

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. Н.М. Эмануэля
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

На правах рукописи

ХРАМЦОВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ АКУСТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

03.01.02 – биофизика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук,
заведующий лабораторией
Левин Вадим Моисеевич

Москва – 2019

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ.....	10
1.2 ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ УЛЬТРАЗВУКОВЫМИ МЕТОДАМИ.....	15
1.2.1 Клетки и культуры клеток.....	16
1.2.2 Ткани и органы.....	17
1.2.3 Регенерация.....	22
1.2.4 Эмбриогенез.....	23
1.2.5 Исследование тканей в ненативном состоянии (фиксаторы и некрозы).....	24
1.2.6 Условия проведения экспериментов и ограничения, накладываемые особенностями биологических объектов.....	26
1.2.6.1 Влияние неровностей поверхности.....	26
1.2.6.2 Среды сканирования.....	27
1.2.6.3 Подложки.....	28
1.2.7 Влияние ультразвука на биологические объекты.....	29
1.2.7.1 Теоретические эффекты воздействия ультразвука на биологические объекты.....	30
1.2.7.2 Экспериментальные исследования влияния ультразвука на биологические системы.....	31
1.3 ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ.....	34
1.3.1 Космическая биология.....	34
1.3.2 Газовые среды.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1 УСТРОЙСТВО И ПРИНЦИП РАБОТЫ СКАНИРУЮЩЕГО АКУСТИЧЕСКОГО МИКРОСКОПА.....	37
2.2 ЭМБРИОНЫ КАК ОБЪЕКТЫ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.3 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ АКУСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ....	44
2.4 МЕТОДЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ.....	44
2.5 УСТАНОВКИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА И ВЛИЯНИЯ ГАЗОВЫХ СМЕСЕЙ.....	45
2.6 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ.....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	49
3.1 РАЗРАБОТКА СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ МЕТОДОВ АКУСТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЪЕКТОВ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ.....	49
3.1.1 Выбор вспомогательных средств для исследования биологических объектов.....	49
3.1.1.1 Иммерсионные среды.....	49
3.1.1.2 Подложки.....	52
3.1.1.3 Закрепление положения объектов.....	54
3.1.1.4 Интерпретация полученных данных, с учетом возможных артефактов.....	59
3.1.2 Влияние состояния объектов на полученные результаты.....	62
3.1.2.1 Влияние фиксаторов.....	62
3.1.2.2 Патологическое развитие и некрозы.....	64
3.2 ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ <i>IN VIVO</i>	65
3.2.1 Нормальное развитие нефиксированных эмбрионов японского перепела (<i>Coturnix coturnix japonica</i> dom.) по данным акустической микроскопии.....	65
3.2.1.1 Особенности формирования акустических изображений эмбрионов японского перепела на ранних стадиях развития (1-4 сутки).....	65
3.2.1.2 Получение акустических изображений головного мозга эмбрионов перепела (3-11 сутки развития).....	70
3.2.1.3 Получение акустических изображений глаза эмбрионов перепела (3-11 сутки развития).....	73
3.2.1.4 Получение акустических изображений скелета конечностей эмбрионов перепела (5-11 сутки развития).....	77
3.2.1.5 Получение акустических изображений кожных покровов эмбрионов перепела (7-11 сутки развития).....	80
3.3 ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ В ПАТОЛОГИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ.....	86

3.3.1 Влияние факторов космического полета.....	87
3.3.2 Влияние газовых смесей.....	89
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ.....	105
БЛАГОДАРНОСТИ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107
ПРИЛОЖЕНИЕ А (ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ).	121
Таблицы нормального развития эмбрионов японского перепела по данным акустической микроскопии.....	
1 сутки.....	121
2 сутки.....	121
3 сутки.....	122
4 сутки.....	122
5 сутки.....	123
6 сутки.....	125
7 сутки.....	127
8 сутки.....	129
9 сутки.....	131
10 сутки.....	133
11 сутки.....	135

Введение

Работа посвящена изучению принципов формирования акустических изображений эмбрионов, их тканей и органов в процессе нормального развития и при паталогических изменениях.

Актуальность исследования

В последние десятилетия **биология развития** стала одним из передовых направлений современной науки, давшим человечеству уникальные по своей теоретической и практической значимости результаты, благодаря которым появилась возможность клонировать организмы, культивировать эмбрионы *in vitro*, развивать целый ряд медико-биологических технологий с использованием стволовых клеток, добиваться успехов в лечении некоторых наследственных заболеваний и т.п. Небывалый прогресс в большой степени обусловлен применением новейших **биофизических методов**, созданных на основе электронной микроскопии, конфокальной микроскопии, оптической когерентной томографии, Рамановской спектроскопии и других методов исследования объектов на молекулярном и клеточном уровне. Однако до сих пор одной из основных проблем остается выяснение связи между тем, как изменения, выявленные на уровне отдельной молекулы или даже отдельной клетки, реализуются на уровне целого организма. Это в значительной степени обусловлено ограниченностью количества методов, которые могли бы использоваться *in vivo* для мониторинга происходящих на уровне живого многоклеточного организма изменений, а так же их возможностями [1]. Таким образом, **создание новых биофизических методов** для исследования многоклеточных объектов *in vivo* остается важной актуальной задачей.

Отличительной чертой **объектов биологии развития** является их непрерывное изменение – увеличивается число клеток, изменяются геометрические размеры, форма, усложняется строение, происходит дифференцировка тканей и органов [2, 3]. При этом особенно важно, чтобы один и тот же метод исследования мог применяться не только на различных этапах развития, но и в режиме непрерывного наблюдения. Физические воздействия, используемые для зондирования организма, сами по себе не должны оказывать существенного повреждающего влияния на исследуемый с их помощью объект, искажать его структуру и нарушать течение внутренних процессов. Еще одним важным аспектом является необходимость более высокого пространственного разрешения, чем при исследовании взрослых животных, поскольку эмбрионы большинства видов имеют малые геометрические размеры.

В этой связи одними из перспективных для изучения эмбриональных объектов могут стать методы, базирующиеся на основе **акустической микроскопии**, в которой для

неинвазивного исследования используется фокусированный ультразвуковой пучок высокой частоты, но низкой интенсивности [4-9]. Разрешение акустомикроскопических методов сравнимо с длиной используемой волны и может составлять от нескольких сотен микрон до долей микрона. Глубина проникновения ультразвукового сигнала достигает нескольких миллиметров. Ультразвук легко проникает в толщу плотных непрозрачных объектов и, в отличие от рентгеновских лучей, практически безвреден как для объекта, так и для исследователя. Зондируя объект ультразвуковым пучком в сканирующем акустическом микроскопе, можно не только получать визуальные изображения внутренней структуры многоклеточных объектов, но и проводить количественную оценку упруго-механических свойств его тканей [10-14]. Получение изображений или проведение измерений может осуществляться за несколько секунд, что позволяет вести наблюдения за объектом практически в режиме реального времени. Опубликованы единичные работы, в которых представлены результаты первых опытов по применению фокусированного ультразвука для получения визуальных изображений строения эмбрионов мыши [15-21], куриного эмбриона [22]. Однако этих данных недостаточно для обоснованной интерпретации получаемых изображений и обеспечения надежной воспроизводимости результатов исследований.

При помощи акустического микроскопа получают изображения и данные о количественных измерениях, отражающие результат взаимодействия ультразвука с объектом, вследствие чего их характер определяется не только техническими характеристиками микроскопа, параметрами ультразвукового сигнала, но и физико-механическими свойствами и геометрической формой самого объекта. В этой связи невозможно использовать методы акустической микроскопии, разработанные, например, для полимерных материалов, металлов или керамик, для исследований биологических объектов. В каждом случае необходима разработка специализированных методов с учетом специфики конкретного объекта [23].

К числу объектов биологии развития традиционно относятся несколько десятков видов животных и растений, в том числе куриные эмбрионы, шпорцевые и травяные лягушки, лабораторные мыши и крысы [24]. В последнее время все большее внимание исследователей привлекает перспектива использования в экспериментах эмбрионов перепела [25, 26]. Это обусловлено, с одной стороны, простотой содержания и разведения перепелов в лабораторных условиях, и с другой стороны, схожестью развития эмбриона перепела с детально изученным развитием куриного эмбриона. При этом эмбриогенез перепелов в среднем на 3 дня короче, чем у кур, а размеры эмбрионов близки к таковым у лабораторных крыс и мышей, что обеспечивает высокую эффективность токсикологических, фармакологических исследований, мониторинга влияния факторов производства и окружающей среды [27, 28]. В частности, эмбрионы японского перепела были объектами успешных исследования на международной космической

станции «МИР». Вместе с тем сходство принципиального плана развития, физико-химического состава тканей, формы и размеров эмбрионов японского перепела и других позвоночных животных на соответствующих стадиях развития позволяет экстраполировать результаты, полученные в экспериментах с перепелом, на другие объекты биологии развития.

Вышесказанное определило выбор в качестве объектов для разработки нового метода исследований эмбрионов перепела *Coturnix coturnix japonica dom.*

При создании нового экспериментального метода важно выяснить, как этот метод будет применяться в различных биологических исследованиях. В этой связи целесообразно провести апробацию разработанного нами метода в двух экспериментах: 1) экспериментальном исследовании фундаментального характера - по выяснению влияния невесомости и других факторов космического полета на эмбриональное развитие перепела, и 2) прикладном токсикологическом эксперименте по оценке эмбриотропных эффектов газового состава искусственных воздушных сред.

Непременным условием для проведения исследований с выявлением эмбриотропных эффектов среды является знание о нормальном течении эмбриогенеза у данного вида. Несмотря на то, что уже в целом ряде исследований эмбрионы перепела использовались в качестве экспериментальных объектов [25, 26], данные об эмбриогенезе перепела весьма фрагментарны и иногда противоречивы [27, 29-32]. В этой связи, учитывая перспективность данного объекта, необходимо было не только апробировать разработанный комплекс методов на отдельных стадиях эмбриогенеза перепела, но и выявить некоторые закономерности постадийных изменений, характеризующих нормальное развитие этого вида (создать так называемые таблицы нормального развития) по данным акустической микроскопии.

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 эмбрионов.
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. Результаты диссертации представлены на следующих международных и всероссийских конференциях: I Троицкая конференция по медицинской физике (19-21 мая, 2004, Троицк, Московская область), IV Ежегодной молодежной

конференции с международным участием ИБХФ РАН – ВУЗы (25-26 ноября, 2004, Москва, Россия), V Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН – ВУЗы (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 нанокompозиты (4-9 октября, 2015, Московская область), AIS-2016 Atmosphere, Ionosphere, Safety V International conference (19-25 июня, 2016, Калининград, Россия), 8th International Conference on Times of Polymers and Composites, (June 19-23, 2016, Ischia, Italy), II Всероссийская акустическая конференция (6-9 июня, 2017, Нижний Новгород, Россия), AIS-2018 Atmosphere, Ionosphere, Safety VI International conference (3-9 июня, 2018, Калининград, Россия), 9th International Conference on Times of Polymers and Composites, (June 17-21, 2018, Ischia, Italy), 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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Методы исследования биологических объектов

Методы исследования биологических объектов на тканевом и клеточном уровне на данный момент весьма разнообразны [1, 2, 33]. Наиболее популярным и доступным методом является световая микроскопия, с разрешением до 200-350 нм, что позволяет увидеть не только сами клетки, но и органеллы и клеточные включения. Т. к. разрешение данного метода определяется длиной световой волны, при использовании ультрафиолетового света можно повысить это разрешение до 100-140 нм. Для наблюдения за живыми клетками также используются методы фазово-контрастной микроскопии и метод «темного поля», позволяющие дополнительно увеличить разрешение и получить изображения бесцветных биологических объектов или структур. Для изучения толщины и плотности отдельных участков клетки применяется метод интерференционной микроскопии. С помощью поляризационного микроскопа наблюдают объекты, обладающие анизотропией, такие, например, как миофибриллы и т.д.

Еще одним перспективным методом является флуоресцентная микроскопия, основанная на свечении объектов при освещении их УФ и использовании светофильтров. Свечение обеспечивают либо сами объекты, либо специально введенные красители. Данным методом исследуются клетки, клеточные структуры, бактерии. Так же активно используется как количественный метод для определения кинетики реакций, коэффициентов диффузии и т.д. Достижимое разрешение – 30 нм. К недостаткам метода можно отнести ограниченность области применения, необходимость в дополнительном оборудовании и реактивах (специальный источник света, излучающий в коротковолновом спектре, специальные светофильтры, растворы флуорохромов и т.д.).

Таким образом, световая микроскопия дает возможность изучать клетки и ткани с высоким разрешением, в некоторых случаях даже витально (в клеточных культурах). Однако наибольшее количество информации о строении клеток и структуре тканей было получено на фиксированном материале, с приготовлением тотальных препаратов.

Ценные сведения об организации клеток были получены благодаря электронной микроскопии. Разрешающая способность электронной микроскопии лимитируется длиной волны электромагнитного излучения. Максимальное достигнутое разрешение - составляет несколько ангстрем, большее разрешение получить оказалось невозможно, т.к. биологические объекты обладают слабым контрастом по отношению к используемым подложкам.

Одним из направлений электронной микроскопии является сканирующая электронная микроскопия (SEM) или растровая электронная микроскопия (РЭМ). Для увеличения контрастности биологических объектов при использовании SEM на образец напыляют металлы, например, золото. У этого метода есть свои недостатки, такие как увеличение размеров образца и отдельных структур из-за напыления (0.4 нм) и возможность изучить только поверхностный рельеф образца. Для анализа структуры мембранных компонентов часто используется сходный метод – замораживание-скалывание и получение реплик с микрорельефа, особенность этого метода состоит в том, что не производится химическая проводка, материал быстро замораживается жидким азотом, что позволяет приблизиться к изучению тканей в нативном состоянии [33, 34]. Другое направление – просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), может применяться для исследования только ультратонких образцов (около 0,1 мкм). Однако потребность в методе, позволяющем исследовать объекты на микроанатомическом и тканевом уровне *in vivo*, заставляет искать пути реализации сразу в нескольких направлениях, в частности, определенный интерес представляет конфокальная микроскопия.

Конфокальная микроскопия применяется в основном в клеточной биологии для исследования живых и фиксированных объектов. Объемное изображение формируется при помощи регистрации флуоресценции в фокусе лазерного пучка. При отсутствии автофлуоресценции требуется дополнительная окраска препаратов. Метод является неинвазивным только для плоских объектов малой толщины. Разрешение около 0.2 мкм в зависимости от используемой лазерной установки и глубина до 3-4 мм для приповерхностных структур (при водной иммерсии). Для полноценного использования метода требуется дополнительно набор дихроичных зеркал и светофильтров, для исследования живых объектов - специальные инкубаторы, монтируемые в сам микроскоп.

Еще один метод - лазерная сканирующая конфокальная оптическая микроскопия (LSCOM) позволяет сфокусироваться как на поверхности, так и на некоторой точке в глубине образца, отображая данные, соответствующие срезу через образец. Объединив серию таких срезов, можно полностью реконструировать структуру всего образца. Сложностью данного метода является требовательность к толщине образцов (5-10 мкм) и их длительная подготовка [34]. Развитие данного метода получило в двухфотонной (мультифотонной) конфокальной микроскопии, обладающей большей проникающей способностью и меньшими повреждающими свойствами.

Другим методом для исследования внутренней структуры непрозрачных объектов размером 0.5–5 см является микрорентгеноскопия. Однако для объектов биологии развития, ввиду повреждающего действия рентгеновских лучей и высокой радиочувствительности эмбрионов, применение данного метода ограничено. Сложность интерпретации получаемых

изображений обусловлена с одной стороны, слабой контрастностью мягких эмбриональных тканей, с другой стороны тем, что визуализация происходит в режиме «на прохождение» и при этом изображения поверхностных и лежащих в глубине слоев накладываются друг на друга.

Частично эти проблемы преодолены при разработке новых методов и аппаратуры для микротомографии [35]. Сущность метода состоит в размещении закрепленного неподвижно объекта в специальной камере и регистрации в различных ракурсах ослабления рентгеновского излучения низкой интенсивности структурами образца. Далее методами компьютерной обработки фиксируется распределение в объеме объекта структур, отличающихся по плотности, и на основе полученных цифровых данных реконструируются визуальные изображения в любой заданной плоскости. Данный метод широко применяется для исследования и диагностики патологических состояний скелета, однако, менее эффективен для визуализации более мягких тканей, в частности хрящевых, тем более для эмбриональных тканей.

Для визуализации мягких тканей и диагностики их состояния больше подходит ядерно-магнитный резонанс (ЯМР). Это диагностический метод, основанный на использовании магнитного резонанса протонов ядер водорода, входящих в состав воды тканей организма, используется в радиобиологии для визуализации внутренних структур, и обеспечивает большую контрастность тканей, по сравнению с компьютерной томографией (СТ), а так же позволяет определить вид исследуемой ткани по уровню концентрации ядер водорода, за счет мощности передачи сигнала, но применяется в основном для мягких тканей. Для визуализации некоторых структур (сосудов, воспалений, опухолей) необходимо введение дополнительных контрастных агентов. Достижимое разрешение – 3 мкм. Данный метод нельзя считать полностью безопасным как для исследователя, так и для исследуемого объекта из-за использования сильного магнитного поля и радиоимпульсов. Так же необходимо отметить высокую стоимость самого прибора и камеры для исследования.

Для мягких тканей возможно применение ОКТ (оптической когерентной томографии). Принцип получения изображения с помощью ОКТ аналогичен принципу получения изображений с помощью ультразвука, с той разницей, что в ОКТ для зондирования биологических объектов используется оптическое излучение ближнего инфракрасного (ИК) диапазона длин волн, а не акустические волны. Зондирующий пучок фокусируется на объекте и по задержке зондирующего излучения определяется расположение внутренних структур внутри объекта. Таким образом, полученное изображение дает представление о строении приповерхностной области биологического образца. Разрешающая способность ОКТ составляет 10-15 мкм. Метод ОКТ неинвазивен и может применяться *in vivo*, поскольку

использует излучение в ближнем ИК диапазоне с мощностью порядка 5 мВт, которое не оказывает повреждающего действия на организм.

Отдельно нужно упомянуть ОКМ (оптическую когерентную микроскопию), сочетающую в себе принципы ОКТ и когерентной микроскопии. В настоящее время данный метод применяется в дерматологии, позволяя получить изображение аналогичное поперечному гистологическому срезу *in vivo*. Однако даже в дерматологии рекомендуется применять данный метод в сочетании с ОКТ, т.к. некоторые заболевания не могут быть диагностированы однозначно с помощью ОКМ. Глубина сканирования излучения – 0.7 мм; пространственное разрешение менее 5 мкм. К сожалению, этот метод может применяться только для исследования приповерхностных структур, что не до конца отвечает требованиям биологии развития.

Основной проблемой перечисленных выше методов является непосредственное влияние их на исследуемый объект, в результате чего становится невозможным получение адекватной информации об объекте исследования, соответствующей их реальному состоянию.

Таким образом, несмотря на обилие методов, применяемых в биологии развития, существует потребность в разработке новых эффективных методов и подходов для *in vivo* визуализации и оценки процессов роста и развития живых объектов в норме и при патологии.

Перспективным в данной области является комплекс методов, основанных на использовании ультразвука.

Медицинским приборам на основе ультразвука посвящено множество обзоров и статей, в данный момент эта область медицины активно развивается. В течение последних десятилетий акустическая микроскопия стала общепризнанным инструментом как для промышленной неразрушающей оценки, так и для визуализации и количественного анализа в биомедицинских областях [36]. Использование ультразвука в медицине имеет три основных направления: диагностическое, терапевтическое и хирургическое.

Диагностическое применение ультразвука основывается на получении изображений внутренних органов, определении их состояния и обнаружении патологий. Главной задачей, которая стоит перед диагностическим ультразвуком, является возможность достоверно отличить патологические участки тканей от нормальных [37]. Ниже представлены основные сферы использования данного метода:

- кардиология и эхокардиография - неинвазивный метод диагностики, основанный на применении ультразвука с целью получения изображений сердца для оценки его анатомии и функционального состояния. Диапазон используемых частот от 2 МГц до 7.5 МГц;

- гастроэнтерология – определение наличия злокачественных или доброкачественных новообразований, инфекционных заболеваний, обнаружение непроходимостей и наличия камней, применение эндоскопических зондов при обследовании и хирургическом вмешательстве;
- акушерство и гинекология – наиболее распространенные области применения диагностического ультразвука. Используется для определения положения плаценты, оценки развития плода (по изменению нескольких параметров: диаметр головки плода, площади грудной клетки и живота и т.д.), ультразвукового исследования движений плода в реальном времени, раннее обнаружение патологий и аномалий плода (остановка развития, анэнцефалия), амниоцентеза (взятие околоплодных вод для цитологического исследования под контролем ультразвука) [38];
- офтальмология – используется для определения точных размеров глаза, исследования патологий и аномалий структур глаза в случае их непрозрачности или недоступности для оптического исследования, анализ состояния орбиты (проводится в сочетании с компьютерной томографией);
- диагностика опорно-двигательного аппарата (определение развития остеопороза на приповерхностных участках кости);
- флебология - в сочетании с доплерографией используется для одновременной визуализации просвета сосуда и регистрации кровотока;
- маммология – диагностика кистозных образований, выявление ранних стадий рака, анализ материала, полученного в результате мастэктомии, определение реакции новообразований в процессе лечения [39];
- доплерография – определение внутриутробного сердцебиения плода, визуализация кровотока в сосудах, диагностика заболевания сосудов [40].

Ультразвук в медицине также активно применяется в терапевтических целях. Вследствие того, что спектр задач, решаемых этим методом, очень велик, параметры используемого ультразвука также сильно отличаются. Рассмотрим основные примеры использования терапевтического ультразвука:

- использование фокусированного ультразвука для разрушения опухолей (1000 Вт/см^2), фонофоретический ввод противоопухолевых препаратов в пораженную приповерхностную область;

- литотрипсия - разрушение камней в выделительной системе. Для этой цели используется низкочастотный ультразвук (100 кГц – 1 МГц);
- лечение катаракты глаза и тяжелых проникающих ранений роговицы и склеры (0.88 МГц, 0.3 Вт/см²);
- ультразвуковая чистка поверхности зубов, лечение периодонтита, язвенного воспаления десен (гингивита), прижигание зубодесневого кармана;
- создание локального нагрева тканей в физиотерапевтических целях;
- лечение опорно-двигательного аппарата: стимуляция обменных процессов, снижение экссудации, разрыхление фиброзных образований, фонофорез;
- направленная доставка лекарств, в том числе с преодолением гематоэнцефалического барьера [40].

