, что при использовании пластика количество энергии, вернувшейся в линзу, составляет 40.9%, а стекла – 63%, при учете водной прослойки между образцом и подложкой. Такое различие вызвано разницей коэффициентов отражения ультразвука на границе используемых материалов. Соответственно, применение стеклянных ванночек и подложек положительно сказывается на качестве конечного изображения, уменьшая потери энергии при построении изображения от поверхности подложки, на котором видна интегральная структура объекта.

В п.п. 3.1.1.3 описана новая методика иммобилизации объектов при акустомикроскопических исследованиях, основной целью которых является сохранение анатомически правильной структуры эмбрионов. Крепление эмбрионов к подложке с использованием дополнительных элементов (зажимов, скоб, пластилина и т.д.) приводит к нарушению морфологии эмбриона и искажению внутренних структур при акустической визуализации. Для минимизации искажений предложен иммобилизирующий агент на основе желатинового геля. Небольшая разница между акустическими импедансами 6%-ого желатинового геля и воды [7] (их отношение составляет ~ 1.26) обеспечивает неизменность интенсивности ультразвукового излучения и геометрии фокусированного зондирующего пучка, прошедшего через границу иммерсия-желатин. Данная особенность позволяет рассматривать систему иммерсия-желатин как единую среду, при помещении в которую обеспечивается анатомически правильное положение объекта и его иммобилизация без отражающих границ и паразитных эхо-сигналов. Кроме того, желатин позволяет зафиксировать объект под акустической линзой достаточно мягко, не травмируя его и не оказывая негативного токсического действия. За счет заливки в желатин обеспечивается необходимая ориентация и угол наклона эмбриона и его частей относительно плоскости сканирования.

В ходе исследований детально разработана методика приготовления препаратов в 6%-ном растворе желатина, включающая в себя подбор температурных условий, выбор оптимальных концентраций желатина и минимальных временных затрат на приготовление препарата. В исследовании использовались три варианта приготовления образцов: полное погружение в

желатин (биологические объекты в патологическом состоянии), частичное погружение (нормальные ткани и органы, а также крупные объекты), на поверхности желатина (начальные стадии эмбриогенеза, тонкие и хрупкие образцы ткани). На рисунке 1 представлен пример частичной заливки в желатин целого эмбриона для последующего получения акустических изображений в сагиттальной плоскости. Показано, что желатин является наиболее приемлемым способом фиксации, т.к. надежно удерживает объект, может использоваться *in vivo*, легко удаляется с кожных покровов, не набухает в течение эксперимента, может быть приготовлен в изотоническом растворе или дистиллированной воде.

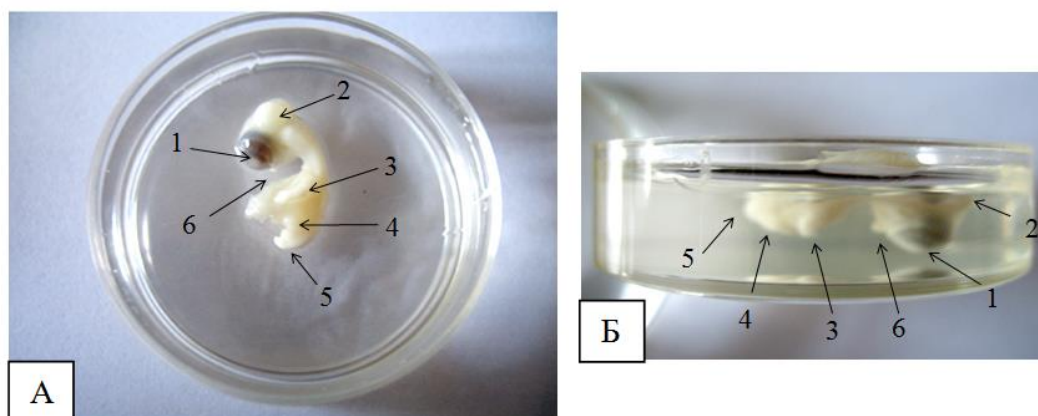


Рисунок 1. Заливка в желатин объектов с частичным погружением на примере эмбриона японского перепела на 6-е сутки развития. А – вид сверху; Б – вид сбоку: 1 – глаз; 2 – голова; 3 – зачаток крыла; 4 – зачаток ноги; 5 – хвост; 6 – клюв.

В п. 3.1.2 описаны результаты исследования влияния фиксаторов и некротических изменений на акустические свойства мягких тканей эмбриона. Исследование биологических объектов зачастую связано с необходимостью предварительного фиксирования образцов, при этом существенно меняются акустические свойства самой зафиксированной ткани. В первую очередь это скорость звука в образце. В специально сконструированной камере проведены измерения скорости звука в мягких тканях через сутки после фиксации в стандартных гистологических фиксаторах: 96% спирт, 40% формалин; 40% формалин : 96% спирт (1:1); 40% формалин : 96% спирт : ледяная уксусная кислота (ФСУ) (9:3:1). В качестве контроля использовались ткани, взятые у живого эмбриона в интактном состоянии. Полученные данные измерений скорости звука в фиксированных мягких тканях отражены на рисунке 2. Показано, что для фиксации образцов наиболее оптимальной является смесь 40%

формалин: 96% спирт (1:1), т.к. скорость звука в фиксированных тканях увеличивается не более чем на 5% относительно живых объектов.

При работе с биологическими объектами не всегда предоставляется возможность работать только с живыми образцами или с

образцами, приготовленными сразу после препарирования. Зачастую невозможно точно установить время гибели эмбриона внутри яйца. Количественные характеристики образцов ткани помогают более точно определить это время. На рисунке 3 приведены результаты эксперимента, в ходе которого яйца с живыми эмбрионами вскрывались на 7-е сутки, затем эмбрионы помещались в физиологический раствор на 2 и 4 суток при комнатной температуре, затем фиксировались в ФСУ, после чего проводилось измерение скорости звука в тканях. Установлено, что на 2-е сутки после смерти скорость звука в образце падает в среднем на 3%, на 4-е сутки - на 4%. После определения закономерностей изменения скорости звука в образцах мягких тканей были проведены исследования на целых эмбрионах перепела.