Перспективным направлением и эффективным инструментом в биологии и медицине является относительно новый метод – акустическая микроскопия. Далее будут рассмотрены основные сложности, с которыми столкнулись исследователи, при работе с биологическими объектами, и представлены современные достижения акустической микроскопии в биологии.

1.2 Исследование биологических объектов ультразвуковыми методами

Теоретические основы визуализации ультразвуковых изображений высокого разрешения были заложены нашим соотечественником С.Я. Соколовым еще в 1934 году [41, 42], в современном варианте первый сканирующий акустический микроскоп (АМ) был создан лишь в 1974 году Лемонсом и Квэйтом [4]. Основным принципом работы акустического микроскопа является использование фокусированного ультразвукового пучка, с помощью которого растровым образом зондируется образец. Прием сигнала после взаимодействия его с объектом осуществляется либо той же фокусирующей линзой, либо конфокальной ей линзой. Этот тип микроскопов позволяет достичь пространственного разрешения от нескольких сотен нанометров до нескольких десятков микрон.

В настоящее время акустические микроскопы нашли широкое и эффективное применение в космической, электронной промышленности [43, 44], в автомобильном материаловедении [11, 45, 46] и на производстве [47]. Примеры использования акустической микроскопии в биологии и медицине пока не столь многочисленны и будут представлены далее. Однако высокие скорости накопления знаний в этой области, наряду с разработкой новых типов приборов и датчиков (например, расположение акустической линзы на конце эндоскопа и использование сферической акустической линзы с поляризованным сдвиговым

преобразователем), позволят в дальнейшем все шире применять данный щадящий метод для самостоятельной диагностики, наблюдения в динамике и оценки эффективности терапии во все больших областях медицины [34, 37].

1.2.1 Клетки и культуры клеток

Одна из интереснейших и плодотворно развивающихся в настоящее время областей применения акустической микроскопии – исследование микроструктуры и механических свойств отдельных клеток и культур клеток. Начало работ в этом направлении было положено К. Квэйтом [4, 48], который продемонстрировал возможность акустической визуализации микроструктуры отдельных клеток на примере акустических изображений эритроцитов и фибробластов, фиксированных метанолом.

Благодаря безвредности параметров ультразвука, используемого для визуализации, и возможности исследовать объекты в жидкой среде, применение акустической микроскопии позволило получить ряд данных о микробиомеханике живых клеток, которые невозможно установить другими методами.

Так, например, концентрические кольца на рисунке 1.1 являются результатом интерференции акустического сигнала и обусловлены различиями толщины слоя цитоплазмы. По количеству и толщине интерференционных колец можно определить неровность поверхности клетки и вычислить ее объем.

Кроме того, было установлено, что ни высокочастотное излучение, ни механическое сканирование не вызывают повреждений или существенных изменений в поведении клеток: они сохраняют способность нормально двигаться и остаются хорошо распластанными на субстрате [49, 50, 51].

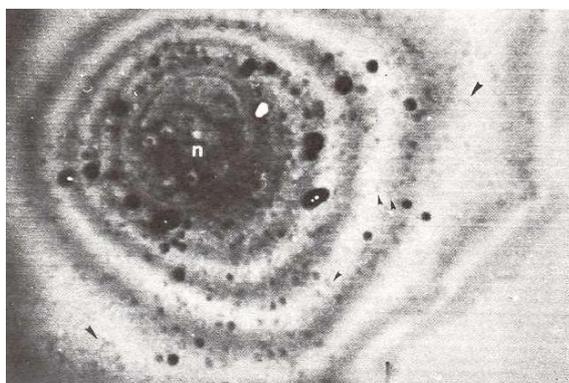


Рисунок 1.1. Изолированная клетка сердечного эпителия головастика шпорцевой лягушки. n – ядро клетки. Размер изображения по ширине 100 мкм. Частота 1.2 ГГц [14].

При помощи сканирующего акустического микроскопа на частоте 1.3 ГГц были получены изображения клетки в процессе ее движения по субстрату [51, 52], в процессе

деления [53]. На основе этих последовательно полученных изображений были созданы фильмы о динамике изменений цитоскелета и адгезии при движении клетки по субстрату и об изменениях клетки в процессе митотического деления.

Таким образом, данный пласт исследований положил начало изучению с помощью акустической микроскопии небольших объектов с размерами до нескольких миллиметров.

1.2.2 Ткани и органы

Биологические ткани и органы являются многослойными сложными структурами, акустические изображения которых формируются на основе множества факторов. На образование и формирование изображений одновременно влияет как клеточный состав (высокая специализация клеток накладывает свой отпечаток на механические свойства клеток, например, мышечные клетки с сократительным комплексом, пигментные клетки с большим содержанием меланина), так и содержание воды, свойства соединительной ткани, давление в кровеносных сосудах, наличие интерстициальной жидкости, особенности межклеточного вещества, агрегация и взаимодействие клеток, межклеточные контакты и т.д. [54].

До середины 80-х годов прошлого века применялись акустические микроскопы, в которых биологические ткани можно было исследовать только после изготовления препаратов, аналогичных гистологическим препаратам для оптической микроскопии: срезы толщиной несколько микрон изготавливались после фиксации тканей, гистологической проводки и заливки в парафин или полимерные смолы [33]. Такой метод подготовки позволял приблизить нелинейные обводненные биологические образцы к правильным плоскопараллельным препаратам. Большой объем исследований выполнен на плоскопараллельных препаратах мягких и твердых тканей, не подвергавшихся дегидратации, декальцинации, окрашиванию или контрастированию (срезы, изготовленные на замораживающем микротоме, спилы зубов и костей) [4, 55-60].

Результаты, полученные на плоскопараллельных препаратах, имеют огромное методическое значение, т.к. эти образцы сопоставимы по размерам с объектами, исследуемыми в биологии развития, что в дальнейшем помогло перейти к изучению тканей и органов эмбрионов. В ходе этих исследований были получены первые качественные изображения отдельных тканей, как в норме, так и при патологии, а также были изучены механизмы формирования акустических изображений. Акустические изображения передают не только форму, размеры, распределение структурных элементов, но и пространственные вариации локальных упруго-механических свойств. Ниже приведен анализ клеточных и субклеточных структур и молекул, формирующих и оказывающих влияние на формирование акустических

изображений, а так же определены некоторые особенности и механические свойства отдельных тканей и органов.

Установлено [7, 61-63], что важную роль при взаимодействии ультразвука с тканями играют фибриллярные белки. Известно, что злокачественные образования, как правило, связаны с разрастанием коллагена [64]. Поэтому такого рода нарушения в тканях, как правило, хорошо выявляются в акустической микроскопии [4, 12, 13, 48, 65, 66].

Наибольшее количество исследований проведено на тканях и органах человека, доступных для неинвазивного исследования, такие как: кожа, ногти, зубы, глаза, опорно-двигательная система, т.к. максимальная глубина проникновения высокочастотного фокусированного ультразвука составляет не более 1 см и существенный интерес представляло использование акустического микроскопа для прижизненной оценки состояния именно этих тканей. Наибольшее количество информации о влиянии биохимического состава биологических объектов на формирование акустических изображений было получено на отдельных типах тканей или органах, доступных для неинвазивных исследований. На основе данных из литературы рассмотрим некоторые ультразвуковые характеристики биологических тканей и органов.

Первые специализированные сканирующие акустические микроскопы для исследования кожи человека появились около 20 лет назад [67, 68].

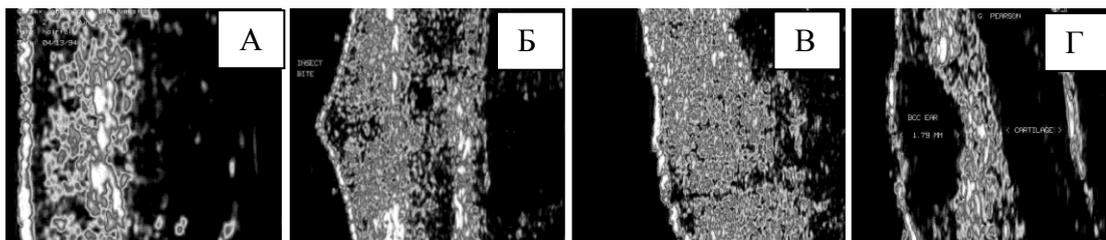


Рисунок 1.2. Изображения кожи человека, полученные в акустическом микроскопе (25 МГц). А – норма, Б – укус насекомого, В – аллергический тест, Г – базальная карцинома. Размер каждого изображения по высоте 5 мм [75].

Микроструктура кожи и ногтей человека исследована как в норме [69-74], так и при самых различных патологических состояниях [75-77]. Показана возможность контроля отеков [78], течения некоторых заболеваний (псориаз, склеродерма) и контроля их лечения с применением мазей и кремов [79, 80]. Установлено, что используя акустический микроскоп, можно точно выявить локализацию и границы опухолевых образований кожи человека [81-83]. Особенно значение имеет возможность получать трехмерные объемные изображения опухолей [84]. На мелких лабораторных животных была показана возможность контроля роста меланомы [17]. В косметологии акустический микроскоп был использован для определения

чувствительности кожи к различным составам кремов, шампуней и т.д. [85, 86]. В аллергологии акустический микроскоп применяется для точной количественной оценки реакции организма на аллергенные пробы (рисунок 1.2) [87-89]. В хирургии при помощи акустической микроскопии можно оценить приживление кожных трансплантатов, заживление ран, ожогов, формирование рубцов.

При изучении кожи человека методом акустической микроскопии чаще всего рассматривались участки с ладоней и ступней. Там кожа достаточно тонкая и на ладонях она наиболее доступна для сканирования.

Для того чтобы скоррелировать акустическое изображение с анатомическими структурами, необходимо, чтобы первая же сильноотражающая область была поверхностью кожи (то есть эпидермисом). Для этой цели на поверхность кожи наносили небольшое количество медной пыли. Тогда на акустическом изображении становятся видны углубления и выступы рельефа кожи.

С помощью анализа осциллограмм (А-сканов) были выделены три структуры: дермис, жировая ткань и слой мускулатуры. Было установлено, что толщина эпидермиса на разных участках тела колеблется от 1 до 3 мм. В большинстве же случаев, кожу измеряют как объединение эпидермиса и дермы. На частоте 50 МГц удалось разграничить эпидермис и кориум, некоторые структуры, лежащие над эпидермисом (волосы, чешуйки). Дерма выглядит на ультразвуковых изображениях как однородная сильно-рассеивающая структура. Ее легко отделить от низко-отражающей подкожной жировой клетчатки. Подкожная жировая клетчатка является низко-отражающей, в ней могут быть видны отдельные сильно-отражающие структуры, расположенные диагонально или параллельно поверхности кожи. Эти структуры соответствуют септам с нервными волокнами и кровеносными сосудами [90, 91].

Области применения акустической микроскопии для наблюдения прижизненных изменений в динамике:

а) возрастные изменения кожи.

Возрастные изменения можно проследить с помощью оценки распределения отражения в соединительно-тканном слое кожи. В 1989 году де Ригал наблюдал за изменениями плохо отражающего субэпидермального слоя как за общим для всех признаком постепенного старения кожи [92]. При изучении наблюдалось уменьшение дермальной амплитуды отражения и повышение внутреннего отражающего пространства под эпителием в некоторых частях тела. Измерение толщины и яркости этого слоя показали, что происходит значительное снижение отражения с увеличением возраста, особенно с дорсальной стороны предплечья. Впоследствии было установлено, что этот слой не увеличивается в толщину, но снижается интенсивность отражения. Ширина слоя зависит также от толщины кожи и от участка на теле. Некоторые

участки кожи, как например внутренняя сторона верхней части руки, демонстрируют такие слои и в молодом возрасте [93].

Присутствие субэпидермального слоя (возрастного слоя) и оценка его акустической плотности могут служить маркерами возрастных изменений кожи.

б) процессы заживления.

Изучена динамика изменений акустических параметров и микроструктуры кожи собаки в области заживающей раны [94, 95]. Установлено, что в процессе формирования рубца повышается и скорость звука (с 1540 до 1700-2000 м/с) и поглощение, что коррелировало с локальным повышением содержания коллагена в этой области.

в) пересадка кожи.

В 2011 году была разработана 3D система, основанная на В-сканах (двумерной эхографии), позволяющая реконструировать поверхность кожи, морфологию микрососудов и волосяных фолликулов в ней. При этом было достигнуто разрешение, сопоставимое с разрешением, полученным на ОСТ, т.о. подобный ультразвуковой 3D микроскоп может быть успешно применен в различных областях практической дерматологии и хирургии, предоставляя исследователю дополнительную информацию о состоянии пересаженного участка кожи, что раньше было невозможно достичь неинвазивными методами [96].

В настоящее время для расчетов толщины кожи принимается среднее значение скорости 1580 м/с. При этом скорость ультразвука в роговом слое составляет 1550 м/с; в эпидермисе – 1540 м/с; в дерме – 1580 м/с; подкожном жире – 1440 м/с. Скорость звука зависит от области измерения (лоб, живот, подошва, спина и т.д.): региональная средняя скорость составляет 1605 м/с. Скорость звука в ногте составляет 2459 м/с, при этом в дорзальной пластинке – 3101 м/с, а в матриксе – 2125 м/с [97, 98]. Однако разработанные акустомикроскопические методы предназначены для медицинской диагностики кожи человека [99] и не могут применяться для изучения кожи мелких лабораторных животных, эмбрионов или лабораторных животных на ранних стадиях онтогенеза в силу различия геометрических размеров.

Другим популярным объектом исследования является глаз. Впервые, использовать акустический микроскоп для получения изображений глаза, предложили Павлин [100] и Шерар [5, 101]. Для медицинской диагностики в офтальмологии был разработан специализированный акустический микроскоп [102-104]. Применение ультразвуковой микроскопии позволяет выявлять тонкие изменения строения глаза, связанные с развитием различных видов патологии, в том числе глаукомы, опухолей, кист, отеков и т.д. [104-110]. Опубликованы данные об использовании глазного микроскопа для получения трехмерных изображений опухолей передней камеры глаза, определения их объема и глубины залегания, контроля

постоперативных изменений после ультразвуковой термодеструкции опухоли [111, 112], исследование приживления искусственной роговицы [113, 114].

Исследование срезов нормального глаза человека показало, что затухание звука в глазу вызывается в основном ядрами клеток, палочками, красными кровяными тельцами и зрительным пигментом и в меньшей степени колбочками и мембраной Бруха (базальной мембраной). Кроме того, было установлено, что при исследовании более тонких срезов, достигается лучшее разрешение, чем при исследовании толстых срезов. Было показано, что фиксация тканей глаза не вызывает значимых изменений скорости звука по сравнению с нефиксированными образцами [115].

На образцах тонких срезов нефиксированных замороженных тканей глаза было установлено, что гашение звука происходит за счет пигментного эпителия, базальной мембраны, пигментов сосудистой оболочки и эластичной мембраны артериол в сосудистой оболочке глаза [115].

При сравнении радужной оболочки у кроликов обычных пород и альбиносов было установлено, что меланин вызывает затухание ультразвука. Проведение эксперимента на двух породах животных позволяет исключить вероятность того, что затухание может быть вызвано обычными клеточными структурами, такими как мембранные органеллы или микроворсинки. В результате эксперимента было показано, что в пигментном эпителии нормальных животных клеточные элементы были плохо различимы, тогда как у альбиносов внутренняя структура клеток просматривалась хорошо.

Поглощение ультразвука в тканях глаза обусловлено, вероятнее всего, поглощением крупными молекулами, такими как гемоглобин, коллаген и меланин. Было показано, что поглощение данными молекулами намного превышает отражение [115].

Исследованию костной и хрящевой ткани с помощью ультразвука также посвящено множество работ [116]. Однако большинство из них выполнено на низких частотах (20-30 МГц), при этом были получены изображения шлифов костей. На акустических изображениях видны основные компоненты костной ткани: остеоны, лакуны остеонов и их центральные каналы. Слоистая структура остеонов, сформированная костными ламеллами, имеет высокий акустический контраст благодаря высокой плотности и пространственной ориентации коллагеновых волокон [11]. Известно, что в процессе роста и развития, когда кость из более пористой превращается в компактизированную, уменьшается рассеивание ультразвука и повышается качество получаемых изображений. При этом измерение скорости звука в кости позволяет достаточно точно определить возрастные изменения [117].

1.2.3 Регенерация

Изучение процессов роста и регенерации тканей и органов является одной из наиболее важных и перспективных задач биологии развития. С этой точки зрения значимой была работа посвященная изучению возможностей применения акустической микроскопии для исследования процесса регенерации у лабораторных животных.

В роли экспериментального животного использовался аксолотль (*Ambystoma mexicanum*), т.к. он обладает огромной регенерирующей способностью. Животные были наркотизированы бензокаином, после этого проводилась ампутация задней конечности на разных уровнях (на уровне бедра, колена и т.д.), вторую конечность оставляли для контроля. Во время сканирования аксолотлей помещали в воду брюшной стороной вверх и проводили сканирование с помощью микроскопа Siemens Sonoline Versa Pro и линзы с частотой звукового сигнала 10 МГц, максимальная глубина проникновения звукового сигнала составляла 3 см. Полученные В-сканы обрабатывали на компьютере для формирования трехмерного изображения. Для контроля результатов полученные данные сравнивали с данными радиографии (интенсивность 4 рентгена).

Первую съемку проводили спустя неделю после ампутации. Далее съемку проводили с двухнедельным интервалом и всего было сделано 16 акустических и 14 радиографических исследований на каждом животном (все исследование шло 315 дней). Спустя неделю после ампутации рана затягивалась регенерационной бластемой, и начиналось формирование конечности. При сравнении изображений, полученных с помощью ультразвука и рентгена, было обнаружено, что регенерация большой и малой берцовых костей на акустомикроскопических изображениях была зафиксирована на 37 дней раньше, чем на рентгеновских снимках, а регенерация фаланг на 18 дней раньше. К 120-ому дню исследований изображения, полученные с помощью ультразвука и рентгена, показывали одно и то же. Скорость роста большой и малой берцовой кости в среднем составила 0.019 ± 0.001 мм в день [118].

В последнее время активное развитие получили современные направления: регенеративная медицина и тканевая инженерия. Ввиду уникальности получаемых образцов, необходимости проводить длительные испытания на одних и тех же объектах неинвазивно, данная область оказалась перспективной для акустической микроскопии. Сравнительный анализ изображений, полученных с помощью акустической, электронной и оптической микроскопии, показывает хорошую корреляцию как для искусственных матриц из нетканых материалов на основе полисульфона, диацетата целлюлозы и т.д., так и для натуральных матриц, полученных методом децеллюляризации внутренних органов [119-124].

1.2.4 Эмбриогенез

Исследования биологических объектов с помощью акустической микроскопии шли параллельно в двух направлениях. С одной стороны изучались живые клетки и их культуры, с другой – ткани взрослого организма. Накопленный опыт в итоге позволил перейти к изучению объектов биологии развития, в том числе *in vivo*. Изучение эмбрионов в их естественном состоянии (неокрашенном и нефиксированном) является очень важным для биологии развития, так как подобное исследование дает представление о процессах роста, регенерации и старения.

Одним из первых объектов биологии развития, для исследования которого использовали акустический микроскоп, был куриный эмбрион.

Работа была выполнена на курином эмбрионе в возрасте 72 часов, когда зачатки практически всех органов уже сформированы. Было проведено сравнение качества акустического изображения неокрашенного фиксированного эмбриона с изображением, полученным в оптическом микроскопе. С помощью оптической микроскопии были видны только крупные структуры, такие как зачатки глаз, крыльев, ног и некоторые области головного мозга и кровеносной системы. После окраски фиксированного препарата гематоксилином и эозином стали видны другие органы: все отделы мозга, хорда, сомиты, аллантоис и т.д. Данные, полученные с помощью акустической микроскопии, соответствовали данным оптической микроскопии, полученным после окраски препарата и по некоторым параметрам превосходили их [22].

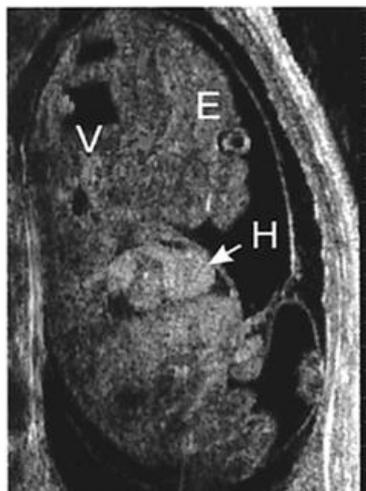


Рисунок 1.3. Изображение плода мыши внутри матки *in vivo*. Буквами отмечены отдельные органы: V – третий желудочек, E – зачаток глаза, H – зачаток сердца. Размер эмбриона – 1 см [15].

Первые работы, посвященные получению микроизображений мыши, были проведены группой ученых под руководством С. Фостера в Канаде. Эмбрионы мыши изучали, начиная с

5.5 суток пренатального развития и до рождения. Частота ультразвука составляла 40 МГц. Беременная мышка была анестезирована энфлураном. Поддерживалась комфортная температура 36-38°C, для уменьшения отражения звука мышь была побрита. В качестве иммерсионной среды использовали специальный акустический гель. Исследования на акустическом микроскопе проводили ежедневно.

На акустическом изображении (рисунок 1.3) показан плод мыши на 14.5 сутки, расположенный внутри матки. Наиболее темными являются полые образования, заполненные жидкостью, такие как собственно полость матки, полости головного мозга, в то время как дифференцирующиеся ткани и органы в процессе развития на акустических изображениях выглядят серыми. Некоторые органы, имеющие округлую или шарообразную форму, так же обладают хорошим акустическим контрастом (например, глаза, сердце, мочевой пузырь, печень, селезенка и т.д.), благодаря особенностям взаимодействию ультразвука с объектами подобной формы. В то же время, на более поздних стадиях акустический контраст органов будет обусловлен изменениями механических свойств ткани, появлению в них отдельных слоев и структурных элементов - например, хорошо видны сегменты почек, почечная лоханка, печеночная вена [15].

На основании данных литературы можно утверждать, что исследование объектов биологии развития с помощью акустической микроскопии является перспективным методом [15, 125, 126]. Однако отсутствие методических рекомендаций по проведению ультразвуковых исследований, универсальных для всех эмбриональных объектов, а так же последовательного ряда полученных акустических изображений эмбрионов на разных стадиях развития, существенно затрудняет применение данного метода на практике.

1.2.5 Исследование тканей в ненативном состоянии (фиксаторы и некрозы)

Если до недавнего времени скорость звука служила только для проведения градуировки эхографических систем визуализации и определения «дальности» расположения отдельных структур, то в настоящее время установлено, что сама по себе скорость звука является информативной специфической характеристикой ткани. Это послужило толчком для разработки методов определения скорости звука в тканях и определения изменения этого параметра, как при патологических состояниях, так и при изменении условий хранения, влияния фиксирующих агентов и т.д. В основном это касается образцов тканей или отдельных органов, которые не могут быть исследованы *in vivo* и подвергаются существенным изменениям с течением времени. Самым распространенным методом сохранения биологических тканей является фиксация.

Фиксация объектов преследует своей главной целью сохранение на длительный период формы и структуры, присущей живым клеткам, по возможности не внося дополнительных артефактов. Более того, основным свойством фиксатора является скорость проникновения в объект - от этого зависит, будут ли происходить посмертные изменения в образце. Фиксатор помогает сделать образец более устойчивым к последующим воздействиям и делает компоненты клетки нерастворимыми в воде, одновременно не допуская излишней хрупкости.

При выборе фиксатора необходимо учитывать, для каких исследований и окрашиваний будет использоваться фиксируемый объект. Например, после фиксации в формалине ткани хуже окрашиваются кармином, а при фиксации в чистом этаноле – плохо пропитываются парафином [33]. Рассмотрим основные фиксирующие вещества, применяемые для эмбриональных тканей.

Этанол часто входит в состав смесей для фиксации. Он не фиксирует белки, но при определенной крепости вызывает их необратимую денатурацию. Кроме того, в нем растворяются липиды. Этиловый спирт достаточно быстро проникает в ткани. Чистый этиловый спирт обычно не применяется в гистологии, т.к. вызывает резкое сморщивание объектов [33].

Наиболее распространенный фиксатор – формалин (формол) или 30-40% водный раствор газообразного формальдегида. Формалин хорошо фиксирует протеины и практически не влияет на углеводы. Положительными свойствами формалина является его высокая скорость проникновения в образец и минимальное влияние на изменение объема образца. Благодаря этим свойствам его часто используют для фиксации целых организмов и приготовления тотальных препаратов [33].

Смесь трех фиксирующих веществ в пропорции 9:3:1 (формалин 40% : этиловый спирт 90% : ледяная уксусная кислота) позволяет получить фиксатор ФСУ с хорошей проникающей способностью и небольшим изменением объема ткани. Наличие в составе уксусной кислоты положительно сказывается на фиксирующих свойствах смеси, т.к. она не только фиксирует, но и подкисляет ткани, что позволяет остальным фиксирующим частям растворов коагулировать и осадить части ткани [33].

В литературе приведены экспериментальные данные, указывающие на то, что при фиксации в 5% формалине образцов печени, головного мозга и селезенки млекопитающих, наблюдается незначительное снижение скорости звука в них [127], в то время как фиксация в 10% формалине образцов миокарда приводит к увеличению этого параметра [128], так же как и при фиксации твердых тканей (компактного вещества бедренной кости, эмали, дентина) [129]. Установлено, что фиксация в растворе формалина предпочтительней, чем в растворе этанола, т.к. оказывает меньшее влияние на изменение скорости звука в образцах.

Другим методом сохранения биологических образцов является замораживание. Важно было определить влияние замораживания на изменение акустических параметров, а также оценить за счет чего происходят эти изменения. На примере мышечной ткани коровы, установлено, что скорость звука в ткани находится в прямой зависимости от содержания в тканях незамерзшей воды. Часть работ была посвящена исследованию коэффициентов затухания на образцах тканей млекопитающих и рыб, которые сначала подвергались замораживанию, а затем – размораживанию. Рост затухания и обратного рассеяния после размораживания связывался с влиянием небольших полостей, появляющихся при образовании кристаллов льда, и растворенным воздухом. Дегазация размороженных образцов приводит к снижению коэффициента затухания [130].

При отсутствии фиксации и замораживания, образцы биологической ткани могут подвергаться старению и некротическим изменениям. С помощью анаэробных бактерий происходит разложение белков, жиров и углеводов с образованием кислот и газов, что приводит к появлению отеков, специфического запаха и изменению цвета образцов.

Было установлено, что при отводе газов, образующихся в результате автолиза образцов, уменьшение коэффициента затухания ультразвука с течением времени было незначительным (не более 15%) по сравнению с разбросом данных в норме [130]. В то же время сами газы существенно влияют на коэффициент затухания и этот коэффициент находится в прямой зависимости от температуры хранения образцов (падение на 20% при 35°C и практически не наблюдалось при 19.5°C, спустя 4 часа после взятия образца).

Предполагается также, что наблюдаемые различия между живыми и удаленными тканями в значительной мере обусловлены температурной зависимостью акустических параметров, в том случае, когда измерения проводятся при температуре, отличной от естественной для исследуемого объекта.

1.2.6 Условия проведения экспериментов и ограничения, накладываемые особенностями биологических объектов

1.2.6.1 Влияние неровностей поверхности

Применение акустической микроскопии для исследования биологических объектов связано с рядом особенностей и ограничений.

Биологические объекты, исследуемые *in vivo*, являются акустически неоднородными и обладают множественными поверхностными неровностями, что является причиной возникновения дополнительных погрешностей, связанных с рефракцией и дифракцией акустического сигнала. Большое количество работ было выполнено на плоскопараллельных образцах ткани, однако, на данный момент возникла потребность в изучении

микроанатомического строения объектов в неинвазивном состоянии, а также *in situ*, и проведенные ранее исследования имеют скорее методическое значение. Исследование живых клеток и клеточных культур в нативном состоянии позволило приблизиться к решению этой задачи. Однако при расчетах и описании поведения ультразвукового сигнала во время контакта с клеточной поверхностью использовалась клиновидная модель, в которой центральная часть с ядром обозначалась как самая высокая точка, а края клетки – как сужающиеся клинья. При этом считалось, что цитоплазма является гомогенной во всех ее компартментах. Такая аппроксимация позволила рассчитать углы отражения сигнала и определить сигналы, полученные от передней и задней поверхностей клетки, а также сигнал от подложки [131]. Благодаря достаточно простой топологии поверхности и хорошо изученным физическим характеристикам гемоглобина, в нативном состоянии без аппроксимаций успешно исследовались красные кровяные тельца человека и их фантомы (пустые клеточные мембраны) [132].

Использование моделей допустимо для относительно простых систем, таких как клетки, гистологические срезы, шлифы и спилы минерализованных тканей, которые можно представить как многослойные плоскопараллельные препараты. К сожалению, данный подход не эффективен для изучения объектов биологии развития, которые невозможно упростить так, чтобы полученные на модели данные отражали реальные свойства объекта, или представить в виде трехмерного объекта с достаточно простой для математических расчетов формой и физическими свойствами. Особую сложность здесь представляет интерпретация изображений, полученных на объемных объектах с неровной поверхностью, что требует большой осторожности.

1.2.6.2 Среды сканирования

Кроме особенностей самих объектов, необходимо учитывать использование дополнительных материалов, таких как подложки, субстраты, среды и иммерсионные жидкости, играющие роль среды временного обитания и позволяющие поддерживать физиологическое состояние, а также обеспечивать относительную неподвижность объектов исследования. Кроме того, дополнительные материалы должны обладать низкой реакционной способностью по отношению к объектам и известными акустическими параметрами, такими как скорость звука в них, плотность, акустический импеданс и т.д., а также в случае необходимости позволять изменять условия эксперимента (добавлять питательные, наркотизирующие и обезболивающие вещества, лекарственные препараты, красители).

Подбор иммерсионной среды для исследуемого класса объектов является одной из важнейших методических задач. Основными параметрами выбора иммерсионной среды

является величина скорости звука, соотношение акустических импедансов иммерсии и объекта, коэффициент затухания ультразвука в среде, и, как указывалось ранее, низкая по отношению к образцу реакционная способность.

Хотя при работе с первым акустическим микроскопом К. Квейт и Р. Лемонс в качестве иммерсионной среды использовали воду, было проведено множество экспериментов по подбору альтернативных сред сканирования. В том числе проводились исследования акустических свойств водных растворов электролитов, т.к. на высоких частотах (1.5 ГГц) затухание ультразвука в воде достаточно велико. Было установлено, что затухание звука как правило уменьшается с ростом концентрации электролита.

При изменении температур актуальным было рассматривать перекись водорода как возможную иммерсию, в связи с тем, что поглощение звука в ней слабо зависит от изменений температуры в диапазоне от 15 до 50°C. Некоторые органические жидкости обладают сходным с водой поглощением звука, например спирты, муравьиная кислота, сероуглерод и т.д. Все они использовались для исследования образцов в гигагерцовом диапазоне при комнатных температурах. Жидкие металлы, такие как ртуть и галлий, обладают низкой степенью затухания и применяются при исследовании образцов в материаловедении [133, 134].

Для биологических объектов наиболее предпочтительной и удобной остается вода и растворы солей на ее основе ввиду своей низкой реакционной способности по отношению к биологическим тканям и возможности использовать ее для многократных прижизненных измерений широкого класса объектов (от клеток до целых эмбрионов). Коэффициент поглощения звука в воде меньше, чем у большинства жидкостей. Кроме того, скорость звука в биологическом образце мало отличается от скорости звука в иммерсии (не более чем на 10-20%, ввиду высокой обводненности биологических тканей), что обеспечивает минимальные потери на границе иммерсия-образец и позволяет ультразвуку проникать вглубь объекта. Близкая по своему значению скорость звука в иммерсии и образце так же положительно влияет на качество получаемых изображений за счет уменьшения аббераций, обусловленных преломлением фокусного пучка на границе раздела между иммерсией и образцом [63].

1.2.6.3 Подложки

Использование подложек при исследовании ультразвуковыми методами обусловлено выбором сканируемых объектов. Выбор подложки имеет критически важное значение при изучении клеток и клеточных культур – их исследование как при помощи оптического, так и акустического микроскопа, производят на стеклянных или пластиковых подложках, на которых клетки хорошо распластываются, при этом подложки не обладают реактивностью по отношению к клеткам. Хильдебрандт с соавторами проводили исследование клеток на

кварцевом стекле, сапфировом кристалле со стеклянным покрытием и полистироле [49]. Коэффициент отражения звука у этих материалов, особенно у стекла, намного выше, чем таковой у мягких тканей биологических объектов.

Было установлено, что решающее значение при получении акустических изображений играет место фокусировки ультразвукового пучка. При попадании подложки в фокальную область было отмечено появление широкой затемненной полосы, мешающей анализу задней поверхности образца, при этом сама подложка выглядит светлой. При увеличении расстояния между подложкой и линзой, на изображении появлялись интерференционные кольца, которые являются результатом интерференции между отражением от поверхности клетки и от субстрата. Так как отражение от субстрата должно пройти через клетку дважды, его фаза определяется как отношение толщины клетки к скорости звука в ней. Если сфокусировать линзу под подложкой, то становится хорошо видна задняя поверхность клетки, прилежащая к субстрату [49]. Так же было математически рассчитано и экспериментально установлено, что небольшое количество жидкой среды, всегда попадающее между объектом и подложкой, оказывает сильное влияние на коэффициент отражения и в процессе анализа не может быть проигнорировано [135].

Находясь вне зоны фокуса при анализе крупных объектов, отражение от поверхности подложки тем не менее может вносить свой вклад в формирование изображения.

Избежать этого возможно при использовании субстратов с импедансом, близким к импедансу исследуемого образца, если субстрат находится за пределами фокальной области. Для этой цели подходит концентрированный агар (более 3%) или мягкий поливинилхлорид (ПВХ). Степень необходимой удаленности от точки фокуса напрямую зависит от коэффициента отражения самого субстрата. С другой стороны, отражения от субстрата и от задней поверхности образца могут пересекаться, что может быть использовано для определения точного расположения задней границы образца и усиления сигнала, вернувшегося в линзу [131]. Кроме того, зная акустические параметры подложки и используя их как константу во всех исследованиях, можно вычислить акустические параметры образцов биологической ткани, помещенных на подложку.

1.2.7 Влияние ультразвука на биологические объекты

Активное внедрение ультразвуковых приборов в биологию и медицину привело к потребности изучения безопасности данных приборов для биологических объектов и тканей. Имеется обширная литература, посвященная данному вопросу [40, 136-139]. Два методических подхода: исследование воздействия ультразвука на систему в целом и на ее отдельные элементы, дополняют друг друга, позволяя оценить вклад отдельных макромолекул и их

комплексов в ультразвуковую резистентность системы, а так же изменение влияния ультразвука при повышении уровня организации.

Рассмотрим теоретическое, модельное и практическое влияние ультразвука, а так же параметры применения ультразвука в медицине и биологии в различных целях.

1.2.7.1 Теоретические эффекты воздействия ультразвука на биологические объекты

В процессе ультразвукового исследования ультразвуковые волны, распространяясь в среде, претерпевают ряд изменений, в том числе происходит их затухание. Затухание обусловлено поглощением звука средой, т.е. переходом звуковой энергии в другие виды энергии, в частности в тепловую. Коэффициент поглощения увеличивается с ростом частоты и зависит от свойств вещества, в котором распространяется волна, а также от температуры, давления и других условий. Биологические объекты, особенно эмбриональные, проявляют чувствительность к температурным и прочим изменениям. В связи с этим температурные колебания могут сильно повлиять на исследуемый образец в процессе исследования.

Температурный эффект ультразвука бывает двух типов:

- нагревание непосредственно образца. Нужно обратить внимание, что выделение теплоты на границе раздела тканей с различными акустическими сопротивлениями (например, мышцы - кость) намного выше, чем внутри однородных тканей. Дополнительная разность температур возникает из-за различной теплопроводности тканей.
- нагрев неподвижной иммерсионной среды и перенос тепла из среды в образец. Данный случай характерен в основном для объектов, поглощение ультразвука в которых пренебрежимо мало и разогрев образца определяется в основном диффузией тепла из иммерсионной среды (металлы, полупроводники и т.д.) В биологических тканях, близких по своим свойствам к воде, данный перенос тепла является не существенным, т.к. образец совместно с иммерсионной жидкостью представляют собой однородную по тепловым свойствам среду.

Эффект радиационного давления:

- в ультразвуковом поле возникают постоянные силы, действующие на любое препятствие на пути прохождения ультразвуковых волн. В таких условиях возникает радиационное давление, которое способно изменить или повредить биологический образец. Показано, что силы радиационного воздействия в фокальной области сходящегося ультразвукового пучка для акустического микроскопа невелики [140] – в основном это обеспечивается импульсным характером воздействия, где длительность импульса составляет 1-10 нс [141].

Физико-химические эффекты:

- кавитация. Возникновение кавитации может сопровождаться различными физическими и химическими явлениями: ускорением одних химических реакций и замедлением других, возникновением интенсивных микропотоков, ультразвуковым свечением, разрывом химических связей макромолекул, возникновение свободных радикалов и т.д. (исследовалось на растворах аминокислот, оснований, белков и нуклеиновых кислот).
- эффекты механохимической природы (ниже порога кавитации воды): деполимеризация ДНК, изменение свойств жидких кристаллов [40].

1.2.7.2 Экспериментальные исследования влияния ультразвука на биологические системы

В параграфе 1.2.7.1 были рассмотрены теоретические эффекты воздействия ультразвука на биологические объекты в процессе исследования. Так как исследованию подвергаются чаще сложные многослойные образцы (ткани, органы, эмбрионы и микроскопические организмы), эффект воздействия ультразвука трудно предположить или рассчитать в каждом конкретном случае. Однако было проведено некоторое количество исследований, на основании которых можно рассмотреть влияние ультразвука на реальные биологические системы. Данные об этом достаточно отрывочны и противоречивы. Известно, что ультразвуковые исследования могут оказывать влияние на различных уровнях организации [40].

Регистрируемые молекулярные изменения:

- повреждение азотистых оснований;
- стимуляция полимеризации актина;
- возникновение свободных радикалов.

Внутриклеточные изменения:

- остановка или задержка дробления (яйца морского ежа, частота 58 КГц);
- фрагментация ядрышек (яйца морского ежа, интенсивность 400 мВт/см²);
- изменение вязкости цитоплазмы и ускорение ее движения (яйца морского ежа, интенсивность 400 мВт/см²);
- разрыв митохондрий и ядерных оболочек (культура клеток HeLa, интенсивность 0.1-10 Вт/см²).

В организме матери может происходить изменение в:

- состоянии плаценты (на мышах, интенсивность 0.4 Вт/см²);

- состоянии миометрия (на мышах, интенсивность 2 Вт/см²).

У эмбрионов фокусированный ультразвук может вызывать изменения в:

- скорости развития зародышей (на мышах, интенсивность 0.4 Вт/см²);
- скорости увеличения веса плода (на мышах, интенсивность 0.36 Вт/см²).

Отдаленные эффекты воздействия ультразвука на плод:

- нарушения нервно-мышечных реакций после рождения (на крысах, интенсивность 1 Вт/см²).

Кроме того, наблюдался и положительный стимулирующий эффект, приводящий к сокращению сроков развития:

- стадия зародышевой полоски (на тутовом шелкопряде, частота 125 КГц, мощность 300-400Вт, время воздействия – 1-9 минут);
- стадия средней гаструлы (икра зеленой лягушки, интенсивность 0.6-2.9 мВт/см²).

Такие несистематические исследования не могут дать полноценного представления о влиянии ультразвука на биологические объекты, т.к. по имеющимся данным можно заметить, что влияние на организм зависит сразу от нескольких параметров (таких как время воздействия, частота, интенсивность и мощность ультразвука), а так же видовой принадлежности исследуемых организмов и стадии развития.

Таблица 1.1. Безопасное время воздействия ультразвука различной интенсивности на зародыши *Rana temporaria* на разных стадиях.

Стадия	Отсутствие побочных эффектов	Интенсивность, Вт/см ²			
		0.1	7	20	47
0-4 дробление	после воздействия	до 300 мсек	до 900 мсек	до 1 сек	до 900 мсек
	через 48 часов после воздействия	до 20 мин	до 3 мин	до 5 сек	до 10 сек
8-9 бластула	после воздействия	10-500 мсек	нет безопасной зоны		до 900 мсек
	через 48 часов после воздействия	10 мсек-50 сек	10 мсек-50 сек	10 мсек-10 сек	10-50 мсек
12-15 гаструла	после воздействия	10 мсек-10 мин	1 сек-50 сек	10-100 мсек	менее 100 мсек
	через 48 часов после воздействия	10 мсек-20 мин	10 мсек-50 сек	10-100 мсек	до 50 сек

Фундаментальные исследования по влиянию ультразвука на эмбриональное развитие в зависимости от стадий были проведены только для травяной лягушки (*Rana temporaria*). Зародыши в течение 3 дней содержались при комнатной температуре и подвергались воздействию ультразвука частотой 0,5 МГц с разной интенсивностью и разным временем воздействия [142]. Полученные результаты представлены в таблице 1.1. Стадии указаны в соответствии с таблицами нормального развития [24].

По итогам данной работы можно сделать следующие выводы: для интенсивности 0.1 Вт/см^2 безопасным можно назвать воздействие до 20 минут, $7-20 \text{ Вт/см}^2$ до нескольких секунд, 47 Вт/см^2 до нескольких миллисекунд.

Однако данные результаты представляется затруднительным применять к эмбрионам других видов, для каждого вида необходимо определить свои границы интенсивности и длительности применения ультразвука. Тем не менее, полученные результаты дают общее представление о влиянии подобных исследований на эмбриональные объекты. Необходимо заметить, что порог биологического действия плоской ультразвуковой волны значительно ниже порога действия фокусированного ультразвука на те же структуры. Известно, например, что кавитационная прочность воды и мягких биологических тканей при фокусировании ультразвука и уменьшении области воздействия резко возрастает [40].

Можно выделить три основные области применения ультразвука в биологии и обозначить допустимые для достижения необходимого эффекта характеристики ультразвука:

1. диагностическая (детектирование и визуализация без воздействия на исследуемые объекты) применяется либо непрерывный ультразвук низкой частоты 1-10 МГц и невысокой интенсивности менее 0.05 Вт/см^2 , либо импульсный высокочастотный ультразвук до 10 МГц интенсивностью до 500 Вт/см^2 и малой длительностью импульсов (2-5 мкс). Во втором случае, несмотря на высокую интенсивность импульсов, усредненная по времени и пространству интенсивность в этом случае не превышает 10^{-3} Вт/см^2 .
2. терапевтическая (ускорение обменных процессов, регенерации и т.д.). Параметры: частота 0.7-3 МГц, интенсивность $0.1-2 \text{ Вт/см}^2$, продолжительность 3-10 минут.
3. ультразвуковая хирургия (разрушение небольших образований внутри организма без травмирования окружающих тканей и нарушения целостности кожных покровов). Параметры: частота 20-100 кГц, амплитуда 1-350 мкм [40].

1.3 Перспективные области применения ультразвука при исследовании эмбриональных объектов

1.3.1 Космическая биология

Эмбриональное развитие птиц представляет большой интерес для космической биологии, т.к. в отличие от млекопитающих происходит вне тела матери и изменение внешних условий может быть скомпенсировано только индивидуальными реакциями развивающегося организма, а не системой «мать – плод». Особый интерес представляют животные, нуждающиеся в опоре, чья поведенческая модель в невесомости будет похожа на человеческую [143]. Также известно, что, не смотря на компенсаторные реакции организма, часть особей сложнее переносит состояние невесомости и гипергравитации из-за индивидуальных особенностей. Данные особенности можно отнести к постепенно накапливающимся изменениям в генетическом аппарате, не проявляющимся в нормальных условиях, но способным привести к гибели организма при экстремальных воздействиях. Таким образом, прогнозирование и отбор резистентных и быстро адаптирующихся особей является одной из развивающихся задач космической биологии [144].

Кроме того, в ходе отбора особей необходимо проводить дополнительные гистологические и анатомические исследования погибших животных для выяснения причин гибели. Стандартные гистологические методы не всегда дают положительный результат, т.к. в ходе эмбрионального развития в условиях невесомости наблюдается повышение количества воды в тканях плода. Более того, гибель часто происходит из-за множественных точечных кровоизлияний и отеков, что не позволяет провести качественные гистологические исследования. Зачастую полученные эмбрионы успевают подвергнуться некротическим изменениям, в результате чего проведение классических гистологических исследований с изготовлением препаратов и срезов затруднено, а чаще невозможно, т.к. некротические ткани плохо поддаются фиксации и последующей гистологической обработке.