В п. 3.2 представлены результаты экспериментального исследования эмбриональных объектов *in vivo*. В п. 3.2.1.1 представлены результаты ультразвуковых исследований нормальных эмбрионов в период раннего развития

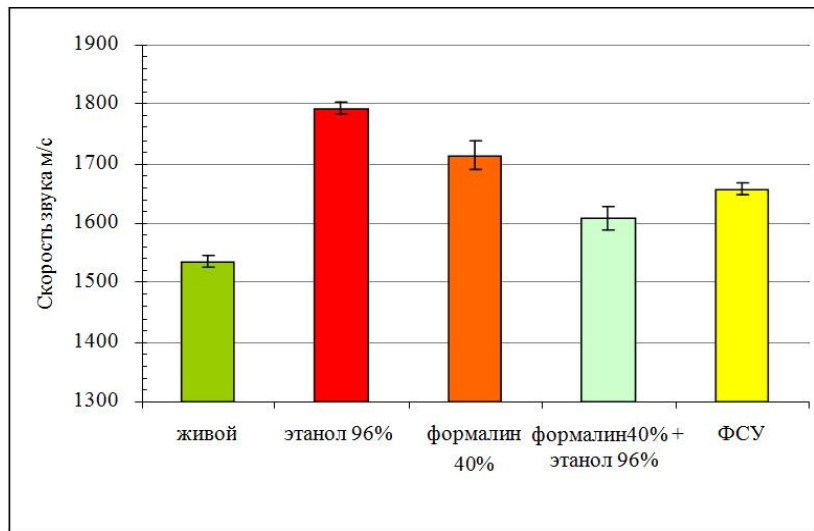


Рисунок 2. График изменения скорости звука в образце ткани, в зависимости от используемого фиксатора.

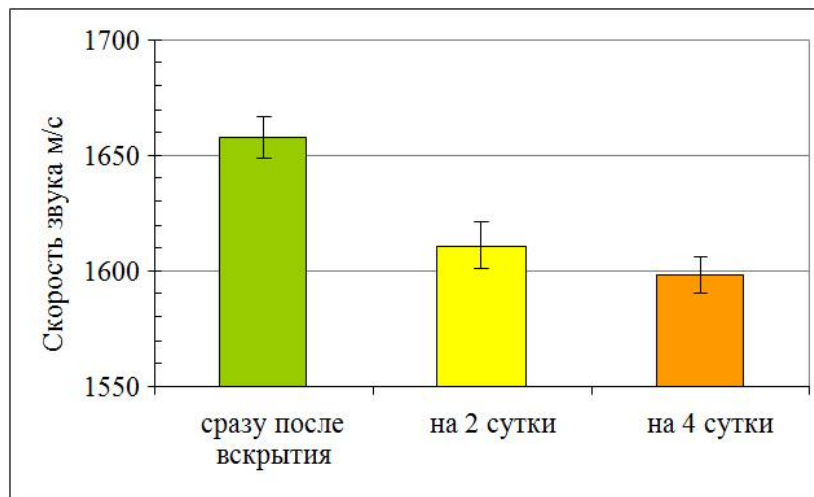


Рисунок 3. График изменения скорости звука в мягких тканях на разных стадиях некроза, с последующей фиксацией в ФСУ.

(рисунок 4). Показано, что на формирование акустических изображений оказывают влияние следующие факторы:

- малые размеры всего объекта, включая внезародышевые органы;
- разница в плотности между эмбрионом и внезародышевыми органами;
- высокая обводненность тканей;