Одним из самых перспективных и успешно зарекомендовавших себя представителей позвоночных животных в данной области является японский перепел. С 1979г ведутся исследования эмбрионального, постэмбрионального развития и адаптации взрослых особей перепела в космосе на биоспутнике «Космос-1129» и ОК «МИР». Для этого был решен целый комплекс задач жизнеобеспечения и размещения птиц на борту станции: разработан инкубатор, специальный корм в виде пасты с содержанием воды около 80%, сконструирована система утилизации отходов [143]. Определены ключевые стадии эмбрионального развития, представляющие особый интерес для последующего исследования на Земле. Выбор стадии

развития эмбрионов базировался на результатах экспериментов, проведенных в 1993 г. на борту американского корабля Space Shuttle [145].

Гигантским прорывом для человечества можно считать успешное проведение эксперимента на ОК «МИР», в результате которого в космосе появилось на свет первое позвоночное животное: 22 марта 1990 г. вылупился перепел [143]. Это событие открывает перспективы для дальнейших исследований, как развития данного вида птиц, так и других теплокровных животных.

Для исследования подобных уникальных образцов эмбрионов в данных условиях также может быть использована акустическая микроскопия.

1.3.2 Газовые среды

Другой отраслью, активно использующей эмбрионы перепела как экспериментальный объект, является создание искусственных дыхательных сред и определение их биологического действия на организм.

Использование различных газовых смесей для создания искусственных сред обитания в данный момент является перспективным и активно развивающимся направлением. Так, необходимо создание пожаробезопасных сред для космических кораблей и станций, использование инертных газов в составе газовых смесей при глубоководных водолазных спусках. Кроме того, проводятся эксперименты по внедрению и использованию газовых смесей с содержанием инертных газов в новых методах лечения и реабилитации. Экспериментально установлено, что инертные газы обладают целым спектром биологических действий, используемых в медицине (терапия неврозов, бессонницы, снижение болевой чувствительности и т.д.). Широко известно анестетическое действие ксенона [146], однако, его использование ограничено высокой стоимостью. Самым близким по физическим свойствам к нему является криптон, который при нормальном давлении может использоваться в реабилитации, а при повышенном – играть роль анестетика. Однако перед активным внедрением его в практику необходимо всестороннее изучение его свойств и влияния на биологические объекты. В связи с этим проводится множество исследований, в том числе на эмбрионах японского перепела [147]. Акустическая микроскопия в данной исследовательской области может служить высокоэффективным подспорьем для проведения микроанатомических и морфологических исследований.

Таким образом, отраженный в литературе материал о применении фокусированного ультразвука для изучения биологических тканей свидетельствует о высокой эффективности акустической микроскопии в получения визуальных изображений структуры образцов малого объема, тонких препаратов, целых организмов небольшого размера *in vivo* и даже отдельных

клеток *in vitro*. Однако результаты, полученные с применением акустического микроскопа в области биологии развития, единичны, отрывочны. Не представляется возможным сделать обоснованное заключение о том, какие методические проблемы могут возникнуть при попытке исследования на акустическом микроскопе того или иного конкретного объекта. Так как исследуемый объект вносит существенный вклад в получаемый результат при взаимодействии с ультразвуковым пучком, для каждого класса объектов необходимо разработать специализированные узконаправленные методики изучения.

После разработки комплексного методического подхода следующим важным этапом является необходимость правильной интерпретации полученных изображений и данных измерений. Актуальным становится сопоставление акустических изображений с изображениями, получаемыми классическими методами. В данной работе кроме ультразвуковой микроскопии применялись методы оптической микроскопии, в том числе классическая гистология и метод Доусона [148].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Устройство и принцип работы сканирующего акустического микроскопа

Исследование объектов при помощи акустического микроскопа базируется на взаимодействии ультразвукового излучения с образцом. По изменению волновых параметров в результате прохождения через вещество образца или отражения от его структурных элементов судят о свойствах исследуемого объекта. При этом важнейшая характеристика микроскопа – разрешение, определяется длиной волны ультразвукового сигнала [6]. Ультразвук, в отличие от светового луча, легко проникает в толщу плотных непрозрачных объектов, поэтому с помощью ультразвуковой микроскопии можно изучать не только поверхность объекта, но и его внутреннюю структуру. В отличие от светового или электронного микроскопов в акустическом микроскопе формирование контраста определяется не взаимодействием светового пучка с образцом и не его диэлектрическими свойствами, а вариациями упругости, вязкости, плотности вещества образца [9, 56]. Благодаря этому акустические изображения формируются на основе вариаций пространственных упругих свойств различных структурных элементов вещества или биологической ткани. Следовательно, получаемая информация отражает не только морфологические особенности объекта – очертания, форму, размеры, взаимное расположение отдельных структурных элементов, но и пространственное распределение структур с различными физико-механическими свойствами как на поверхности, так и в толще исследуемого объекта.

Следует также отметить, что контраст, основанный на вариациях упругих свойств, выражен, как правило, в большей степени, чем различия физической или оптической плотности. Поэтому отчетливые акустические изображения можно получать без предварительной фиксации, обезвоживания, контрастирования, окраски и других процедур, без которых невозможно изучение биоматериала в оптическом или электронном микроскопе.

Трансмиссионный акустический микроскоп позволяет регистрировать не отраженные, а прошедшие через образец звуковые волны. Для этого в качестве приемника используется вторая линза. Линзы могут располагаться как соосно, так и конфокально. В фокальную плоскость помещается тонкий образец. Для построения изображения объект перемещается, оставаясь все время в фокальной плоскости. В настоящее время трансмиссионные микроскопы используются достаточно редко. Это связано с существенными ограничениями, накладываемыми на исследуемый образец — он должен быть достаточно тонким и плоским. Кроме того, возникают трудности при взаимной юстировке линз.

Наибольшее применение получили микроскопы, работающие в режиме «на отражение» с использованием коротких (1-2 длины волны) акустических импульсов. Центральным элементом акустического микроскопа является акустическая линза. Ультразвуковая волна генерируется пьезопреобразователем, нанесенным на один из торцов акустической линзовой системы, и распространяется по звукопроводу. Затем с помощью линзы (сферического углубления на другом конце звукопровода) волна фокусируется в иммерсионной среде. Фокус линзы F (рисунок 2.1) соответствует не точке, а узкой фокальной перетяжке, имеющей латеральный (a) и аксиальный (b) размеры, которые определяются длиной волны в иммерсионной жидкости, апертурой и радиусом кривизны линзы. [7, 149].

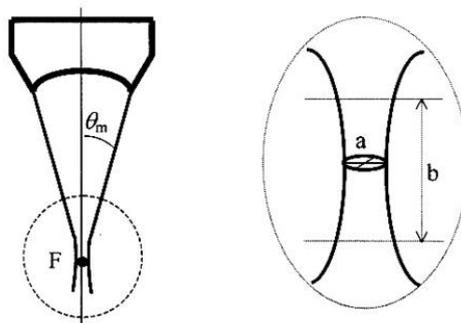


Рисунок 2.1. Пространственная структура сфокусированного ультразвукового пучка.

Проходя через иммерсионную жидкость, ультразвуковой сигнал собирается в узкую фокальную перетяжку в объеме иммерсии. Часть звукового сигнала отражается от поверхности, часть – преломляется и проходит внутрь объекта, последовательно отражаясь от внутренних структур и затем от противоположной границы объекта. Чем глубже в толще объекта расположена структура, отразившая ультразвуковой сигнал, тем позже приходит отразившийся от нее импульс. В сканирующем акустическом микроскопе используются короткие импульсы, равные по длительности 1.5-2 осцилляции. Сразу же после генерации зондирующего сигнала линза переключается и начинает работать как приемное устройство.

Все отраженные сигналы принимаются линзой, передаются на усилитель, преобразуются, обрабатываются и отображаются в виде функции времени. Каждый электрический импульс проходит через систему фильтров, усиливается, детектируется и подается на модулятор яркости дисплея. Растровое акустическое изображение, отражающее распределение механических свойств на исследуемом участке объекта, формируется путем построчного механического сканирования линзы параллельно ее фокальной плоскости в двух взаимно перпендикулярных направлениях [6, 48, 150]. Вариации амплитуды и фазы сигнала от

точки к точке определяют контраст акустического изображения. Эти вариации связаны с локальными величинами акустических параметров образца (плотностью, упругостью, вязкостью, твердостью). Таким образом, осуществляется связь локальных механических свойств зондируемой точки объекта с яркостью точки экрана дисплея. Полученные данные хранятся в памяти компьютера и могут использоваться для дальнейшего анализа. С помощью компьютера производится управление системой сканирования, синхронизация электронных блоков, запись и обработка информации.

Радиус фокальной перетяжки a определяет латеральное разрешение, или минимальное расстояние между двумя различными точками, вычисляемое по формуле:

$$a = 0.61\lambda/\sin\theta_m \quad (2.1)$$

или $0.61\lambda/\theta_m$, где λ - длина волны ультразвука, а θ_m - половинный угол раскрытия линзы. С величиной b связано аксиальное разрешение микроскопа (глубина залегания структур, которые могут вносить вклад в формирование изображения), которое составляет

$$b = 2\lambda/(1 - \cos\theta_m) = 4\lambda/\theta_m^2. \quad (2.2)$$

Скорость ультразвука в веществе (C) определяется особенностью молекулярного строения и является постоянной характеристикой материалов. Интегральным показателем плотности и упругости среды является волновое (акустическое) сопротивление, или акустический импеданс Z – отношение звукового давления в бегущей плоской звуковой волне к колебательной скорости частиц среды [151]. Оно равно произведению плотности среды ρ на скорость звука C в ней:

$$Z = \rho C = \sqrt{\rho E}, \quad (2.3)$$

Энергия ультразвукового сигнала, прошедшего внутрь образца, может быть оценена с помощью формулы:

$$T_I = 4 Z_1 Z_2 / (Z_1 + Z_2)^2, \quad (2.4)$$

а энергия отраженного сигнала:

$$R_I = (Z_2 - Z_1)^2 / (Z_2 + Z_1)^2, \quad (2.5)$$

где Z_1 - удельное волновое сопротивление (акустический импеданс) иммерсионной жидкости; Z_2 - удельное волновое сопротивление (акустический импеданс) исследуемого образца. Различие акустических сопротивлений определяет характер отражения на границе сред в тканях [152].

Для проведения экспериментальных исследований использовался сканирующий акустический микроскоп (САМ) (рисунок 2.2), изготовленный в 1999-2000 гг. в

Международном центре по исследованию современных материалов Института биохимической физики РАН. Данный микроскоп работает в режиме «на отражение» на частоте звуковых волн в диапазоне 10-100 МГц [153].

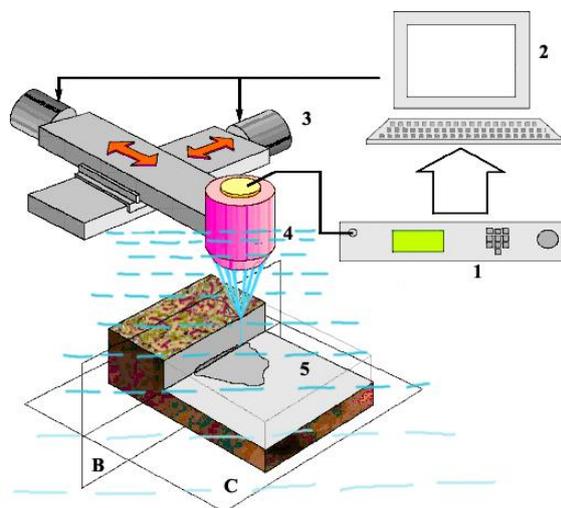


Рисунок 2.2. Общий вид и схема устройства сканирующего акустического микроскопа: 1 – генератор импульса, 2 – ПК, 3 – механизм сканирования, 4 – акустическая линза, 5 – образец, В – плоскость В-сканов, С – плоскость С-сканов.

Кювета с образцом, погруженным в иммерсионную жидкость, помещается на предметный столик. Сканирование образца происходит при перемещении акустической линзы по двум координатам x и y . Шаг сканирования по обеим осям может быть задан в интервале от 1 до 50 мкм. Максимальный размер площади сканирования 12×12 см. Система микроскопа позволяет работать со сменными линзами 15, 25, 50 и 100 МГц, что обеспечивает разрешение от 200 до 15 мкм соответственно. Коэффициент усиления: 20 – 60 дБ. Акустическая мощность в фокальной области – $1.3 \cdot 10^{-3}$ Вт/см². Обеспечивается возможность сохранения изображений в графическом формате и импортирование изображения в другие программы для последующей обработки.

В акустической микроскопии приняты следующие традиционные формы представления полученной информации:

А-скан – осциллограмма, полученная при зондировании образца короткоимпульсным звуковым сигналом, передает последовательность отражения от поверхности образца и от элементов внутренней структуры (рисунок 2.3А).

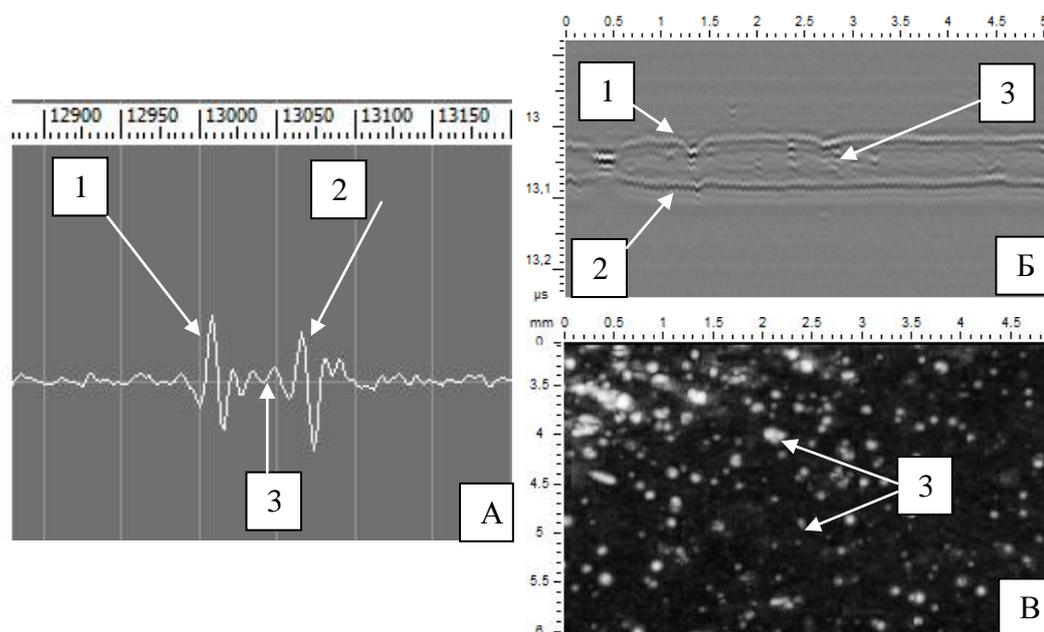


Рисунок 2.3. Режимы акустической визуализации внутренней структуры объектов на примере нетканого волокнистого материала из хитозана. А – А-скан (шкала в нс); Б – В-скан (шкала в мм по ширине и в мсек по глубине); В – С-скан в подповерхностной области (обе шкалы в мм): 1 – отражение от передней поверхности образца; 2 – отражение от задней поверхности образца; 3 – отражение от элементов внутренней структуры.

В-скан – изображение, полученное при передвижении линзы параллельно поверхности образца вдоль одной линии с определенным шагом сканирования. Формируемое изображение выглядит как срез, выполненный перпендикулярно поверхности по линии сканирования (рисунок 2.3Б).

С-скан – растровое изображение, полученное при реконструкции среза в плоскости объекта на базе цифрового массива данных, полученного при последовательном построчном сканировании объекта (рисунок 2.3В). В данной работе в основном использовались С-сканы, получаемые в плоскостях, перпендикулярных оси линзы и направлению падающего ультразвукового пучка на различной глубине под поверхностью объекта.

Для получения изображения отдельных структур или слоев на разных уровнях в объеме образца используется установка временных акустических ворот - ограничение временного интервала, в пределах которого принимаются все отразившиеся от объекта ультразвуковые сигналы, при этом сигналы, пришедшие раньше или позже установленного интервала времени, не принимаются и не участвуют в формировании визуального изображения.

2.2 Эмбрионы как объекты ультразвукового исследования

Таблица 2.1. Объем проведенных исследований.

Объекты	Методы акустической микроскопии					Оптическая микроскопия					
	морфологический анализ		количественные измерения		получение изображений	микроранатомическое исследование	морфологическое исследование	метрическое исследование	гистологические методы		
	поверхности	внутренней структуры	скорости звука	пространственная морфометрия					тотальные препараты	окраска по Маллори	метод Доусона
1. Разработка метода											
а) влияние неровностей поверхности											
модельные образцы	16	16	8	8	16	—	—	16	—	—	—
экспериментальные биологические образцы	15	15	4	4	15	—	—	15	—	—	—
б) иммерсионные среды											
образцы сред	33	20	33	33	10	—	—	8	—	—	—
в) подложки											
образцы подложек	16	16	8	10	10	—	—	10	—	—	—
г) влияние состояния исследуемых объектов											
влияние фиксаторов	10	—	10	10	10	—	—	10	—	—	—
влияние некротических изменений	6	—	6	6	6	—	—	6	—	—	—
2. Исследование эмбрионов японского перепела											
нормальное развитие нефиксированных эмбрионов	92	92	8	92	29	35	20	15	6	13	6
3. Влияние факторов космического полета											
эмбрионы японского перепела	10	10	—	10	3	10	10	10	—	—	—
4. Влияние газовых смесей											
эмбрионы японского перепела	10	10	—	10	3	10	10	10	—	—	—

В качестве экспериментального объекта в данной работе был использован японский перепел (*Coturnix coturnix japonica dom.*). В последнее время японский перепел успешно конкурирует с курицей – самым известным и хорошо изученным объектом экспериментальных исследований. Перепел хорошо размножается в лабораторных условиях, устойчив к некоторым

заболеваниям домашней птицы, имеет меньшие размеры и короткий срок инкубации. Кроме того, вес взрослой особи всего 100г, однако, отношение массы тела к единице корма гораздо выше, чем у кур. Все эти факторы представляют перепелов перспективным экспериментальным животным. Размеры эмбрионов перепела сравнимы с таковыми у мелких лабораторных млекопитающих (мышей, крыс, хомяков, морских свинок, кроликов и т.д.), а также с куриными эмбрионами, что позволяет экстраполировать полученные данные на большую группу экспериментальных животных и расширить пределы нового разработанного ультразвукового метода. Более того, японский перепел является объектом фундаментальных исследований для оценки влияния факторов космического полета, прежде всего, невесомости на минеральный обмен и формирование скелета наземных позвоночных. Также он может рассматриваться как компонент гетеротрофного звена замкнутых экологических систем жизнеобеспечения в условиях космического полета, в том числе за счет производства, так называемого отчужденного продукта питания - яйца. В отличие от кур, перепела несут до 2 яиц в сутки, которые по своей питательной ценности не уступают куриным, но по некоторым свойствам даже превосходят (содержание лизоцима, калия, железа, витаминов А, В, В2, и т.д., аминокислотному составу), а так же являются гипоаллергенными.

Такие перспективы использования перепелов в науке порождают необходимость получения данных о нормальном развитии этих птиц. Однако несмотря на популярность и активное использование перепелов в экспериментальных исследованиях, сведений о нормальном развитии животных в литературе встречается крайне мало. Таблицы эмбрионального развития были составлены в 1961г., где было проведено сравнение с куриными эмбрионами на каждой стадии [153]. Проведен ряд экспериментов, в которых японский перепел выступает в роли модели для изучения наследственных заболеваний человека, формирования злокачественных опухолей и врожденных уродств, сцепленных с одним или несколькими генами, а также выявления количества генов, отвечающих за определенные специфические характеристики организма [154]. Относительно недавно была выполнена работа по изучению нормального развития скелета эмбрионов перепела [31]. Более подробных исследований других систем органов в нормальных условиях в доступной литературе встречено не было.

В данной работе исследование проводилось на эмбрионах японского перепела в период с 1 по 11 сутки эмбрионального развития. Сразу же после извлечения из инкубатора скорлупу яйца вскрывали, эмбрион помещали в кювету, наполненную физиологическим раствором, и сканировали на акустическом микроскопе. После исследования проводили вскрытие эмбрионов и микроанатомический анализ состояния и взаиморасположения внутренних органов.

2.3 Методы исследования изменения акустических свойств биологических тканей

Для оценки изменения акустических свойств тканей под действием фиксаторов проводилась следующая подготовка объектов:

1. у эмбрионов перепела на 7-е сутки развития брался фрагмент ткани объемом около 1 см³ в районе брюшной области;
2. фрагмент ткани помещался в исследуемый фиксатор объемом 20 мл на 48 часов при комнатной температуре так, чтобы образец ткани был полностью погружен в фиксатор;
3. после фиксации фрагмент ткани промывался в дистиллированной воде;
4. полученный образец ткани исследовался с помощью акустической микроскопии в специальной камере на предмет определения скорости звука.

2.4 Методы гистологической обработки

Для изучения в оптическом микроскопе исследуемые объекты фиксировались в ФСУ (40% формалин : 96% этанол : ледяная уксусная кислота / 9 : 3 : 1) в течение 24 часов. Далее объект проводили по бутанольной проводке, используя следующую схему:

1. отмывка в 70% этаноле: 2 смены по 15 минут;
2. 70% этанол – 50 минут;
3. 96% этанол – 50 минут;
4. смесь: 82% этанол : бутанол (3:1) – 50 минут;
5. смесь: 96% этанол : бутанол (1:1) – 50 минут;
6. смесь: 100% этанол : бутанол (1:3) – 50 минут;
7. 2 смены бутанола по 50 минут каждая;
8. 2 смены парафина по 24 часа каждая в термостате при 56°C;
9. ориентированная заливка в парафин.

Залитый материал был нарезан на микротоме МКМ-1, с толщиной срезов 9-10 микрон. Полученный материал был окрашен по методике Маллори:

1. депарафинирование: ксилол (1.5 минуты) → смесь ксилол : 100% этанол (1:1) 1 минута → 100% этанол (1 минута) → 96% этанол (1 минута) → 70% этанол (1 минута) → ополаскивание дистиллированной водой;
2. 0.1% раствор кислого фуксина (1 минута 50 секунд);
3. ополаскивание дистиллированной водой;
4. 1% раствор фосфорно-молибденовой кислоты (3 минуты);
5. ополаскивание дистиллированной водой;
6. смесь Маллори (1 минута 45 секунд);
7. ополаскивание дистиллированной водой;

8. дифференцировка в 96% этаноле (5 секунд);
9. 100% этанол (45 секунд) → смесь ксилол : 100% этанол (1:1) 45 секунд → ксилол (45 секунд) → заключение в бальзам [33].