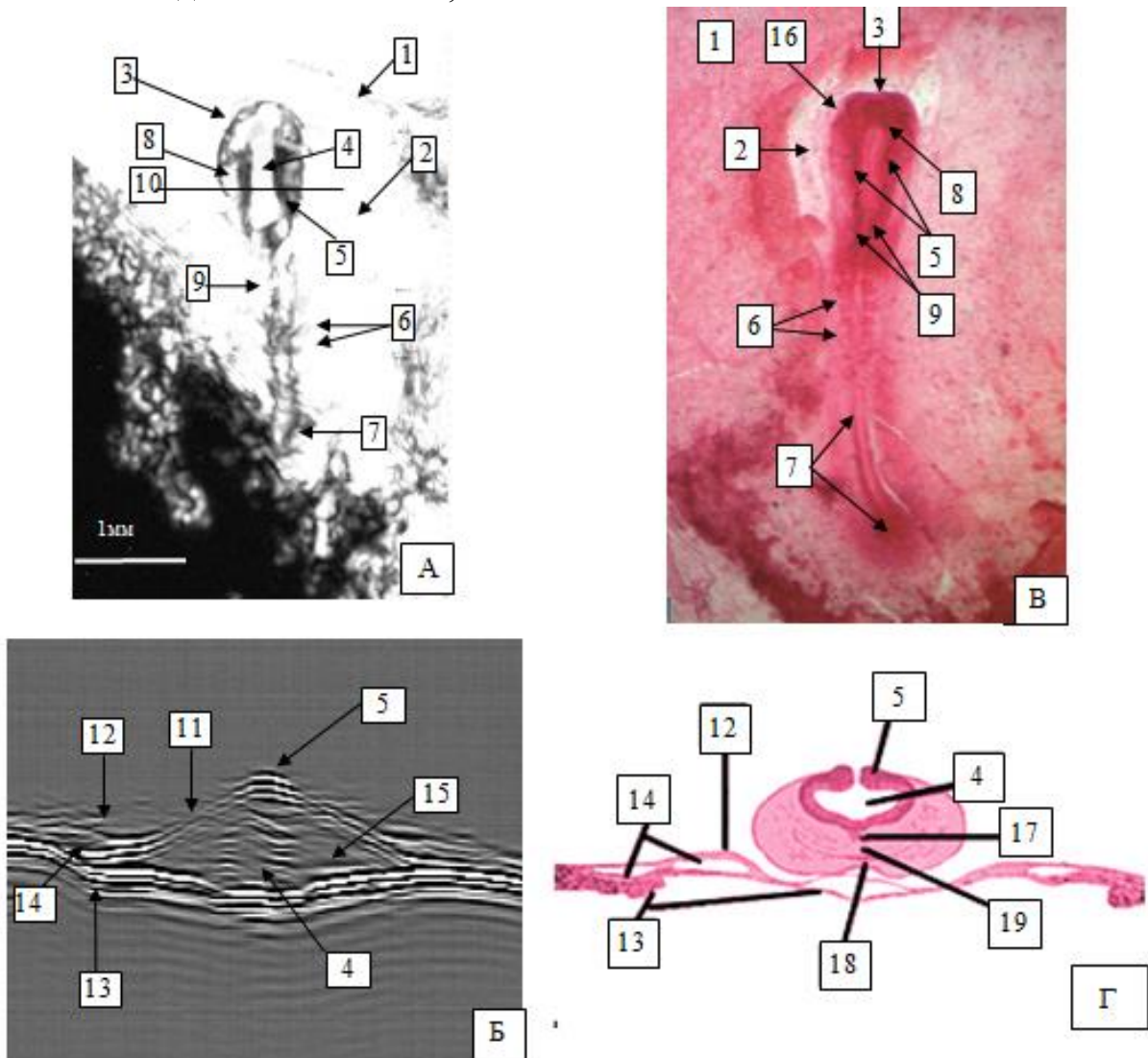


Рисунок 4. Изображения эмбриона перепела на 1-е сутки развития. А – акустическое, С-скан (акустические ворота 155 мкм, сразу от поверхности); Б – акустическое, В-скан; В, Г – оптические изображения: 1 – агеа ораса (темное поле); 2 – агеа pellucida (светлое поле); 3 – головная складка; 4 – нервный желобок; 5 – нервный валик; 6 – сомиты; 7 – первичная полоска; 8 – передние кишечные ворота; 9 – края нервной пластинки; 10 – уровень получения В-скана; 11 – нервная пластинка; 12 – эктодерма; 13 – энтодерма; 14 – мезодерма; 15 – мезенхима; 16 – передний край кишки; 17 – нотохорд; 18 – ротовая пластинка; 19 – кишка.

- наличие объемной структуры и многослойности, и, как следствие, появление внутренних границ раздела фаз;

- активная дифференцировка тканей и формирование органов, в результате чего

появляются структуры со сферической и цилиндрической поверхностью, вызывающей появление артефактов;

- наличие симметрии и метамерных участков позволяет лучше выравнить объект, позиционировать его под акустической линзой и интерпретировать результат.

Для стадий старше 3 суток за счет увеличения линейных размеров всего объекта происходит наложение сигналов от внутренних структур. Визуализация микроанатомического строения эмбрионов проводилась за счет получения серии горизонтальных сечений (С-сканов) при пошаговом смещении фокуса по глубине (ось Z) с шагом 250-400 мкм. В ходе эксперимента были исследованы отдельные органы и системы органов эмбриона. Изучено развитие головного мозга перепела с 3 по 11 сутки эмбрионального развития (п. 3.2.1.2). Особенности данного органа, влияющими на формирование акустических изображений, являются:

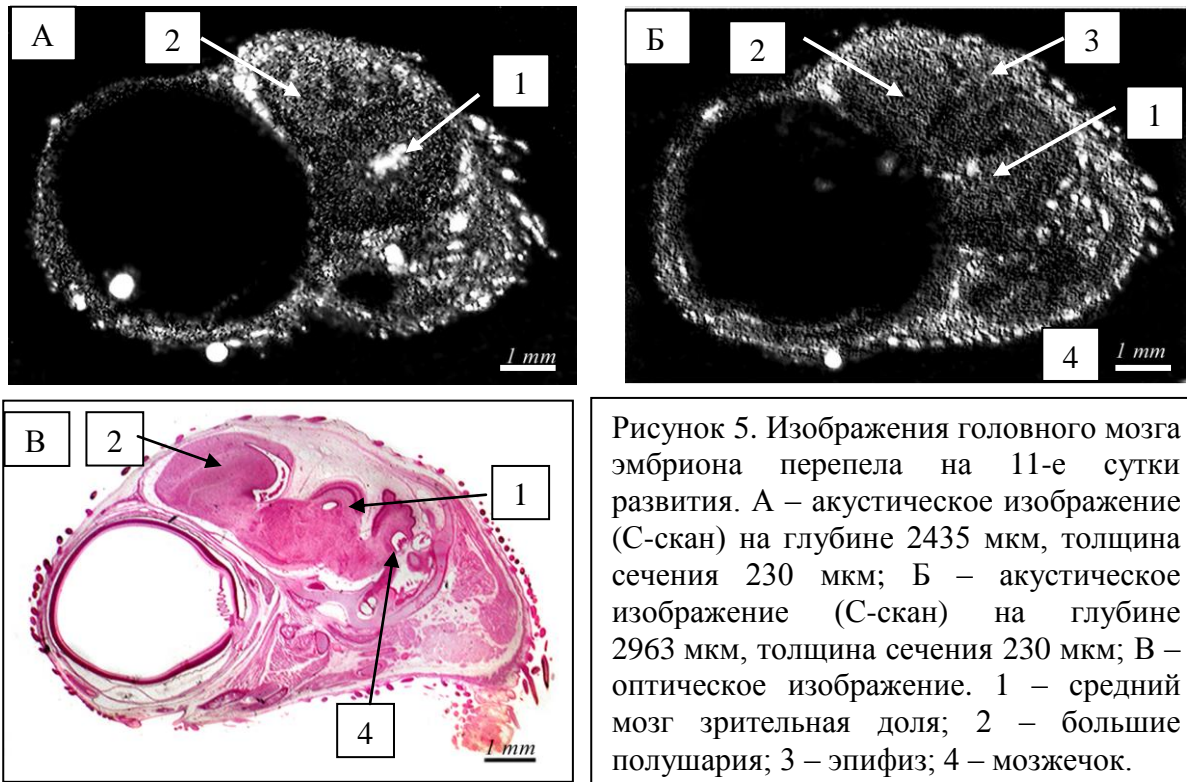
- достаточно крупный размер относительно размеров самого эмбриона;
- доступность для исследования (отсутствие очагов окостенения и перьевого покрова) до 12 суток развития;
- большая однородность ткани, что дает высокий контраст относительно полостей, заполненных жидкостью;
- отделы мозга имеют округлую или шаровидную форму и за счет отражения от их поверхности выглядят более контрастными на акустических изображениях.