Для исследования скелета эмбрионов перепела применялась методика Доусона (окрашивание ализарином) [148]:

1. эмбрионы фиксируются в этаноле в течение 7 суток (объем этанола превышает объем биологического материала в 10 раз);
2. после фиксации у эмбрионов удаляются внутренности;
3. после этого материал погружается в 1% раствор КОН для просветления мягких тканей на срок от 1 до 2 суток, в зависимости от размера и возраста эмбрионов;
4. когда закладки костей становятся видны, эмбрионы вынимаются из раствора и промываются водой;
5. после этого помещаются в раствор А (150 мл глицерина, 300 мл дистиллированной воды, 10 г КОН), к которому добавляют несколько капель раствора Б (1% раствор ализарина красного) до появления светло-фиолетового окрашивания. Через 3-5 суток окостеневшие участки скелета окрашиваются в красно-фиолетовый цвет.
6. для обесцвечивания мягких тканей эмбрионы переносят в раствор А на 7-14 дней;
7. затем их проводят через смеси глицерина, спирта и воды с целью обезвоживания: 1: 2 : 7 → 2 : 2 : 6 → 4 : 4 : 2 → этанол : глицерин (1 : 1) → чистый глицерин с добавлением 1-2 капель формалина;
8. полученные препараты хранят в чистом глицерине.

Полученные в результате гистологической обработки препараты были сфотографированы на цифровом фотоаппарате Nikon CoolPix 4500 с фотоокулярном $\times 4$, установленном на микроскопе МБС-1, при увеличении $\times 4$.

2.5 Установки, применяемые для исследования факторов космического полета и влияния газовых смесей

В эксперименте по изучению влияния факторов космического полета использовались фиксированные эмбрионы перепела, полученные после серии исследований ЭО-6 – ЭО-27 1990-1999 г. на ОК «Мир». Всего проведено 9 серий экспериментов, количество эмбрионов, зафиксированных на каждой ключевой стадии развития, превышает 30 штук. Некоторые эксперименты проводились совместно со Словакией и США. В частности, в результате многолетнего сотрудничества России и Словакии, у истоков которого стояли д.м.н. Е. Шепелев из Института медико-биологических проблем РАН и академик К. Бодя из Института биохимии

и генетики животных САН, был создан уникальный инкубатор (рисунок 2.4) для космических исследований [155].

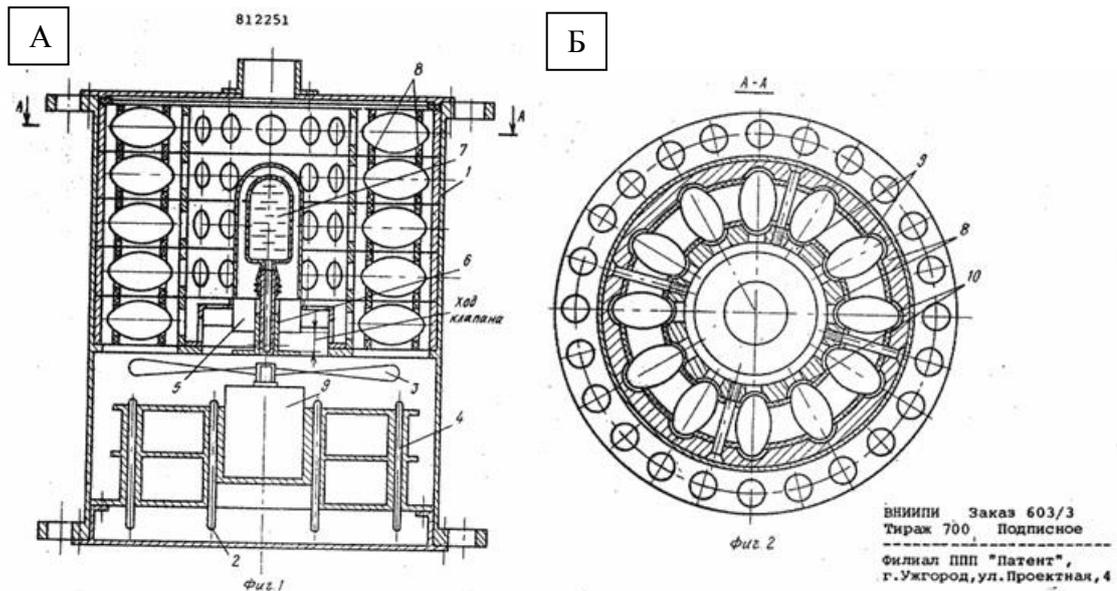


Рисунок 2.4. Принципиальная схема инкубатора, А - общий вид, Б - в разрезе: 1 - корпус с секциями для яиц, 2 - нагреватель, 3 - вентилятор, 4 - устройство автоматического регулирования влажности, 5 - электромагнит, 6 - клапан, 7 - резервуар для воды, 8 - кольцевые элементы, 9 - отверстия для яиц с пружинящими фиксаторами, 10 - яйца [155].

Оплодотворенные яйца японского перепела группы «Полет» доставлялись в специальном боксе в «Инкубатор-1М» (рисунок 2.5) на ОК «Мир» в течение нескольких первых дней развития, в то время как группа «Контроль» оставалась в инкубаторе на Земле. «Инкубатор-1М» был разработан на базе «Инкубатор-1», использованного в первом опыте с перепелиными яйцами в космосе в 1979 году на борту биоспутника «Космос-1129». Инкубатор представляет собой термостат, поддерживающий температуру $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, внутри обеспечивается постоянная влажность 64-80%, вентиляция, кроме того, воздушный поток поворачивает яйца в процессе инкубации, имитируя действия наседки, дважды в сутки снимаются показания температуры и влажности.

Особое значение в успехе космических экспериментов с перепелами имел личный вклад и заинтересованность в получении положительных результатов летчиков-космонавтов, капитанов экипажей, героев Советского Союза, полковников Анатолия Яковлевича Соловьева и Виктора Михайловича Афанасьева.

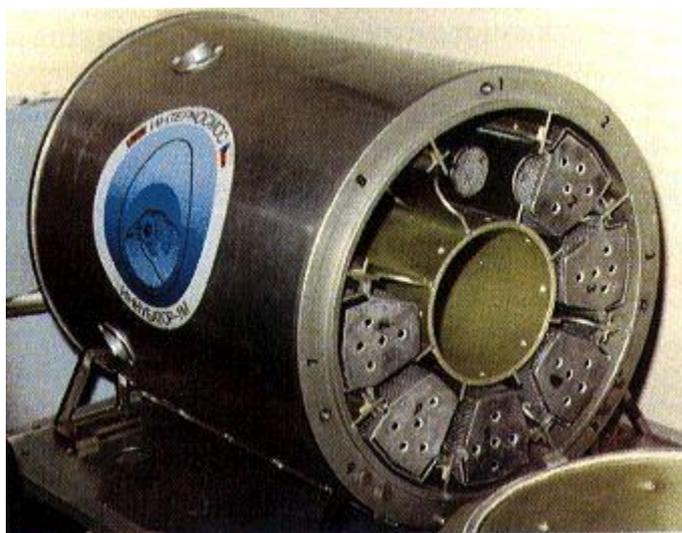


Рисунок 2.5. «Инкубатор-1М», доставленный на ОК «Мир» в 1989 г модулем «Квант-2» [143].

В ходе эксперимента яйца вскрывали в разное время (на 3-и, 7-е, 10-е и 14-е сутки инкубации) и проводилась предварительная оценка состояния эмбрионов. Полученный материал фиксировался в спиртоглицериновом растворе и доставлялся в лабораторию на Земле, где эмбрионы проходили сравнение с контрольной группой, оценивалась стадия развития, примерное время преждевременной гибели внутри яйца, если таковая случилась, внешнее состояние эмбриона, часть материала подвергалась анатомическим и гистологическим исследованиям.

В серии экспериментов с газовыми средами использовались гермобоксы со шлюзовыми камерами, изолированной системой подачи газов и инкубаторы с автоматической системой жизнеобеспечения (температура инкубации – $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, влажность – 40-70%) и поворотным механизмом для длительной инкубации яиц японского перепела в дыхательных газовых средах различного состава под различным давлением в ГВК-250, с возможностью контроля температуры, влажности и газового состава. Были проведены эксперименты по изучению эмбрионального развития перепела в воздушно-криптоновой среде в течение 17 суток.

Состав среды в боксах: а) $\text{O}_2=0.21 \text{ кгс/см}^2$ (3.5%), $\text{N}_2=0.78 \text{ кгс/см}^2$ (13%), $\text{Kr}=3.0 \text{ кгс/см}^2$ (83.5%); б) $\text{O}_2=0.22 \text{ кгс/см}^2$ (3.5%), $\text{N}_2\text{O}=1.0 \text{ кгс/см}^2$ (16.5%), $\text{N}_2=4.78 \text{ кгс/см}^2$ (80%). Во время проведения экспериментов с гипербарией избыточное давление создавалось за счет подачи криптона газообразного медицинского (ТУ 2114-007-39791733-2003, ООО «Акела-Н») и закиси азота. Давление в боксах составляло 5.0 кгс/см^2 .

2.6 Обработка результатов

В работе использовался компьютер с установленной на нем программой для получения изображения с акустического микроскопа: Unimic версия 2.27. Полученные изображения

обрабатывались в программе Adobe Photoshop версия CS3. Статистические исследования были проведены в программе Statistica версия 6.0.

Глава 3. Результаты

3.1 Разработка специализированных методов акустической микроскопии для исследования объектов биологии развития

3.1.1 Выбор вспомогательных средств для исследования биологических объектов

Как и любой новый класс объектов исследования, биологические объекты нуждаются в разработке специализированных научно-методических подходов и отборе вспомогательных средств, облегчающих сканирование исследуемых объектов. Это направление включает в себя оценку влияния на акустические параметры и качество получаемого изображения жидких сред, используемых в качестве иммерсионной среды, подложек, методов хранения и фиксации биологического материала, а так же анализ возможных артефактов, возникающих в связи с неоднородностью объектов и нелинейностью исследуемых образцов.

3.1.1.1 Иммерсионные среды

На основании данных из литературы и проведенных собственных измерений была составлена таблица 3.1, в которой представлены основные акустические параметры и плотность некоторых жидкостей и материалов, представляющих интерес для акустической микроскопии биологических объектов.

На основе анализа данных имеющихся измерений иммерсионной средой была выбрана вода. Далее во всех экспериментах в роли иммерсионной жидкости применялась дистиллированная вода комнатной температуры.

Зная акустический импеданс образца и иммерсионной жидкости, можно оценить количество ультразвукового излучения прошедшее внутрь и отраженное на границе раздела фаз. Исходя из данных об акустическом импедансе различных сред и объектов необходимо оценить влияние методики проведения эксперимента на качество получаемого изображения (таблица 3.1).

Стандартное проведение эксперимента с биологическими образцами включает в себя получение изображения структур за счет приема сигнала от подложки (рисунок 3.1А) [4]. Выбор материала подложки в этом случае оказывает влияние на качество получаемого изображения. Объект погружается в иммерсионную жидкость и располагается на жесткой подложке, в роли которой может выступать дно ванночки для сканирования, пластик или стекло. Так как мягкие ткани биологических и эмбриональных объектов по своим акустическим свойствам близки к воде, потери энергии на границе раздела минимальны и составляют порядка 0.3%.

Таблица 3.1. 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 $Z = \rho C$, $10^6 \text{ кг/(м}^2 \cdot \text{с)}$	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, [63]
скелетные мышцы	1540	1.10	1.694	собственные измерения
минерализованные ткани	4042	1.95	7.890	[130]
коллаген	1730	1.25	2.162	[63]
спинно-мозговая жидкость	1510	1.05	1.580	[130]
спирт	1180	0.80	0.890	[130]
формалин	1587	1.30	2.063	[10]

При использовании в виде подложки пластика количество энергии, вернувшейся в линзу, составляет 40.9%, а стекла – 63%, при учете водной прослойки между образцом и подложкой. Данный эффект достигается за счет разницы в коэффициенте отражения используемых материалов. Из чего следует, что использование 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.

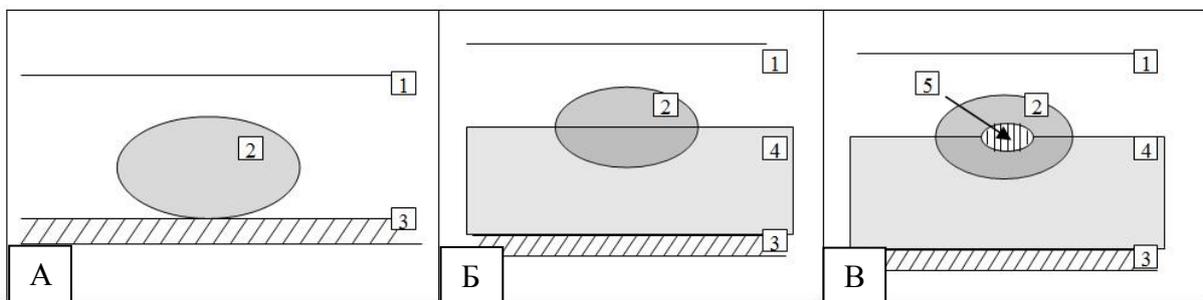


Рисунок 3.1. Постановка эксперимента с биологическими объектами. А – стандартная; Б – закрепление положения с помощью желатина; В – сложный биологический объект, закрепленный с помощью желатина: 1 – иммерсионная среда (вода); 2 – биологический объект; 3 – подложка (стекло); 4 – желатин; 5 – неоднородность внутри объекта (полость, скопление коллагена, минерализованная ткань).

Для эффективного проведения сканирования, необходимо закрепить положение объекта под акустической линзой во избежание случайных сдвигов, появления дополнительных артефактов и усложнения интерпретации полученных изображений. Одним из перспективных вариантов закрепления объекта является частичное погружение в 6% желатин (рисунок 3.1Б). Благодаря акустическим свойствам желатина, потери энергии на границе биологический объект-желатин составляют 0.3%, что практически не сказывается на качестве изображения, как и использование водной иммерсионной среды [63]. В результате количество энергии, вернувшееся в линзу, составляет 56.2%, что на 6.8% меньше, чем без использования желатина. Такое отклонение не является существенным, так как позволяет проводить эксперимент с меньшими погрешностями из-за сдвигов объекта.

Необходимо отметить, что все предыдущие расчеты проводились без учета внутренних неоднородностей биологического образца, таких, например, как полости, заполненные жидкостью, скопления коллагена или наличие минерализованных тканей (рисунок 3.1В). Оценим влияние этих неоднородностей на окончательное акустическое изображение (таблица 3.2).

Таблица 3.2. Изменение количества энергии, попавшее в линзу, в зависимости от структуры биологического образца.

Количество энергии, %	Однородный образец	С полостью, заполненной		
		жидкостью	коллагеном	костью
вернувшееся в линзу, после прохождения всего образца	56.2	56.1	53.1	6.5
отразившееся от неоднородности	-	0.1	1.4	41.7

В ходе эксперимента установлено, что наличие неоднородностей в толще образца изменяет качество полученного изображения. Артефакты в виде «акустических теней» появляются в случае высокого коэффициента отражения на границе с внутренними неоднородностями за счет значительно отличающихся акустических свойств данного включения от расположенной над ним части образца. Визуализация элементов структуры расположенных ниже «теней» невозможна. В случае присутствия неоднородностей, характеризующихся высоким акустическим импедансом, но недостаточным для образования «теней», часть зондирующего излучения проникает за границу неоднородности и позволяет принимать эхо-сигнал малой амплитуды от расположенных ниже элементов структуры. Структурные элементы, расположенные выше неоднородности, характеризуются высокими амплитудами отраженных сигналов.

Как было установлено по данным из литературы, применение химических фиксаторов изменяет акустические свойства биологических тканей. Кроме того, при использовании жидкой иммерсионной среды, часть фиксирующих веществ выходит в иммерсионную жидкость и изменяет ее акустические свойства. Энергия ультразвукового излучения, прошедшая внутрь образца рассчитывалась по формуле (2.2), а энергия отраженного сигнала по формуле (2.3).

На примере формалина было рассчитано, что количество энергии, вернувшееся в линзу при использовании данного фиксатора, уменьшится примерно на 1%, а этанола – на 9%, на основании таблицы 3.2.

3.1.1.2 Подложки

При получении изображений биологических образцов стандартным методом (П. 3.1.1.1), необходимо учитывать влияние используемых в эксперименте не только иммерсионных сред, но и подложек.

Для исследования акустических свойств различных подложек и сравнения их со свойствами биологической ткани было выбрано три образца материалов: стекло, пластик и желатин (рисунок 3.2). Образцы были измерены с помощью микрометра Medi-dent, а затем исследованы на акустическом микроскопе на предмет определения скорости звука в них (таблица 3.1).

Для проведения основной части эксперимента было важно определить, какая из подложек меньше всего вносит вклад в искажение полученных ультразвуковых изображений образца. Так как для образцов небольшого размера (от нескольких мм до нескольких см), как в нашем случае, возможно получение изображения всего объема образца, методом сдвига фокуса линзы по оси Z, задняя поверхность образца так же может быть исследована. Для определения разницы в качестве изображения были выбраны подложки с акустическим импедансом как в несколько раз превышающим акустический импеданс образца (стекло и пластик), так и сходным импедансом образца (желатин). Ввиду сродства скорости звука и акустического импеданса воды и мягких тканей образца граница раздела образец - подложка может рассматриваться как переход жидкая среда - твердая среда.

При изменении расстояния между твердой подложкой и линзой наблюдались следующие эффекты: при попадании в фокальную область подложки образовывалась затемненная полоса в области задней поверхности образца; при сдвиге линзы еще ближе к подложке и фокусировке в толще самой подложки задняя поверхность образца становится видна без затемнения, однако, большая часть сигнала теряется при двойном переходе границы раздела обводненный образец-твердое тело, а в самой подложке возникают множественные переотражения (рисунок 3.3А). Если же ультразвуковой пучок сфокусирован в толще образца не доходя до границы раздела, в

области контакта образца с подложкой возникают интерференционные кольца, также не позволяющие проанализировать образец.

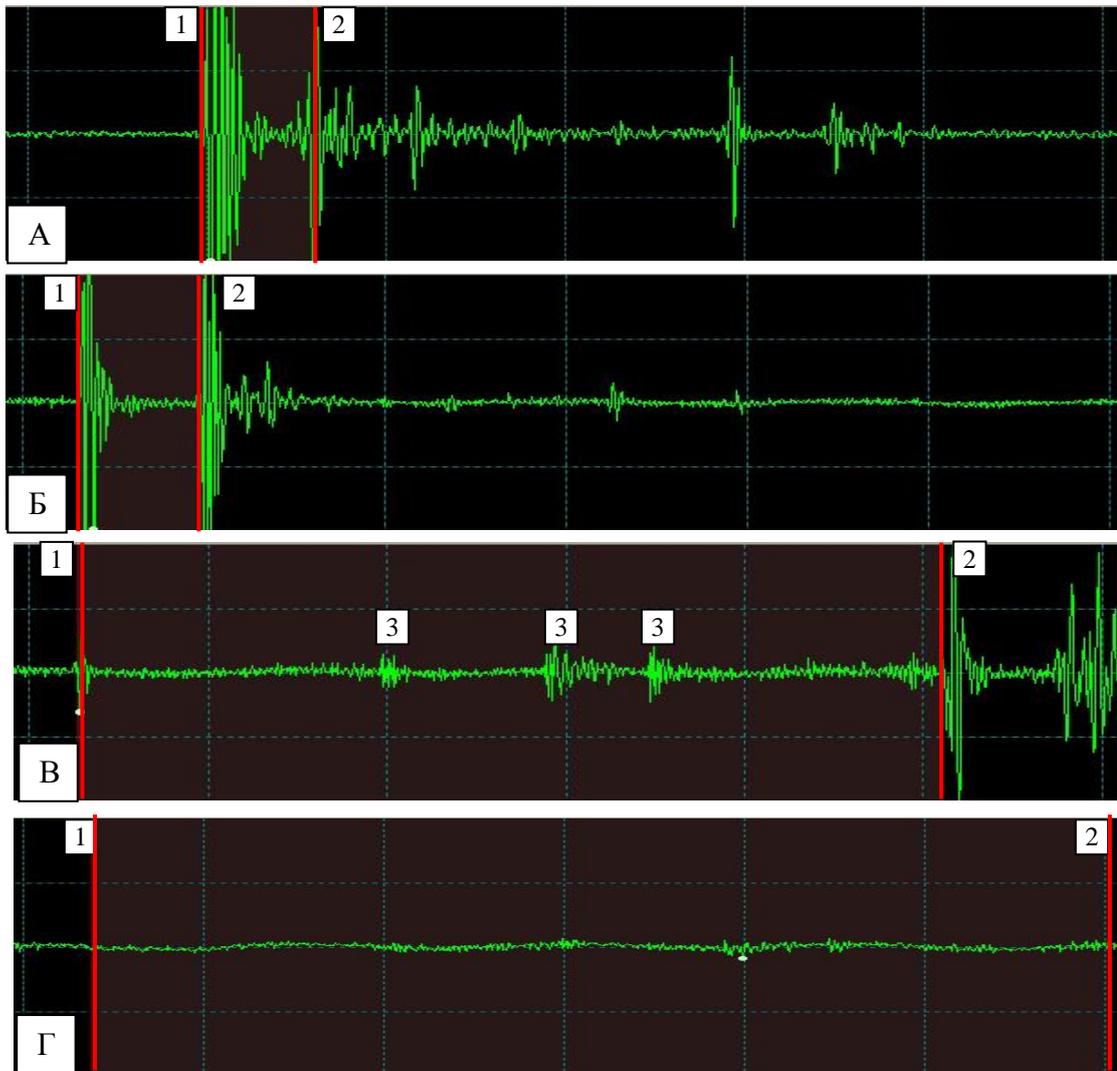


Рисунок 3.2. Сравнительные А-сканы различных подложек и образцов (цена деления шкалы - 1000 нс): а – стекло; б – пластик; в – желатин; г - образец мягких тканей перепела в районе брюшной полости: 1 – отражение от передней поверхности образца; 2 - отражение от задней поверхности образца; 3 – отражение от воздушных пузырьков в толще образца.

При использовании желатиновой подложки таких эффектов не наблюдалось. Граница образец-подложка четко видна (рисунок 3.3Б), но из-за сходных импедансов не наблюдаются перечисленные выше акустические эффекты. Также благодаря тому, что заливка образца в желатин происходит на воздухе, при погружении в иммерсионную жидкость ее диффузия под образец происходит достаточно медленно, что позволяет исключить эффект от прослойки воды между образцом и подложкой. Однако при приготовлении желатина и заливке образца, в толще желатина могут появляться пузырьки воздуха (рисунок 3.2.В), обладающие высоким акустическим контрастом.

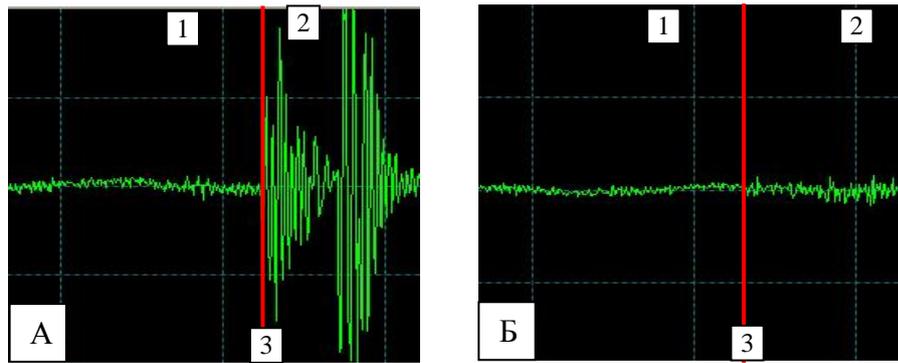


Рисунок 3.3. Сравнительные А-сканы образцов, находящихся на разных подложках (цена деления шкалы - 1000 нс): А – образец на стекле, Б – образец на желатине; 1 - образец; 2 – подложка; 3 – граница двух сред.

К сожалению, в большинстве источников литературы данные о влиянии подложки на качество получаемых изображений основаны на экспериментах с клетками или клеточными культурами, т.е. образцами очень малого размера, а основные расчеты проводились с использованием моделей и приближений. При таком подходе правильнее учитывать вклад подложки для усиления сигнала, вернувшегося в линзу. Однако в нашем случае образец слишком велик и может обладать определенной гетерогенностью, что само по себе усложняет процесс исследования. Сигнал, вернувшийся от подложки с большим акустическим импедансом и переотраженный от неровностей и включений в образце, приведет к появлению дополнительных шумов и артефактов на изображении. При этом толщина желатиновой подложки превышала 1 см (была сравнима с размером образца), что так же позволяло избежать сигналов от дна емкости, в которой производится сканирование. Весь этот комплекс методик исследования позволяет уменьшить количество шумов и сделать получаемое изображение четче.

Кроме того, как будет показано ниже, желатин не только играет роль удобной для получения качественных изображений подложки, но и мягко фиксирует образец под акустической линзой.

3.1.1.3 Закрепление положения объектов

Одним из основных требований к проведению экспериментов с биологическими объектами является неподвижность исследуемого объекта. При движении линзы в иммерсионной жидкости возникают возмущения, смещающие и разворачивающие объект, что искажает полученные изображения и затрудняет интерпретацию данных. На рисунке 3.4 показано сравнение изображений при разных вариантах позиционирования объекта во время сканирования. На рисунке 3.4А показано изображение головного мозга японского перепела с

дорсальной стороны при достаточной фиксации положения объекта. Все структуры мозга симметричны и анализ его анатомического строения не представляет сложности. На рисунке 3.4Б объект был сдвинут в процессе сканирования, из-за чего левый край головы опустился, а правый поднялся относительно плоскости сканирования и все структуры искажены. Анализ расположения структур головного мозга, а так же определение их линейных размеров в данном случае затруднено.

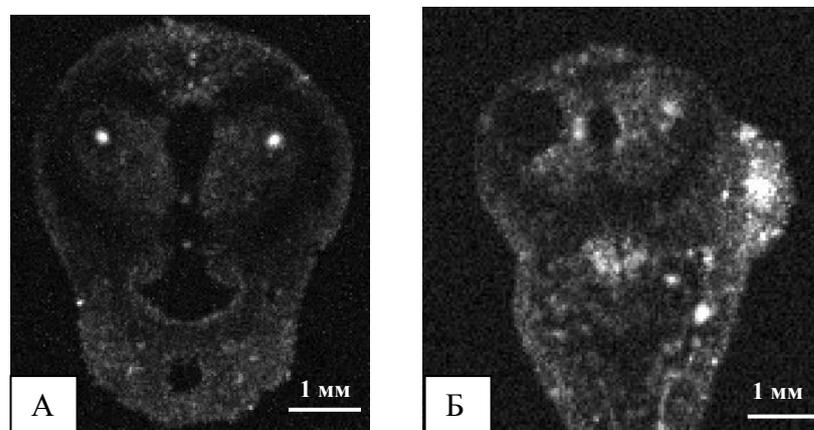


Рисунок 3.4. Позиционирование объекта на примере С-сканов головы перепела, 7 сутки развития, с дорсальной стороны: А - правильное расположение объекта при сканировании (глубина 2193 мкм, толщина 144 мкм); Б - сдвиг объекта в процессе сканирования (глубина 2060 мкм, толщина 150 мкм).

В материаловедении фиксации объектов на предметном столике не уделяется большого внимания, используются любые доступные методы. Рассмотрим их с позиции применимости к биологическим объектам:

1. крепление металлическими скобами к пробковому основанию;
2. крепление металлическими или проволочными скобами к пластилиновой основе.

Недостатками таких методов являются:

- затраты времени на прикрепление объекта непосредственно перед сканированием;
- необходимость каждый раз заново подбирать конфигурацию петель в соответствии с геометрическими формами объекта;
- в области крепления ультразвук отражается сильнее и под ним на изображениях появляется «акустическая тень» - гипоэхогенная область, затрудняющая визуализацию;
- незакрепленные части объекта могут смещаться во время сканирования;
- благодаря плавучести пробковой основы в иммерсионной жидкости, требуется дополнительное закрепление ее в кювете;

- жесткая фиксация с помощью металлических скоб и пластилина может повредить хрупкие и обводненные ткани эмбриона, особенно при проведении прижизненных исследований.

3. крепление пластилином к пластилину:

- А) к плоской поверхности;
- Б) создание специальных выемчатых форм.

Недостатки:

- экранирование ультразвука пластилиновыми креплениями;
- пластилин не держит увлажненные объекты;
- для каждого ракурса получаемых изображений необходимо создавать отдельные пластилиновые формы;
- сам по себе пластилин так же обладает плавучестью в воде и требует дополнительного закрепления в кювете;
- красящие пигменты, а так же примеси, содержащиеся в пластилине, обладают токсичностью, что может привести к изменениям в нефиксированных тканях эмбриона и оказать негативное влияние при проведении исследований *in vivo*.

В связи со всеми вышеперечисленными сложностями, появилась потребность в поиске новых методов закрепления объектов при сканировании.

Определенный интерес в данном поиске представлял пищевой желатин, т.к. по данным из литературы и собственным расчетам, приведенным ранее, при использовании концентраций раствора желатина от 3 до 20% скорость звука в нем практически не отличается от скорости звука в воде [63]. Это позволяет фиксировать в нем объект и при последующем сканировании не приводит к искажению или потере данных. В данной работе желатин будет рассматриваться как подложка с возможностью фиксации в нем объекта. Основной задачей являлся подбор таких температурных условий приготовления желатина, а также соотношения сухого желатина и воды при приготовлении раствора, чтобы обеспечивалось быстрое застывание раствора, в процессе застывания желатин удерживал, но не сминал объект, не происходило преждевременного растворения желатина в иммерсионной жидкости в процессе сканирования и после сканирования желатин легко счищался с объекта исследования.

В процессе сравнения разных температурных режимов и концентраций желатина были установлены оптимальные для данных целей условия приготовления.

Приготовление препаратов в 6% растворе желатина.

1. пищевой желатин готовится по инструкции:

- a. 0.9 г желатина залить 6 мл холодной воды и оставить для набухания на 10 мин;
 - b. в разбухший желатин при помешивании влить 6 мл кипящей воды и раствор поместить на водяную баню на 10 мин;
 - c. когда весь желатин растворится в воде и раствор станет полностью прозрачным, желатин разлить по двум чашка Петри (диаметр 40 мм) так, чтобы чашки были заполнены желатином полностью или на глубину более чем 1 см, если используются емкости другого размера;
2. раствор оставить застывать при комнатной температуре. Процесс занимает 30 мин. Для ускорения процесса желатин можно охладить до $+5^{\circ}\text{C}$, при таких условиях процесс застывания займет 9 мин. Степень застывания проверяется по одной из чашек, которая не участвует в эксперименте и присутствует только для контроля;
 3. через 30 мин после заливки в экспериментальную чашку помещается объект исследования.

В зависимости от состояния и геометрии, объект может быть погружен в желатин полностью, и при сканировании он будет располагаться в толще желатина, или частично, тогда при сканировании желатин будет фиксировать только нижнюю часть объекта.

Полное погружение объекта имеет практическое значение при исследовании биологических объектов с патологиями, такими как некроз, отек и нарушение межклеточных контактов, когда ткани теряют свою упругость и могут распасться без дополнительной фиксации (рисунок 3.5).

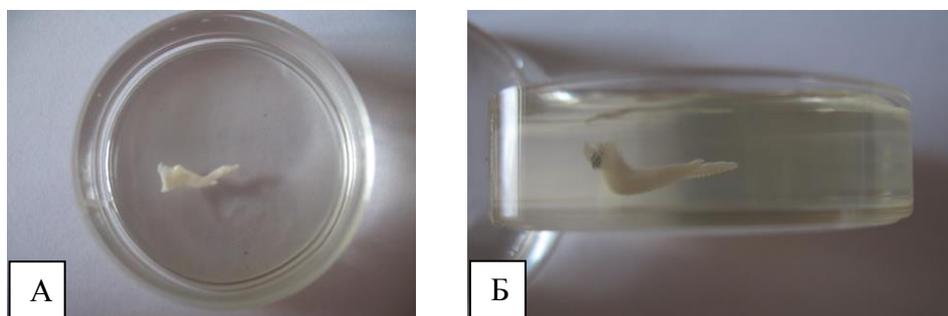


Рисунок 3.5. Заливка в желатин объектов с полным погружением на примере крыла японского перепела на 10-е сутки развития: А – вид сверху; Б – вид сбоку.

Частичное погружение в желатин используется в данной работе для крупных объектов, таких как целые эмбрионы или нормальные ткани и органы (рисунок 3.6).

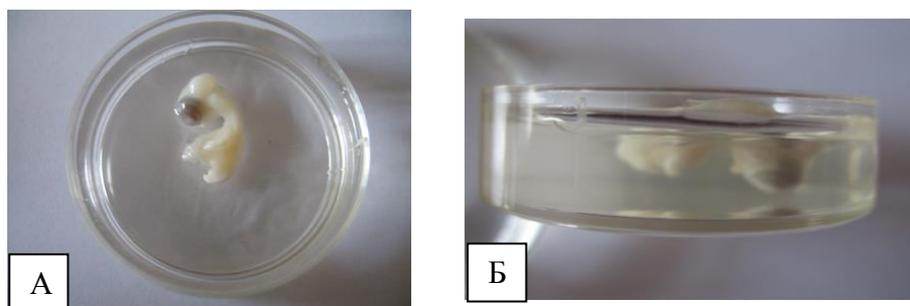


Рисунок 3.6. Заливка в желатин объектов с частичным погружением на примере эмбриона японского перепела на 6-е сутки развития: А – вид сверху; Б – вид сбоку.

Для эмбрионов птиц на ранних стадиях развития (от оплодотворения до органогенеза) зародышевый диск достаточно расправить на поверхности незастывшего желатина, что обеспечит его неподвижность при сканировании и не повредит хрупкие ткани эмбриона (рисунок 3.7). При этом важно следить, чтобы между зародышевым диском и желатином не попал воздух.

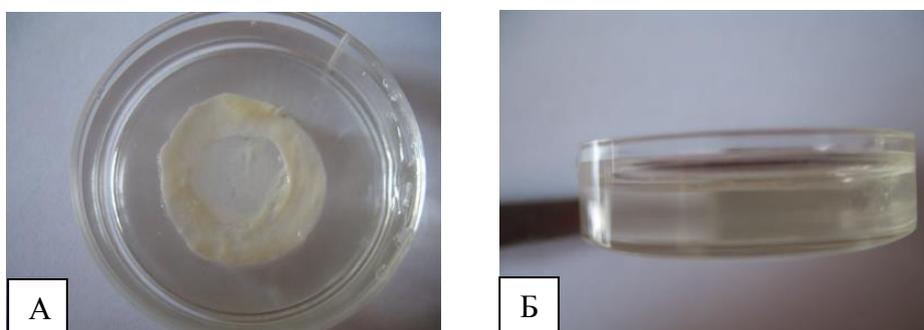


Рисунок 3.7. Крепление объекта на поверхности желатина на примере эмбриона японского перепела на 1-е сутки развития: А – вид сверху; Б – вид сбоку.

Важно отметить, что уже на данном этапе выбирается расположение объекта под акустической линзой и оси сканирования.

4. после позиционирования и фиксации объекта в желатине, желатиновый раствор оставляют до полного застывания, при комнатной температуре на 30 мин, при охлаждении до $+5^{\circ}\text{C}$ на 9 мин. Степень застывания желатина проверяется по контрольной чашке.
5. после полного застывания желатина чашку с объектом необходимо поместить в ванночку, наполненную иммерсионной жидкостью и ванночку установить под линзой микроскопа.
6. желатиновый пласт при необходимости можно аккуратно извлечь из емкости и сканировать без нее.

Таким образом, при использовании желатин:

- фиксирует объект, обеспечивая его неподвижность во время сканирования;
- может использоваться *in vivo*;
- легко удаляется с кожных покровов после проведения эксперимента;
- может быть приготовлен на изотоническом растворе, что препятствует развитию осмотических нарушений у объекта исследования;
- при использовании желатина могут возникнуть трудности при применении воды в качестве иммерсионной среды, т.к. будет происходить набухание желатина. Экспериментально показано, что в первые 5-10 минут контакта с водой существенных изменений в 6% желатине не происходит [63].

3.1.1.4 Интерпретация полученных данных, с учетом возможных артефактов

Интерпретация акустических изображений – одна из сложнейших проблем акустической микроскопии. Трудности интерпретации обусловлены, прежде всего, сложностью физических процессов взаимодействия акустической волны с веществами различной природы и химического состава. Например, при формировании акустического изображения на базе интенсивности отраженного сигнала, на величину интенсивности может повлиять не только плотность и упругость вещества в области прохождения сигнала, но и особенности его отражения, преломления, рассеяния или поглощения. В таком случае на изображениях могут появиться артефакты - искажения формы или размеров структурных элементов.

Важной является и форма самих исследуемых объектов. На примере сферических и цилиндрических образцов из металлов и полимеров было показано, что ультразвуковые сигналы большей частью отклоняются от выпуклой поверхности. Этот феномен делает невозможным точное получение и регистрацию отраженной ультразвуковой энергии акустической линзой ввиду ее частичной или полной потери. Результаты, полученные совместно с помощью акустической и оптической микроскопии, показывают, что в отличие от металлических или полимерных образцов, биологические объекты, имеющие выпуклую форму с гладкой поверхностью, дают акустические изображения с видимой внутренней структурой, которые хорошо согласуются с реальными данными. Так же было установлено, что когда фокусированный пучок ультразвука перпендикулярен выпуклой поверхности объекта, достигается наименьшее искажение данных о слоях, расположенных внутри образца. Величина интенсивности отраженного ультразвукового сигнала наиболее высока в случае, когда отражающая поверхность находится в фокальной плоскости линзы. В случае, когда на поверхности объекта присутствуют неровности (ямки, бугорки и т.п., сравнимых по величине с длиной волны или превышающих ее), участки поверхности, находящиеся вне зоны фокуса, на акустическом изображении будут отражены темными областями. На величину интенсивности

принятого линзой сигнала большое влияние оказывает рассеяние на неровностях поверхности, являющееся одной из причин затухания. Неровность поверхности может обусловить искажение геометрической формы внутренних дефектов или структур.

На рисунке 3.8 приведены основные типы искажений, которые могут возникать в результате переотражения на внутренних неоднородностях и структурах, в результате преломления на границах разнородных материалов. Если граница раздела между тканями хорошо отражает ультразвук, прохождение луча может полностью прерываться, и дистальнее образуется так называемая «акустическая тень». Для затухания ультразвукового луча размер отражающей поверхности должен быть равным ширине ультразвукового луча или больше. Если объект меньше ширины ультразвукового луча, то волны огибают его, и на экране проецируются ткани, находящиеся дистальнее. Акустическая тень, формируется не только от костной ткани и пузырьков воздуха, но и от плотных, чаще всего соединительнотканых образований.

При отражении от наклонной поверхности часть сигнала (а при больших углах падения и весь сигнал) может просто не попасть в апертуру линзы, из-за чего интенсивность принятого сигнала снижается и иногда доходит до полного исчезновения. Кроме того, все коэффициенты преломления и отражения зависят от угла падения; следовательно, амплитуда отраженного сигнала зависит не только от механических свойств, но и от топологии поверхности.

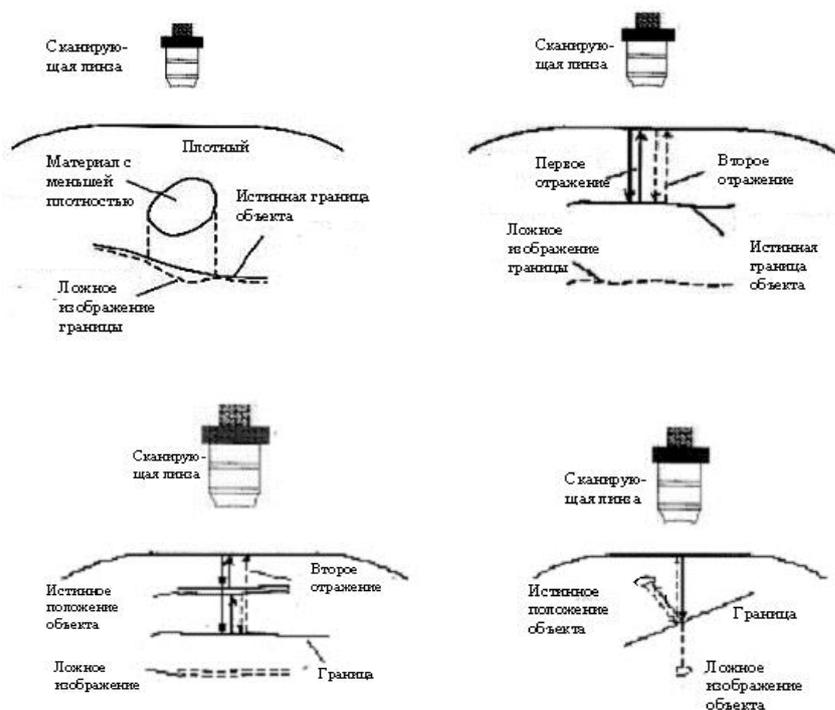


Рисунок 3.8. Основные типы искажений, которые могут возникать благодаря переотражениям на внутренних неоднородностях и структурах, в результате преломления на границах разнородных материалов.

При этом если поверхность образца имеет наклон относительно линзы, могут возникать переотражения в объекте, выглядящие как чередование темных и светлых полос.

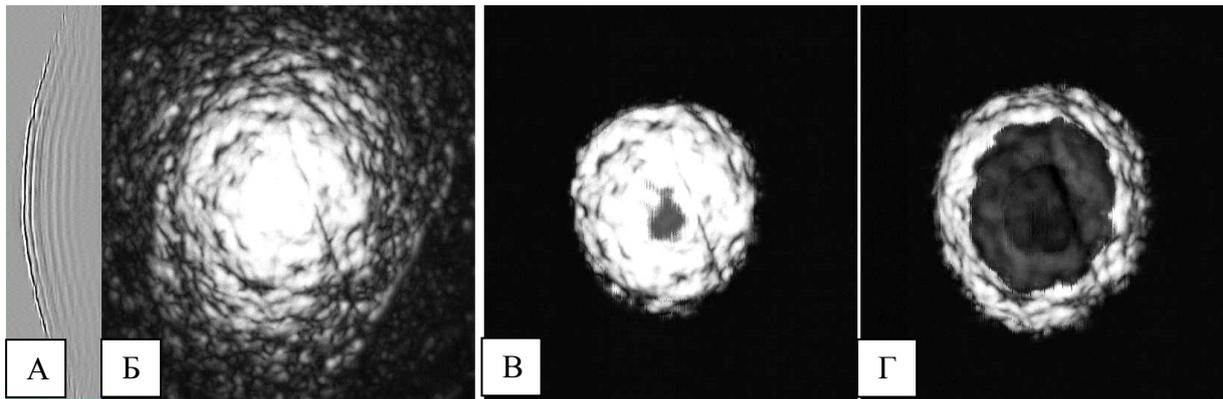


Рисунок 3.9. Акустические изображения скорлупы яйца перепела (частота 50 МГц, размер изображения 10×10 мм): А – В-скан на глубине 2 мкс от поверхности; Б – С-скан, акустические ворота 2 мкс; В – С-скан под поверхностью скорлупы, на глубине 0.1 мкс, акустические ворота – 0.12 мкс; Г – С-скан на глубине 0.2 мкс от поверхности, акустические ворота – 0.1 мкс.

Для того чтобы понять, являются ли получаемые в таких случаях вариации темного и светлого на акустическом изображении результатом неровности поверхности, или же это – отображение реальных различий механических свойств поверхности – необходимо получить несколько акустических изображений в данном участке, меняя расстояние между акустической линзой и поверхностью образца. В случае различий акустических импедансов (и, соответственно, механических свойств) картина будет сохраняться, лишь ее яркость и контрастность будут меняться. Если же это артефакт, обусловленный неровностью, то полосы будут перемещаться в различных направлениях. На рисунке 3.9 на примере скорлупы яйца перепела рассмотрено подобное явление. В результате перемещения области сканирования вглубь объекта, становится ясно, что получаемые изображения не являются артефактом и в центре С-скана на рисунке 3.9 В, Г видна полость яйца под скорлупой.

При исследовании внутренних структур сложной геометрической формы следует обращать внимание на то, что на акустических изображениях, так же как и на гистологических срезах, они могут быть представлены в различных проекциях в зависимости от их расположения относительно плоскости пласта, «срезанного» акустическими воротами (рисунок 3.10).

Исходя из того, что ультразвуковой луч в фокальной области имеет наименьший диаметр, относительная интенсивность звука на единицу площади в этой области больше, чем в любом другом месте. Сигналы, идущие из этой области, имеют большую интенсивность, чем от аналогичных тканевых поверхностей в другой области ультразвукового луча.