Выявлено, что наиболее информативными являются изображения, соответствующие сагиттальным срезам, при этом эмбрион располагался боковой стороной вверх. На одном С-скане получить четкие изображения всех отделов и структур одновременно оказалось практически невозможно, однако вследствие высокой обводненности тканей получение серии С-сканов со сдвигом линзы по оси Z происходит с минимальными потерями качества изображений (рисунок 5А,Б). Полученные акустические изображения были сопоставлены с оптическими изображениями гистологических препаратов головного отдела, изготовленными по методике Маллори (рисунок 5В).

В отличие от ультразвуковых исследований при изготовлении гистологических срезов возникает ряд сложностей:

- необходимость дополнительной окраски, т.к. сами структуры бесцветны;

- искажение реальной картины за счет фиксации и изготовления срезов из высокообводненной ткани;
- отсутствие возможности получить срезы в разных направлениях с одного образца;
- трудоёмкость изготовления срезов целого головного мозга из-за крупных линейных размеров на поздних стадиях развития и окостенения черепной коробки.



В п. 3.2.1.3 представлены результаты ультразвукового исследования глаза в период с 5 по 11-е сутки развития (рисунок 6). Глазное яблоко обладает схожими с головным мозгом акустическими особенностями (высокая обводненность, сферическая форма, однородность, доступность для изучения), за счет этого методики проведения как акустических, так и гистологических исследований аналогичны предыдущему эксперименту и сопряжены со сходными трудностями.

По данным акустической микроскопии составлена таблица с результатами количественного анализа структурных изменений, происходящих в процессе роста глаз эмбрионов и дифференцировки тканей (таблица 2). Показано, что акустическая микроскопия позволяет правильно определить размер и расположение структурных элементов глаза *in vivo*.

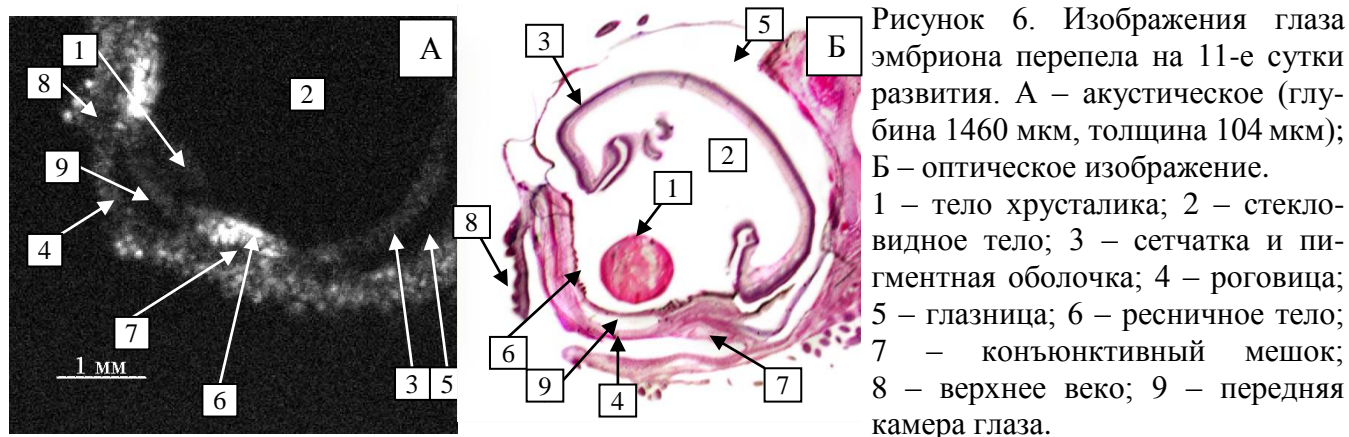


Рисунок 6. Изображения глаза эмбриона перепела на 11-е сутки развития. А – акустическое (глубина 1460 мкм, толщина 104 мкм); Б – оптическое изображение. 1 – тело хрусталика; 2 – стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глаznица; 6 – ресничное тело; 7 – конъюнктивный мешок; 8 – верхнее веко; 9 – передняя камера глаза.

Таблица 2. Данные измерений линейных размеров отдельных структурных элементов глаза перепела на разных стадиях развития.