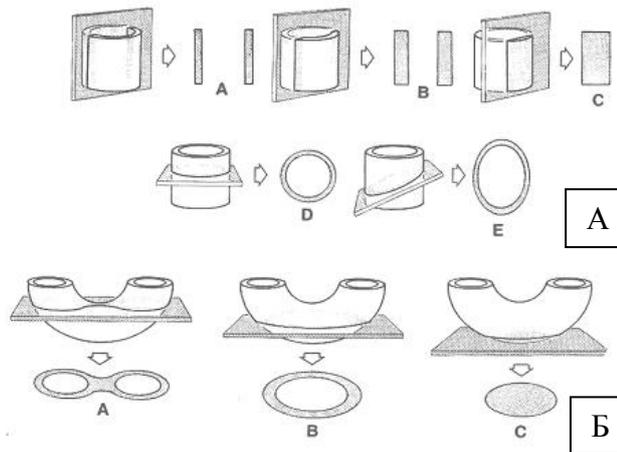


Рисунок 3.10. Проекция возможных срезов на примере геометрических образцов: А – цилиндрических; Б – изогнутых трубчатых.

Для предотвращения появления данного артефакта при исследовании эмбриональных тканей, после проведения сканирования и получения изображения в фокусе линзы, необходимо сместить ее по оси Z и получить повторное изображение. Скорость звука в мягких тканях эмбриона приблизительно равна скорости звука в воде, следовательно при передвижении линзы относительно вертикальной оси по направлению к эмбриону получаемое изображение не будет сильно искажаться.

3.1.2 Влияние состояния объектов на полученные результаты

3.1.2.1 Влияние фиксаторов

Как было показано ранее, добавление химических фиксаторов изменяет свойства иммерсионной среды. Однако наиболее заметные необратимые изменения происходят в самих тканях образца. Для определения количественных изменений, происходящих в тканях, выявления качественных изменений акустических изображений, а так же для оценки перспектив использования акустического микроскопа для исследования предварительно фиксированных эмбрионов, часть эмбрионов была подвергнута фиксации в различных фиксирующих смесях.

Эмбрионы, зафиксированные в предыдущем эксперименте, также были частично использованы для проведения классических гистологических исследований для более точной интерпретации полученных акустических изображений. Для определения оптимальных фиксаторов, а также для анализа изменения скорости звука в тканях в зависимости от фиксатора была проведена дополнительная серия опытов.

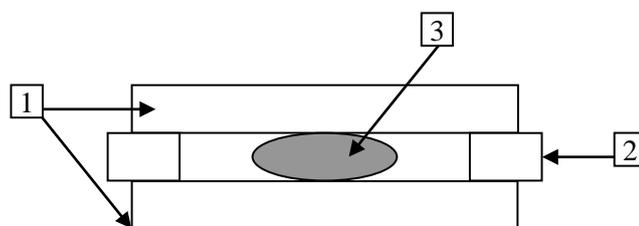


Рисунок 3.11. Камера для измерения скорости звука: 1 – стекла-основы, 2 – стекло-вставка, 3 – исследуемый образец.

В специально сконструированную камеру помещался образец для исследования (рисунок 3.11). Для контроля скорости звука в камере был выбран образец чистой воды. По табличным данным скорость звука в чистой воде составляет 1509 м/с [11]. Полученная расчетная скорость звука (1508.5 ± 9.1) м/с.

После определения скорости звука в воде была проведена серия экспериментов с биологическими тканями. В данной серии опытов были взяты эмбрионы перепела на седьмые сутки развития (23-24 стадия). Эта стадия была выбрана, т.к. для данной экспериментальной работы она является промежуточной. Экспериментальные животные на разных стадиях развития обладают разной степенью дифференцировки, компактизации и обводненности тканей, начиная со стадии нейруляции и заканчивая 11-ыми сутками развития, когда эмбрион полностью сформирован, прошли процессы остеогенеза и образовался перьевой покров.

Таблица 3.3. Измерение скорости звука C в образцах тканей эмбриона перепела в интактном состоянии и при использовании фиксирующих смесей.

	Живой образец	Образцы, после применение гистологических фиксаторов			
		этанол 96%	формалин 40%	формалин 40% + этанол 96%	ФСУ
C , м/с	1536 ± 10	1793 ± 10	1714 ± 20	1608 ± 20	1657 ± 10
Увеличение скорости звука по сравнению с живым объектом, %		16.7%	11.6%	4.7%	7.9%

Образцы мягких тканей объемом примерно 1 см^3 , полученные от семидневного эмбриона помещались в различные фиксаторы на сутки, после чего производилось измерение скорости звука в образцах в специальной камере (рисунок 3.11). При этом образец плотно прижимался стеклами-основами, что позволяло рассматривать его как плоскопараллельный.

Для эксперимента были выбраны стандартные гистологические фиксаторы: 96% этанол; 40% формалин; формалин 40% : этанол 96% (1:1); формалин 40% : этанол 96% : ледяная

уксусная кислота (9:3:1) или ФСУ. Для контроля был взят образец ткани живого эмбриона в интактном состоянии. Полученные данные приведены в таблице 3.3.

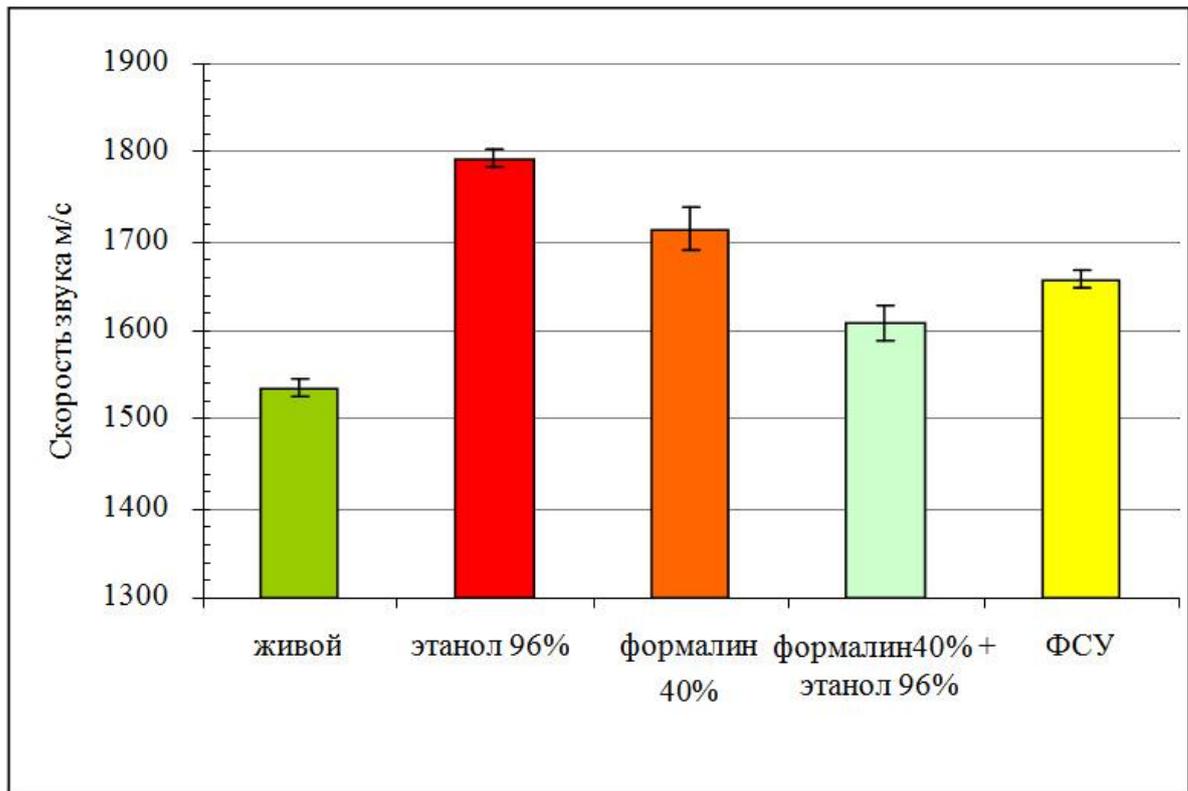


Рисунок 3.12. График изменения скорости звука в образце ткани, в зависимости от используемого фиксатора.

Изменение скорости звука в зависимости от используемого фиксатора показаны на рисунке 3.12. По полученным данным было установлено, что наименьшие изменения в тканях эмбрионов перепела вызывает смесь этанола и формалина (формалин 40% : этанол 96% / 1:1), при этом скорость звука по сравнению с живыми объектами возрастает только на 5%.

3.1.2.2 Патологическое развитие и некрозы

Для дальнейших исследований также было необходимо выяснить, каким образом влияют на скорость звука некротические изменения в тканях, т.к. практически невозможно установить время гибели эмбриона внутри яйца в ходе эксперимента только по внешним признакам. Количественные характеристики помогут определить это время более точно. Для этого яйца вскрывались, а эмбрионы помещались в физиологический раствор на 2-4 суток при комнатной температуре, затем фиксировались в ФСУ, после чего проводилось измерение скорости звука в специальной камере, как и в предыдущем эксперименте. Контрольный образец фиксировался в ФСУ сразу после вскрытия яйца. Полученные результаты заносились в таблицу и проводилось сравнение с нормой (таблица 3.4).

Таблица 3.4. Измерение скорости звука C в образцах тканей эмбриона перепела при использовании ФСУ в качестве фиксатора.

сроки фиксирования образцов	сразу после вскрытия	на 2-е сутки	на 4-е сутки
C , м/с	1660±10	1610±10	1600±10

Полученные данные показаны на рисунке 3.13. Установлено, что на скорость звука оказывают влияние некротические изменения в тканях, на 2-е сутки после смерти скорость падает на 3%, а на 4-е – на 4%.

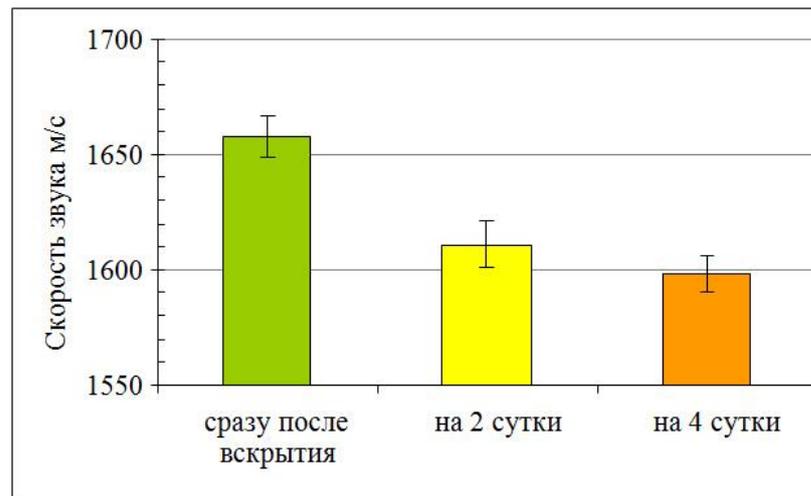


Рисунок 3.13. График изменения скорости звука в образце ткани с течением времени, после фиксации в ФСУ.

3.2 Исследование эмбриональных объектов *in vivo*

3.2.1 Нормальное развитие нефиксированных эмбрионов японского перепела (*Coturnix coturnix japonica* dom.) по данным акустической микроскопии

3.2.1.1 Особенности формирования акустических изображений эмбрионов японского перепела на ранних стадиях развития (1-4 сутки)

Раннее развитие характеризуется сравнительно малым размером тела эмбриона - до нескольких мм. Для контроля интерпретации акустических изображений были проведены дополнительные гистологические исследования, в ходе которых для стадий раннего развития были изготовлены тотальные препараты, позволяющие более точно определить отдельные структуры эмбрионов.

Сканирование зародышевого диска проводилось с дорсальной стороны. На акустическом изображении эмбрион выглядит однородным образованием, и по сравнению с *area pellucida*

более плотным. При получении изображений определенные трудности были с обнаружением зародыша на самом зародышевом диске.

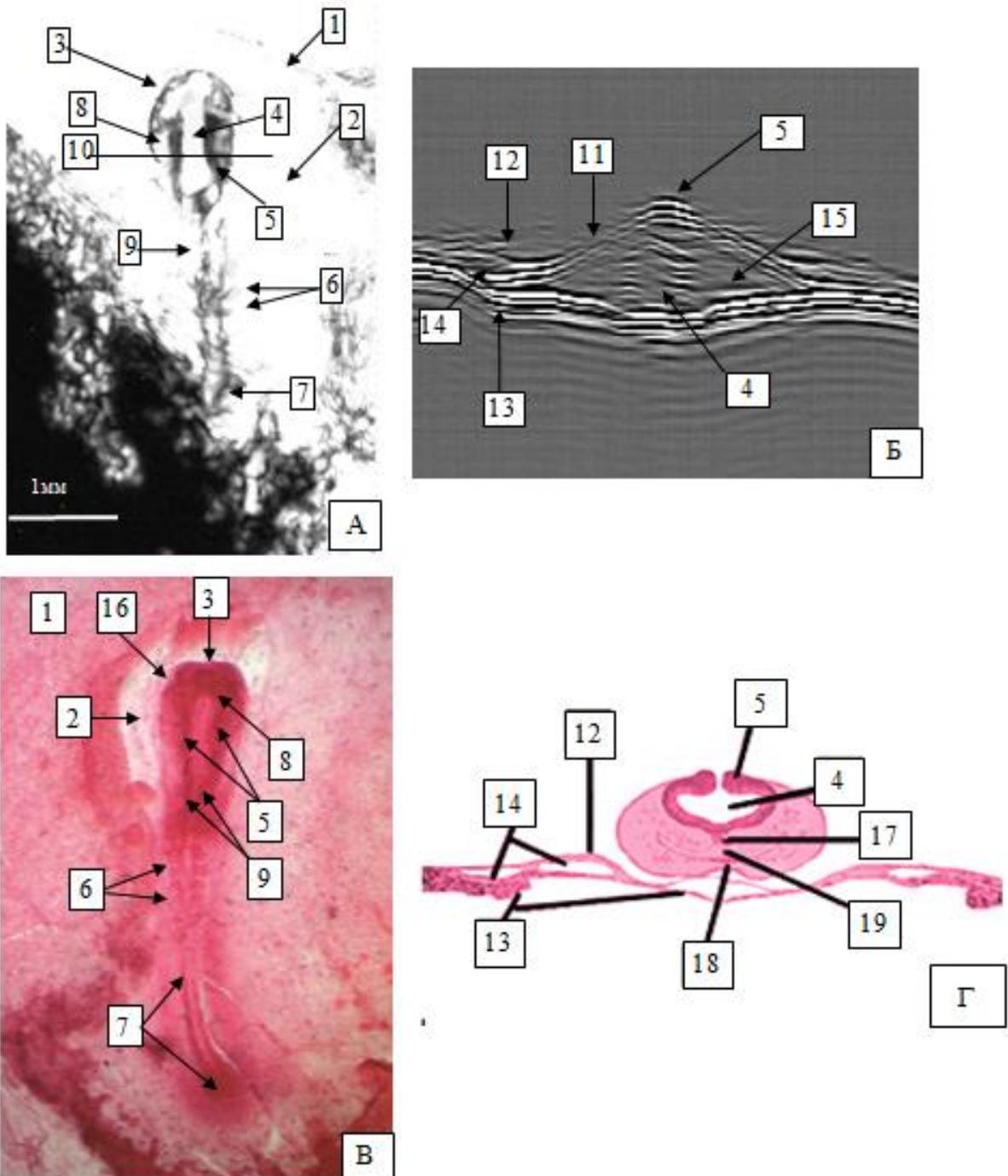


Рисунок 3.14. А, Б - Акустические изображения эмбриона перепела 1-е сутки развития (А – С-скан: акустические ворота: 155 мкм, сразу от поверхности; длина зародыша – 3.5 мм; ширина головной складки – 1 мм; Б – В-скан); В, Г – оптические изображения эмбриона перепела 1-е сутки развития: 1 – агеа ораса (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.

С этой целью специально проводилось В-сканирование (рисунок 3.14Б), т.к. эмбрион на этой стадии уже выступает над поверхностью зародышевого диска благодаря формированию головной складки, которая впоследствии отделит эмбрион от желтка.

Кроме того, акустический контраст в районе головной складки обусловлен скорее не различием упруго-механических свойств ткани, а появлением объема и многослойности. Наличие неровностей, превышающих длину волны приводит к тому, что часть ультразвуковой энергии, отразившейся на отдельных участках поверхности или внутренних границах раздела, располагающихся под углом, будет отражена таким образом, что не попадет в акустическую линзу при регистрации сигнала. Соответственно такие области в головной складке будут выглядеть более темными на акустических изображениях (рисунок 3.14А).

Трактовка данных, представленных на В-скане, обычно бывает затруднительной, однако, благодаря простоте и симметричности структур в первые сутки развития, а так же из-за приобретения объема зародышевого диска в месте формирования эмбриона, полученные В-сканы обладают достаточной информативностью и помогают сориентироваться относительно расположения зародыша. Кроме того, В-сканы как и гистологические препараты дают достаточно точное представление о расположении основных структур зародыша, хорошо идентифицируемых на В-сканах. Толщина зародыша в этой области составляет 280 мкм. Данная стадия имеет решающее значение для экспериментальной эмбриологии, т.к. становится возможным воздействовать непосредственно на зародыш, а так же проводить эксперименты с изменением внешних условий. По мере развития (дифференцировки тканей и формирования органов) эмбрион приобретает объем, что затрудняет трактовку полученных изображений по одному единственному С-скану, т.к. при получении С-скана с большими акустическими воротами (более 300 мкм) происходит наложение акустических изображений, а при установке акустических ворот около 100 мкм – все исследуемые части эмбриона не попадают в заданный интервал (рисунок 3.15Б).

Для более поздних стадий применялся метод послойного сканирования. Т.е. С-сканы получали в несколько этапов, последовательно сдвигая линзу по оси Z с шагом 200-400 мкм, благодаря чему все органы и структуры эмбриона последовательно попадали в фокальную область.

Кроме того, с появлением объема следует обратить внимание на ракурс «акустического сечения» объекта при визуализации сферических и цилиндрических структур. Так на рисунке 3.15Б показан срез спинного мозга и на один и тот же скан попало изображение как поверхности мозга, так и его полости. В данном случае трактовка С-скана не представляет особой сложности благодаря тому, что строение эмбриона еще достаточно простое. Однако на более поздних стадиях, при возникновении затруднений интерпретации полученных

изображений возможно проведение дополнительного эксперимента и получение С-сканов с изменением положения объекта относительно акустической линзы: дорсальной или вентральной стороной вверх. Так же на поздних стадиях целесообразно получать акустические изображения отдельных органов с разных позиций, что существенно ускорит процесс сканирования и поможет избежать ошибки в трактовке данных.

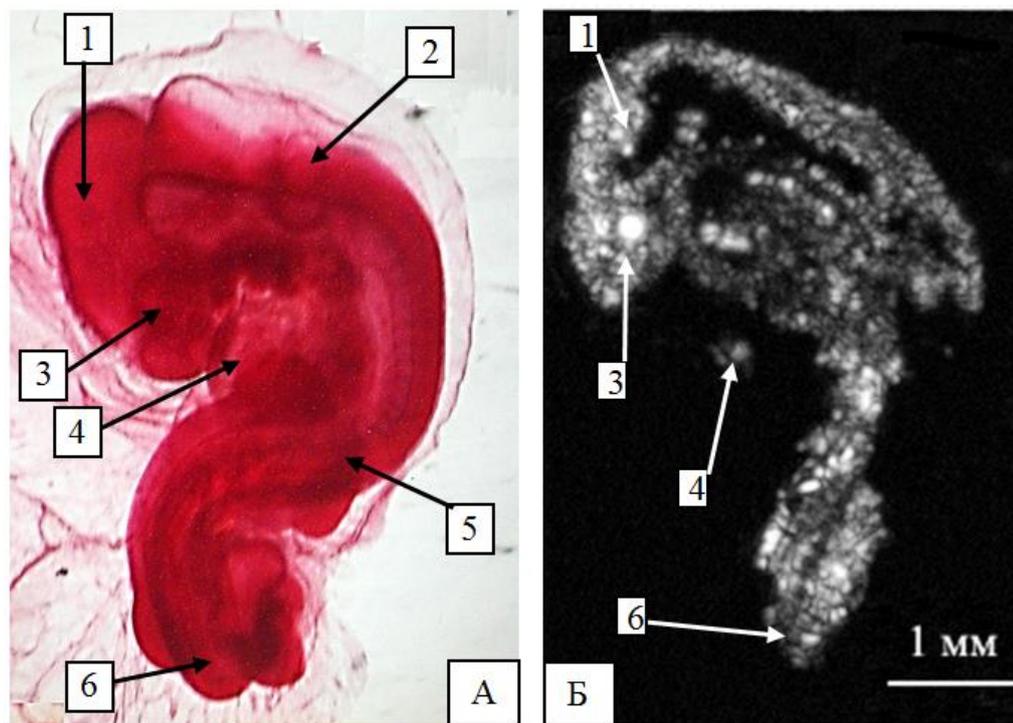


Рисунок 3.15. Сравнение оптического (А) и акустического (С-скан) (Б) изображения эмбриона (глубина 433 мкм, толщина 115 мкм) на 2-е сутки развития: 1 – головной мозг, 2 – слуховая капсула; 3 – глаз; 4 – сердце; 5 – передние кишечные ворота; 6 – хвостовая почка.

Например, на 2-е сутки происходит активное формирование головного мозга. Темные области в головной части эмбриона на акустическом изображении указывают на расположение в этой части пустот, что соответствует полостям трех мозговых пузырей (рисунок 3.15А). В то же время, начинается рост глазных пузырей. Благодаря тому, что эти области имеют округлую форму и выступают над поверхностью зародыша – на акустических изображениях они выглядят светлыми (рисунок 3.15Б). В остальном, эмбрион выглядит однородным, без областей с ярко выраженным акустическим контрастом. Благодаря тому, что изображения получаются методом установки акустических ворот на представляющий интерес глубине в толще зародыша, возможно возникновение артефактов как на рисунке 3.15Б, когда зачаток сердца в виде трубки, выглядит не соединенным с телом участком. Это связано с тем, что сердечная трубка является объемной структурой и выступает над телом, в то время как место соединения с телом находится несколько ниже и не попадает в область выбранных акустических ворот. Оптическая

микроскопия позволяет подтвердить расположение сердца, что было затруднительно сделать с помощью одного С-скана.

На 3-и сутки развития продолжается дифференцировка тканей, что позволяет выявить дополнительные детали на акустических изображениях.