Сутки развития	Глазное яблоко, 10^{-3} м	Хрусталик, 10^{-3} м	Стекловидное тело, 10^{-3} м	Сетчатка, 10^{-3} м
5	2.5 ± 0.1	0.30 ± 0.05	2.4 ± 0.1	0.10 ± 0.05
6	3.5 ± 0.1	0.45 ± 0.05	2.6 ± 0.1	0.20 ± 0.05
7	5.4 ± 0.2	0.80 ± 0.05	4.2 ± 0.2	0.20 ± 0.05
8	5.8 ± 0.2	1.00 ± 0.05	4.5 ± 0.2	0.15 ± 0.05
9	5.7 ± 0.2	1.30 ± 0.06	4.5 ± 0.2	0.18 ± 0.05
10	5.7 ± 0.3	1.40 ± 0.07	4.6 ± 0.2	0.20 ± 0.09
11	5.6 ± 0.2	1.40 ± 0.04	4.7 ± 0.1	0.20 ± 0.06

В п. 3.2.1.4 представлены результаты исследований опорно-двигательной системы эмбриона и непосредственно скелета конечностей. Особенностью данной системы является высокий акустический импеданс костной ткани (рисунок 7А,В), а также цилиндрическая форма костей, что провоцирует возникновение артефактов на стадии сканирования и трудности при интерпретации полученных результатов. При подготовке к исследованию особое внимание уделяется позиционированию объекта и выбору диапазона глубин при формировании акустических изображений. Анализ и подтверждение акустомикроскопических данных проводился при сопоставлении с препаратами, изготовленными по методике Доусона (рисунок 7Б,Г). На основании данных акустической микроскопии составлена таблица развития скелета конечностей (таблица 3).

Необходимо отметить, что акустическая микроскопия позволяет, в отличие от световой микроскопии, для которой изготавливались препараты по методу Доусона, провести анализ опорно-двигательной системы совместно с остальными

системами и органами (кожей и ее производными, скелетными мышцами и т.д.) на одном и том же объекте, не лишая исследователей дополнительного объема важной диагностической информации.

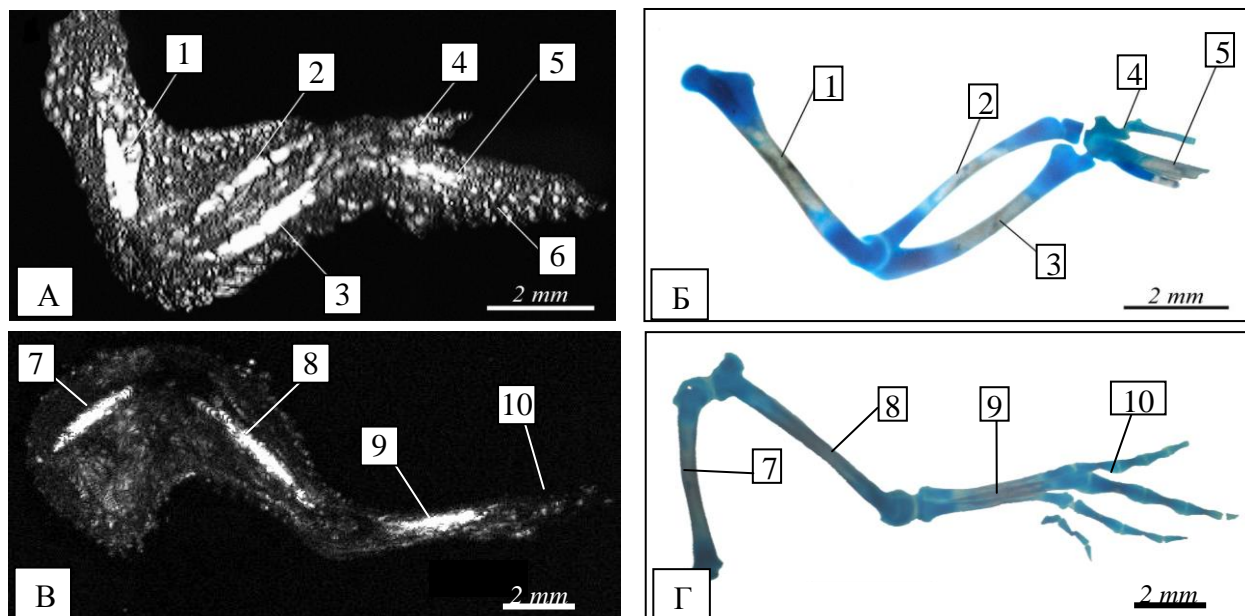


Рисунок 7. Изображения скелета конечностей эмбриона перепела на 10-е сутки развития. А – акустическое изображение (С-скан) на глубине 687 мкм, толщина сечения 785 мкм; В – акустическое изображение (С-скан) на глубине 1730 мкм, толщина сечения 735 мкм; Б, Г – оптические изображения. 1 – плечевая кость; 2 – лучевая кость; 3 – локтевая кость; 4 – третий палец; 5 – пястно-запястная кость; 6 – второй палец; 7 – бедро; 8 – голень; 9 – цевка; 10 – стопа.

Таблица 3. Нормальное развитие скелета конечностей эмбрионов японского перепела по данным акустической микроскопии для 5-11 суток развития.

Стадия, суток	Передняя конечность, 10^{-3} м			Задняя конечность, 10^{-3} м		
	плечевая кость	локтевая кость	лучевая кость	бедро	голень	цевка
5	0.40±0.05	-	-	0.50±0.09	-	-
6	0.80±0.10	-	-	1.10±0.15	-	-
7	2.30±0.35	0.45±0.08	0.75±0.15	2.90±0.40	2.75±0.20	1.10±0.15
8	3.10±0.25	0.80±0.08	1.00±0.08	3.70±0.60	3.10±0.30	2.30±0.20
9	4.10±0.40	1.15±0.15	1.80±0.20	4.60±0.50	4.00±0.25	3.00±0.55
10	5.00±0.65	2.40±0.30	2.50±0.40	5.80±0.85	4.80±0.35	3.80±0.50
11	5.60±0.75	4.10±0.35	4.20±0.35	6.60±1.20	5.20±0.65	4.00±0.30

В п. 3.2.1.5 описаны результаты исследования эмбриональных кожных покровов, степень развития которых имеет большое диагностическое значение у птиц. В рамках данного исследования впервые были получены акустомикроскопические изображения кожных покровов эмбрионов птиц и их производных. В исследовании использовались эмбрионы с 7 по 11-е сутки развития, т.е. охвачен весь период закладки ювенального пуха. Данные получены

в виде С-сканов поясничного отдела, соответствующих сагиттальным срезам, где одними из первых формируются закладки перьевого покрова (рисунок 8А).

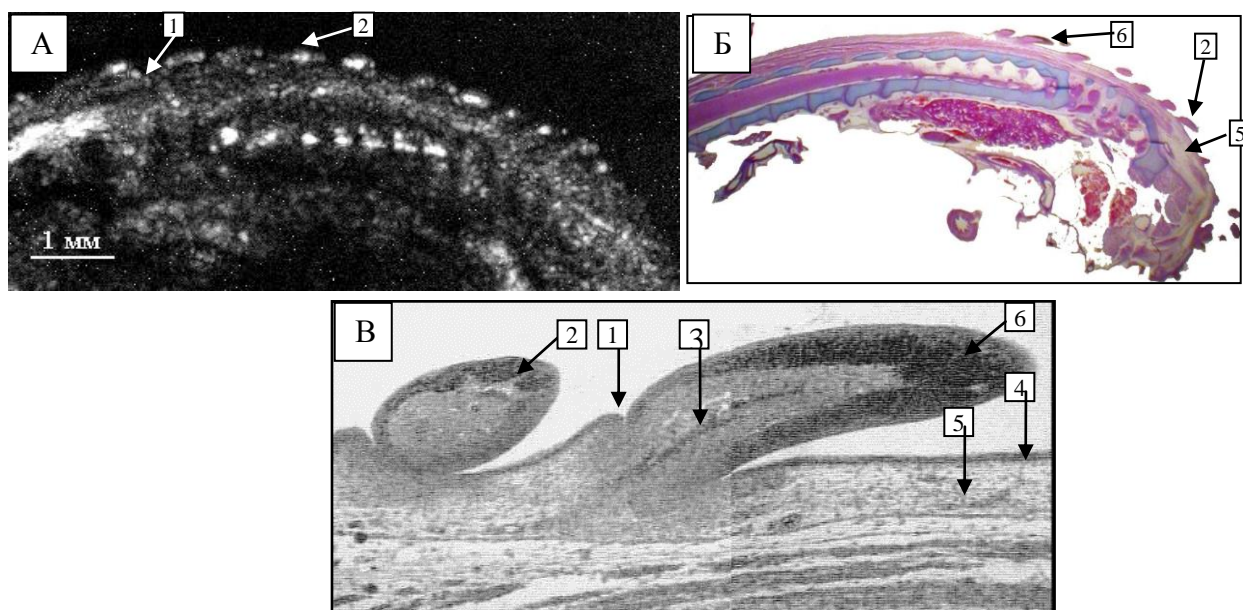


Рисунок 8. Изображения кожных покровов эмбриона перепела на 9-е сутки развития. А – акустическое изображение на глубине 2650 мкм, толщина сечения 173 мкм; Б – оптическое изображение (увеличение $\times 16$); В – оптическое изображение (увеличение $\times 400$). 1 – зачаток влагалища пера; 2 – зачаток пера; 3 – сердцевина пера; 4 – эпидермис; 5 – жировая ткань; 6 – пигментированная часть зачатка пера.

Таблица 4. Измерение параметров кожи и перьевого покрова эмбрионов перепела на разных стадиях развития.

Стадия, сутки	Кожа		Ювенальный пух	
	толщина кожи, 10^{-6} м	толщина подкожной жировой клетчатки, 10^{-6} м	диаметр основания пуха, 10^{-6} м	длина пуха, 10^{-6} м
7	15-20	180-200	150-250	90-150
8	23-31	150-160	250-300	150-200
9	12-17	115-140	220-250	350-670
10	12-17	120-200	160-200	1600-2000
11	-	-	170-200	более 5000

Для наглядного сравнительного анализа были приготовлены гистологические препараты, окрашенные по методике Маллори (рисунок 8В,Г). На основании данных акустической микроскопии составлена таблица развития кожи и перьевого покрова (таблица 4). Нужно отметить, что все кожные покровы (в частности, у птиц) с трудом поддаются гистологической обработке (резке и изготовлению препаратов) за счет небольшой толщины, обилия подкожной жировой клетчатки и наличия пуха. В то время как акустическая микроскопия не

искажает реальных данных, а также позволяет провести количественный анализ кожных покровов и перьевых закладок.

В результате комплексного анализа акустомикроскопических данных составлены таблицы нормального развития эмбрионов перепела. Полученные таблицы позволяют проводить качественный и количественный анализ отклонений в развитии эмбрионов в различных паталогических состояниях.

В п. 3.3.1 с применением акустической микроскопии выполнено исследование влияния факторов космического полета. Показано, что акустическая визуализация позволяет определить стадию развития, на которой произошла гибель эмбриона, нарушения кальциевого обмена (рисунок 9А,В), а также установить возможные причины гибели эмбриона (недоразвитие систем и органов).

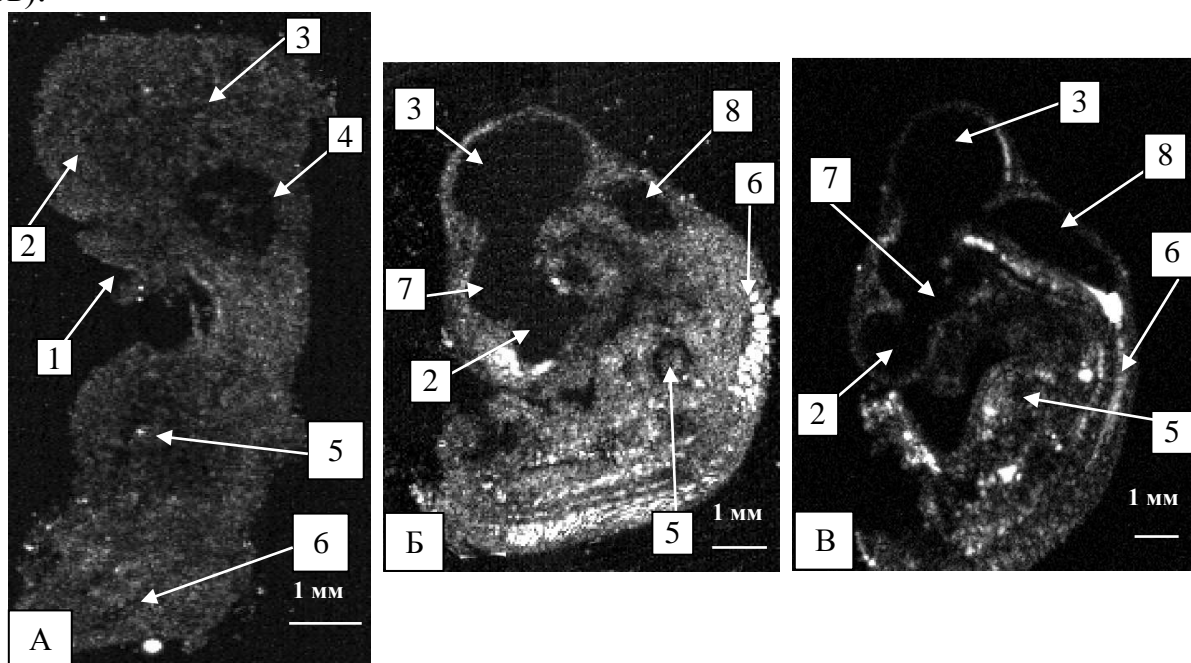


Рисунок 9. Сравнение акустических изображений эмбрионов перепела экспериментальных групп с нормой. А – эксперимент «Полет», С-скан (глубина 2000 мкм, толщина 125 мкм); Б – эксперимент «Закись азота, гипербария», С-скан (глубина 2435 мкм, толщина 230 мкм); В – норма на 5-е сутки развития, С-скан (глубина 2605 мкм, толщина 109 мкм): 1 – клюв; 2 – передний мозг; 3 – средний мозг (зрительная доля); 4 – глаз; 5 – сердце; 6 – позвоночный столб; 7 – промежуточный мозг; 8 – задний мозг.

Получены результаты исследования по контролируемому изменению состава и давления газовой среды во время развития эмбрионов (п. 3.3.2). Показано, что акустическая микроскопия позволяет установить стадию развития эмбриона в соответствии с таблицами нормального развития (рисунок 9Б, В). Акустическая визуализация выявляет наличие несовместимых с жизнью

нарушений в развитии, появление некротических изменений, аномальное развитие отдельных органов и систем при визуальном соответствии эмбриона норме.

Нужно отметить, что для единичных и уникальных экспериментальных объектов, которые должны остаться интактными для длительного хранения, акустическая микроскопия была единственным доступным методом исследования и дала полную картину состояния эмбрионов после вскрытия яиц, не повредив сам объект.

В **Главе 4** перечислены основные сложности, с которыми пришлось столкнуться в процессе исследования и изготовления препаратов на разных стадиях, объяснены возможные причины появления артефактов и рассмотрены варианты предупреждения данных ситуаций. Оценено влияние многослойности дифференцировки тканей и формирования трехмерных структур на получение и интерпретацию акустических изображений эмбрионов в процессе развития.

В **Заключении** представлены потенциальные области применения акустической микроскопии в биологии развития и смежных областях.

Выводы

1. Впервые проведены постадийные ультразвуковые исследования внутреннего строения эмбрионов японского перепела *in vivo* с 1 по 11-е сутки развития и составлены таблицы нормального развития по данным акустической микроскопии. Детально рассмотрены отдельные системы органов, имеющие диагностическое значение (мозг, глаз, кожные покровы, скелет).
2. Установлена эффективность методов акустической микроскопии для оценки влияния факторов внешней среды на течение эмбриогенеза на примере эмбриотропных газовых сред и факторов космического полета. Показана возможность определения с помощью ультразвуковых методов комплексного отставания и опережения в развитии, нарушения кальциевого обмена, недоразвития отдельных органов.
3. Проанализированы механизмы формирования акустического контраста биологических объектов в процессе эмбриогенеза, основанные на изменении геометрии (образование объемных структур, появление полостей,

многослойности) и структурного состава тканей эмбриона (дифференцировка тканей, оссификация, кератинизация и т.д.).

4. Представлена и апробирована новая методика для иммобилизации биологических объектов (с применением желатина) при проведении экспериментальных ультразвуковых исследований, не оказывающая негативного воздействия на биологические ткани и не искажающая сигналы, отраженные от элементов структуры образца.

5. Разработана и теоретически обоснована методика исследования эмбрионов на базе импульсной акустической микроскопии, включающая в себя подбор оптимальных сред и подложек. В ходе сравнительного анализа с классическими гистологическими методиками доказана эффективность метода для визуализации внутренней структуры и определения функционального состояния тканей и внутренних органов эмбриональных объектов.

6. Показано, что оптимальным химическим фиксатором, оказывающим наименьшее влияние на акустические свойства эмбриональных тканей, является смесь этанол-формалин (1:1).

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Денисова, Л.А. Применение метода акустической микроскопии для исследования тканей глаза / Л.А. Денисова, А.Ф. Денисов, А.Н. Богаченков, В.М. Левин, Ю.С. Петронюк, Е.В. Снеткова, Е.А. Храмцова // Морфология. – 2005. – № 2. – С. 72-75.

2. Денисова, Л.А. Использование методов акустической микроскопии для исследования эмбрионального развития японского перепела / Л.А. Денисова, Р.Г. Маев, Е.А. Храмцова, О.А. Дадашева, Т.С. Гурьева, А.Ф. Денисов, Е.В. Снеткова // Технологии живых систем. – 2006. – Т. 3 (1). – С. 56-63.

3. Denisova, L. A. Application of an acoustic microscope for the investigation of embryonic development in quails *Coturnix coturnix* / L. A. Denisova, R. Gr. Maev, E. A. Khramtsova, T.S. Gurieva, O.A. Dadasheva, A.F. Denisov, E.V. Snetkova // Acoustical Imaging. – 2007. – Vol. 28. – P. 49-56.

4. Maeva, A. R. Ultrasonic characterization of the biological objects of spherical or cylindrical shape using an acoustic microscope / A. R. Maeva, E. Yu. Bakulin, N.

Bajic, L.A. Denisova, F.M. Severin, R.Gr. Maev, E.A. Khramtsova / *Acoustical Imaging*. – 2007. – Vol. 28. – P. 57-64.

5. Khramtsova, E. A. Ultrasound – a new approach for non-woven scaffolds investigation / E.A. Khramtsova, E.S. Morokov, Y.S. Petronyuk, V.M. Levin, K.I. Lukanina, T.E. Grigoriev Chvalun // *AIP Conference Proceedings*. – 2016. – P. 020094.

6. Khramtsova, E. Impulse acoustic microscopy: a new approach for investigation of polymer and natural scaffolds / E. Khramtsova, E. Morokov, Y. Petronyuk, V. Levin, K. Lukanina, T. Grigoriev, A. Shepelev, S. Chvalun, E. Gubareva, E. Kuevda // *Polymer Engineering and Science*. – 2017. – Vol. 57 (7). – P. 709-715.

7. Храмцова, Е.А. Импульсная ультразвуковая микроскопия материалов и объектов тканевой инженерии / Е.А. Храмцова, Е.С. Мороков, Т.Е. Григорьев, Е.А. Губарева, А.С. Сотниченко, Е.В. Куевда, В.М. Левин, Ю.С. Петронюк // *Ученые записки физического факультета Московского университета*. – 2017. – № 5. – С. 1750710.

8. Субочев, П.В. Ультразвуковые технологии высокого разрешения для исследования биологических объектов / П.В. Субочев, А.Г. Орлова, И.В. Турчин, Ю.С. Петронюк, Е.А. Храмцова, В.М. Левин // *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. – 2018. – Т. 82 (5). – С. 572-577. Переводная: Subochev, P.V. High-Resolution Ultrasound Technologies for Studying Biological Objects / P.V. Subochev, A.G. Orlova, I.V. Turchin, Y.S. Petronyuk, E.A. Khramtsova, V.M. Levin // *Bull. Russ. Acad. Sci.: Phys.* – 2018. – Vol. 82 (5). – P. 502-506.

9. Petronyuk, Y. Studying bone substitute biodegradable polymer materials by means of acoustic microscopy / Y. Petronyuk, V. Levin, V. Gorshenev, E. Khramtsova, E. Morokov, A. Olkhov, A. Muraev // *AIP Conference Proceedings*. – 2018. – P. 020113.

10. Morokov, E.S. Structural and mechanical properties of PLA-hydroxyapatite composites studied by the scanning impulse acoustic microscopy / E.S. Morokov, E.A. Khramtsova, A.K. Zyкова, Y.S. Petronyuk, V.M. Levin, V.A. Demina, N.G. Sedush, T.E. Grigoriev, S.N. Chvalun // *AIP Conference Proceedings*. – 2018. – P. 020138.

11. Morokov, E. Noninvasive ultrasound imaging for assessment of intact microstructure of extracellular matrix in tissue engineering / E. Morokov, E. Khramtsova, E. Kuevda, E. Gubareva, T. Grigoriev, K. Lukanina, V. Levin // *Artificial Organs*. – 2019. – Vol. 43 (11). – P. 1104-1110.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Осипов, Л.В. Ультразвуковые диагностические приборы / Л.В. Осипов. – М. : Видар, 1999. – 235 с.
2. Lemons, R.A. Integrated circuits as viewed with an acoustic microscope / R.A. Lemons, C.F. Quate // *Appl. Phys. Lett.* – 1974. – Vol. 25 (5). – P. 251-253.
3. Foster, F.S. A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice / F.S. Foster, M.Y. Zhang, Y.Q. Zhou Okawai et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 2002. – Vol. 28 (9). – P. 1165-1172.
4. Kulbisky, G.P. The axolotl as an animal model for the comparison of 3-D ultrasound with plain film radiography / G.P. Kulbisky, D.W. Rickey, M.H. Reed et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1999. – Vol. 25 (6). – P. 969–975.
5. Turnbull, D.H. Ultrasound backscatter microscope analysis of early mouse embryonic brain development / D.H. Turnbull, T.S. Bloomfield, F.S. Foster et al. // *National Acad Sci.* – 1995. – Vol.92. – P. 2239-2243.
6. Schellpfeffer, M. High Frequency Ultrasound Imaging of the Growth and Development of the Normal Chick Embryo / M. Schellpfeffer, D. Bolender, G. Kolesari // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 2007. – Vol. 33 (5). – P. 751–761.
7. Сенюшкина, Т.А. Исследование физико-механических свойств и микроструктуры биологических тканей и коллагеновых систем методами акустической микроскопии : дис. ... канд. физ.-мат. наук : 03.00.02 / Т.А. Сенюшкина. – М., 1988. – 155 с.
8. Hill, C. R. Physical Principles of Medical Ultrasonics / C. R. Hill, J. C.Bamber, G. R. ter Haar. – 2nd edition. – New York : John Wiley & Sons Ltd, 2004. – 511 p.
9. Денисова, Л.А. Основы применения акустической микроскопии в медико-биологических исследованиях : учебное пособие / Л.А. Денисова, Р.Г. Маев, Ю.И. Денисов-Никольский, И.В. Матвейчук, А.А. Денисов. – М.: НИЦ БМТ, 2002. – 64 с.