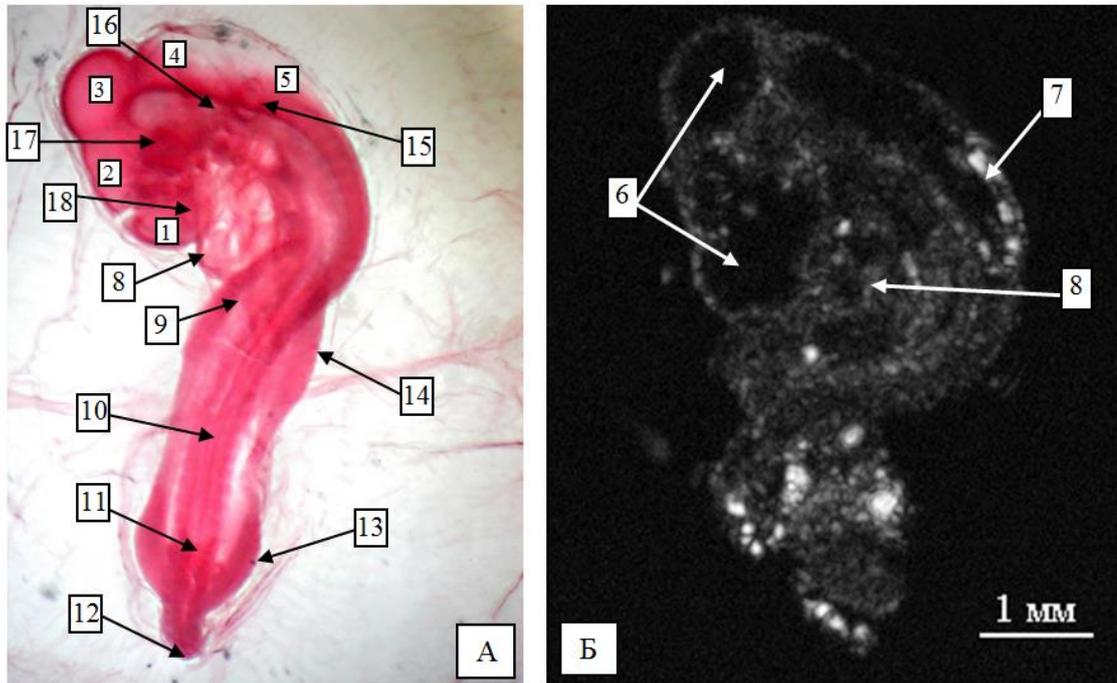


Рисунок 3.16. Сравнение оптического (А) и акустического (С-скан) (Б) изображения (глубина 739 мкм, толщина 115 мкм) эмбриона на 3-и сутки развития: 1 – передний мозг; 2 – промежуточный мозг; 3 – средний мозг; 4 – задний мозг; 5 – продолговатый мозг; 6 – полости головного мозга; 7 – полость спинного мозга; 8 – сердце; 9 – передние кишечные ворота; 10 – спинной мозг; 11 – задние кишечные ворота; 12 – хвостовая почка; 13 – почка нижней конечности; 14 – почка крыла; 15 – слуховая капсула; 16 – глоточная щель; 17 – глаз; 18 – обонятельная ямка.

Глобальные изменения наблюдаются в области глазных пузырей. Происходит образование хрусталиковых плакод из покровного эпителия зародыша. Как и любые округлые структуры, они хорошо видны на акустических изображениях как светлые области. В то время как края глазной чаши так же выступают в направлении акустической линзы и выглядят светлыми, центральная, вогнутая часть глазной чаши, не попадает в область акустических ворот и выглядит темной. Так же темной выглядит слуховая капсула, т.к. акустический срез проходит как раз через ее полость (рисунок 3.16А).

В головной части видны светлые образования, которые можно трактовать как поверхность головного мозга. Так же хорошо видны полости головного мозга: как уже было показано, они выглядят темными.

На 4-е сутки на акустических изображениях видна четкая метамерная структура в дорсальной части зародыша. В средней части зародыша акустический срез прошел через середину сомитов и там видны полости сомитов, в то время как каудальная часть зародыша более уплощенная и на тот же акустический срез в этой части попали поверхности сомитов (рисунок 3.17А).

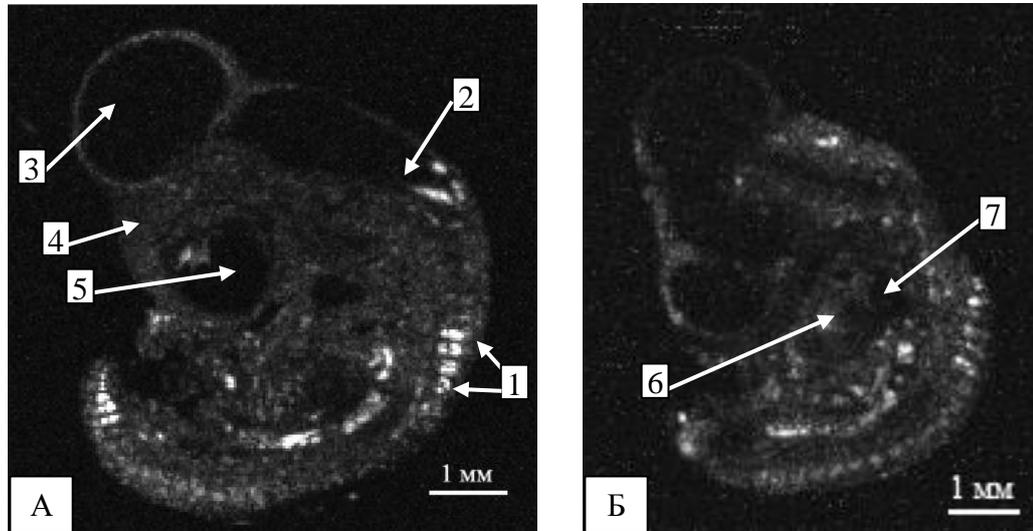


Рисунок 3.17. Акустические изображения эмбриона перепела на 4-е сутки развития на разной глубине А (глубина 1200 мкм, толщина 150 мкм) и Б (глубина 2147 мкм, толщина 208 мкм): 1 – сомиты; 2 – полость заднего мозга; 3 – полость среднего мозга; 4 – передний мозг; 5 – полость глазной чаши; 6 – сердце; 7 – полость сердца.

Дальнейшее развитие эмбрионов происходит в основном за счет роста уже сформировавшихся органов и дифференцировки образовавшихся закладок тканей. Особый интерес представляет развитие головного мозга, т.к. благодаря наличию полостей, эта структура хорошо видна на акустических изображениях. Таким образом, более целесообразно рассматривать отдельные системы органов, в которых происходят значительные перестройки и которые представляют наибольший интерес для биологии развития. Развитие мозга и глаза будет рассмотрено более подробно в следующих разделах.

3.2.1.2 Получение акустических изображений головного мозга эмбрионов перепела (3-11 сутки развития)

Начиная с третьих суток развития, головная часть эмбриона является наиболее крупной и составляет более половины тела эмбриона.

На ранних этапах головной мозг доступен для исследования ввиду отсутствия перьевого покрова, однако, и на более поздних этапах получение акустических изображений головного мозга не представляет практических трудностей.

Для сбора наиболее полной информации обо всех отделах головного мозга, предпочтительным оказалось получение изображений сагиттальных срезов. Для этого эмбрион

помещался боковой стороной вверх под акустическую линзу и проводилось сканирование в области головы. При этом размеры головы не позволяли на одном С-скане получить качественные изображения всех отделов головного мозга, расположенных на разных уровнях в глубине образца, т.к. одновременно они не попадают полностью в фокальную область. В этом случае целесообразным является получение изображений в несколько этапов, сдвигая линзу по оси Z. При этом практически не будет происходить потери качества изображения, т.к. головной мозг сильно обводнен, не имеет акустически непрозрачных структурных элементов и его полости так же содержат жидкость, мало отличающуюся по своим акустическим свойствам от воды (таблица 3.1).

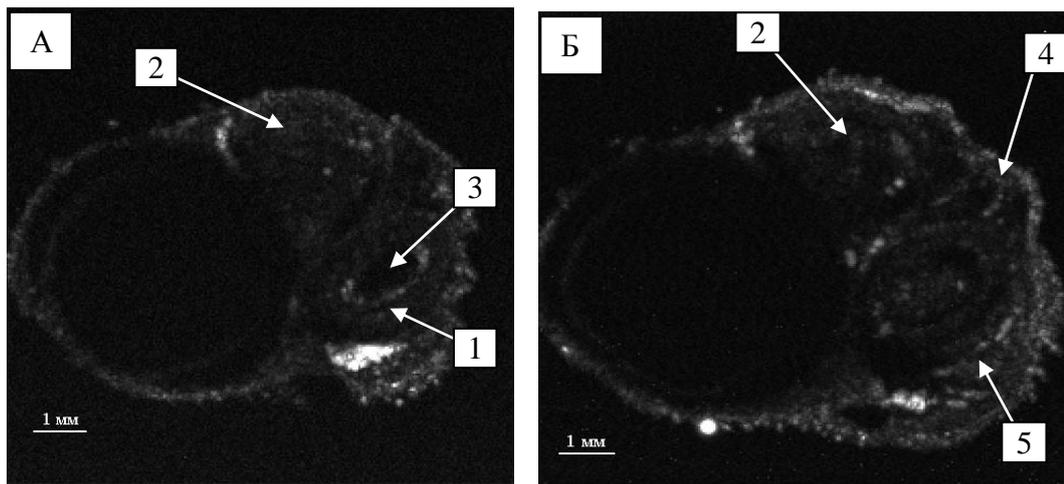


Рисунок 3.18. Акустические изображения головного мозга перепела на 10-е сутки развития: А (глубина 2383 мкм, толщина 230 мкм); Б (глубина 3358 мкм, толщина 230 мкм): 1 – средний мозг зрительная доля; 2 – большие полушария; 3 – полость зрительной доли; 4 – эпифиз; 5 – мозжечок.

На полученных акустических изображениях (рисунок 3.18) головы перепела хорошо видны все отделы головного мозга (передний, средний, промежуточный, задний), при этом нервная ткань выглядит достаточно однородной и проявляет хороший акустический контраст с полостями мозга заполненными жидкостью, которые выглядят темными областями. Поверхности различных долей мозга и его отделов на акустических изображениях выглядят светлыми за счет своей шаровидной формы, а не из-за структурных особенностей этих участков.

Как видно на рисунке 3.18, с течением времени формирование костей черепа продолжается. По мере развития краниальной части черепа получение акустических изображений головного мозга может быть затруднено. Кроме того, расположение на голове эмбрионов перепела ювенального пуха так же способствует снижению качества получаемых изображений. Тем не менее, до 12 суток развития, возможно получение изображений и

проведение количественных измерений: определение размеров отделов мозга, динамику исчезновения полостей в них, размеры желудочков. На С-сканах по-прежнему видны и доступны для исследования основные отделы головного мозга: передний и средний мозг, мозжечок и т.д.

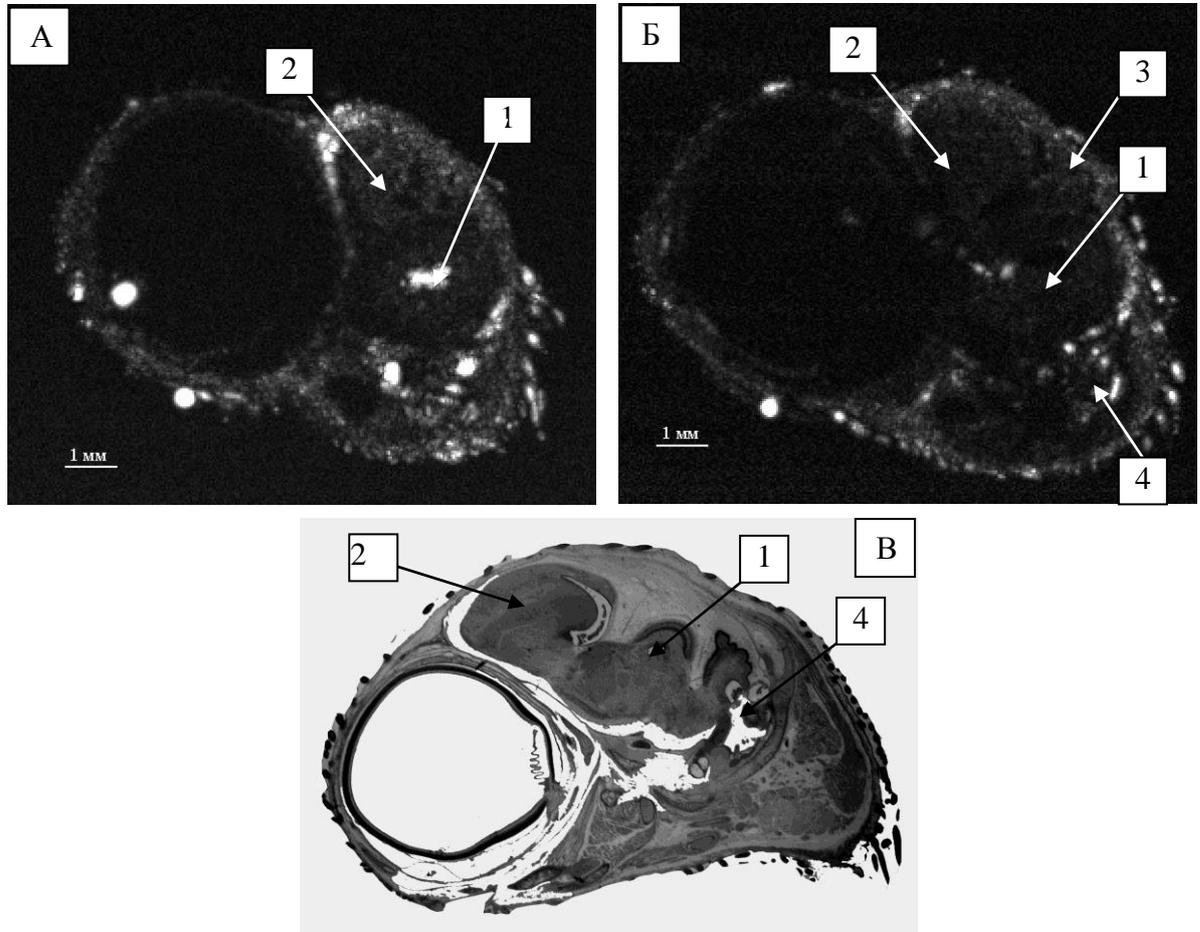


Рисунок 3.19. Сравнение акустических (А) (глубина 2435 мкм, толщина 230 мкм) и (Б) (глубина 2963 мкм, толщина 230 мкм) и оптического (В) изображений головного мозга перепела на 11-е сутки развития: 1 – средний мозг зрительная доля; 2 – большие полушария; 3 – эпифиз; 4 – мозжечок.

Стандартным способом исследования строения мозга также является классическая гистологическая техника. Так как ткани мозга не окрашены, а после фиксации становятся практически бесцветными, проведение микроанатомических исследований затруднено и при изготовлении препаратов применяют окраску по Маллори. Для подтверждения данных, полученных методом акустической микроскопии, были изготовлены гистологические препараты, окрашенные по Маллори. На рисунок 3.19В приведен пример полученного гистологического препарата на поздней стадии развития, когда сформированы все отделы головного мозга. Гистология полностью подтверждает расположение и форму определенных на акустических изображениях частей головного мозга. Из-за проведенной химической обработки

тканей на гистологическом препарате возникли разрывы и искажения, обусловленные в первую очередь разным составом и свойствами тканей. Так же на процесс изготовления препарата негативно повлияли крупные размеры исследуемого образца.

Важно отметить, что в процессе некоторых экспериментов, связанных с изменением газового обмена и тепловой регуляции эмбрионов могут возникать отеки и кровоизлияния. При фиксации искажаются пропорции опухших органов, что существенно сказывается на качестве полученных гистологических препаратов и затрудняет анализ изображений.

Кроме того, с помощью гистологической техники невозможно получение изображений с нескольких ракурсов на одном исследуемом объекте, при этом уже при заливке объекта необходимо учесть его ориентацию и определить плоскость изготовления срезов. При этом часть информации неизбежно будет утрачена, что нежелательно при проведении единичных исследований. Получение акустических изображений позволяет впоследствии изменить ориентацию объекта под акустической линзой и провести повторные исследования, т.к. процесс сканирования проходит достаточно быстро благодаря тому, что объект целиком попадает в поле сканирования. Также при поддержании температурного режима и использовании физиологического раствора в роли иммерсии не будет происходить существенных изменений тканей, что позволит провести дополнительно гистологические исследования на том же объекте.

Необходимо отметить, что, как и для акустической микроскопии, для получения гистологических срезов также есть ограничение по возрасту эмбрионов, ввиду того, что окостенение черепной коробки будет мешать изготовлению гистологических препаратов. Определенные сложности представляет и перьевой покров - высокое содержание кератина в перьях препятствует изготовлению качественных срезов для световой микроскопии и сильно рассеивает звук при получении акустических изображений.

3.2.1.3 Получение акустических изображений глаза эмбрионов перепела (3-11 сутки развития)

Глаза птиц, крупные, доступные для исследования, закладываются и формируются на ранних стадиях и являются объектом множества исследовательских направлений.

В данной работе были исследованы глаза эмбрионов перепела в период с 5 по 11 сутки развития, что затрагивает весь процесс роста и дифференцировки структур глаза.

Как и в случае с головным мозгом, наиболее информативными оказались изображения сагиттальных срезов глаза. Методика проведения сканирования аналогична предыдущим исследованиям. С-сканы оказались предпочтительнее, т.к. ввиду высокой обводненности и отсутствия плотных тканей В-сканы сложнее позиционировать относительно структурных элементов глаза. Также из-за шарообразной формы глазного яблока основная информация,

получаемая на В-сканах, дает представление только о его диаметре. При этом поверхность, находящаяся ближе к акустической линзе на В-сканах, имеет так называемый артефакт «усов» из-за особенностей взаимодействия ультразвука с объектами шарообразной формы. Однако благодаря высокой обводненности тканей и акустической однородности стекловидного тела потери энергии звукового сигнала существенно ниже, чем при исследовании других органов. Это позволяет получить четкие изображения в рамках одного сеанса С-сканирования без сдвига линзы по оси Z, если при этом область фокальной перетяжки приходится на хрусталик. Для примера приведены акустические изображения глаза эмбриона перепела на шестые сутки развития (рисунок 3.20). На акустических изображениях четко видны основные составляющие элементы: оболочки глаза, стекловидное тело, хрусталик, роговица и т.д.

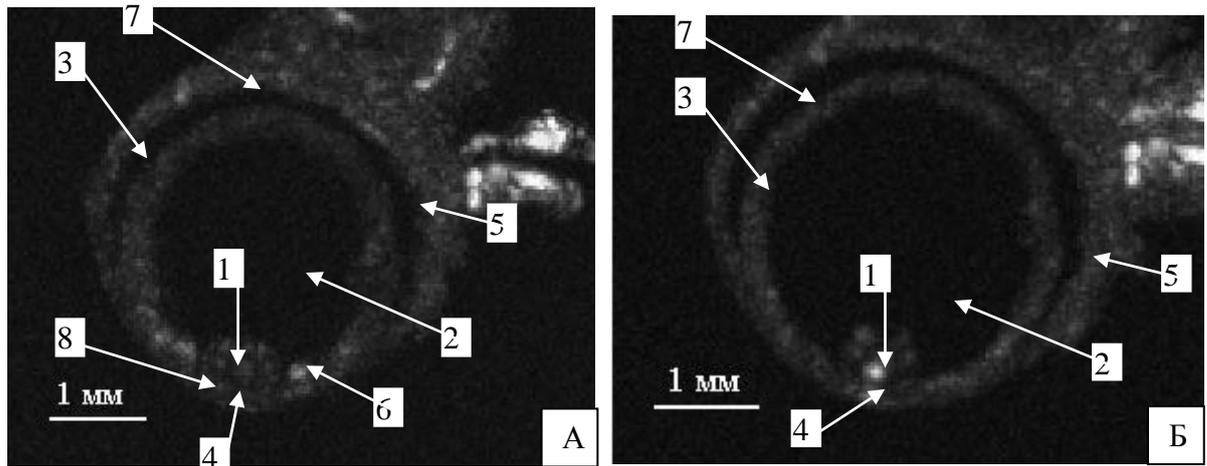


Рисунок 3.20. Акустические изображения глаза перепела на 6-е сутки развития: А (глубина 1506 мкм, толщина 363 мкм); Б (глубина 1916 мкм, толщина 363 мкм) 1 – тело хрусталика; 2 – стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глазница; 6 – ресничное тело; 7 – полость глазницы; 8 – передняя камера глаза.

Хрусталик на акустических изображениях на данной стадии уже выглядит контрастным благодаря своей округлой форме. Стекловидное же тело выглядит темным и дает сильное отражение при попадании в область получения акустического изображения его передней поверхности. По данным акустической микроскопии была составлена таблица для количественного анализа структурных изменений, происходящих в процессе роста глаза эмбрионов и дифференцировки тканей.

Как видно из таблицы 3.5, рост глазного яблока и хрусталика практически полностью прекращается на 8 сутки, в то время как процесс формирования передней камеры глаза и дифференцировки сетчатки идет и на более поздних сроках.

Таблица 3.5. Измерение 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

Кроме линейных размеров важными диагностическими параметрами являются объем глазного яблока и хрусталика. В таблице 3.6 приведены результаты измерения объемов для тех же стадий, рассчитанные по формуле для сплющенного сфероида:

$$V = \frac{4}{3} \pi a^2 c, \quad (3.1)$$

где a - длина большей оси; c - длина меньшей оси сфероида [156].

Таблица 3.6 Измерение объемов глазного яблока и хрусталика эмбрионов перепела на разных стадиях развития.

Сутки развития	V глазного яблока, 10^{-9} м ³	V хрусталика, 10^{-9} м ³
5	94±3	0.45±0.01
6	116 ±4	2.60±0.10
7	324±10	4.30±0.20
8	442±15	6.30±0.20
9	448±20	6.60±0.30
10	480±20	8.90±0.40
11	450±10	8.80±0.30

Для подтверждения данных, полученных с помощью акустической микроскопии, были изготовлены гистологические препараты, окрашенные по Маллори. На рисунке 3.21 проведено сравнение акустических изображений глаза на поздней стадии с оптическими. Как видно, акустические изображения не уступают по детальности классическим гистологическим препаратам. Однако на гистологическом препарате происходит сильное изменение формы и размеров тканей глаза, особенно таких обводненных, как стекловидное тело и передняя камера глаза, в результате обезвоживания и изготовления препаратов. При получении акустических изображений ткани глаза не сминаются и не деформируются, сохраняя свои естественные

пропорции, что позволяет проводить количественную оценку размеров отдельных структур глаза, а также правильно интерпретировать полученные изображения.

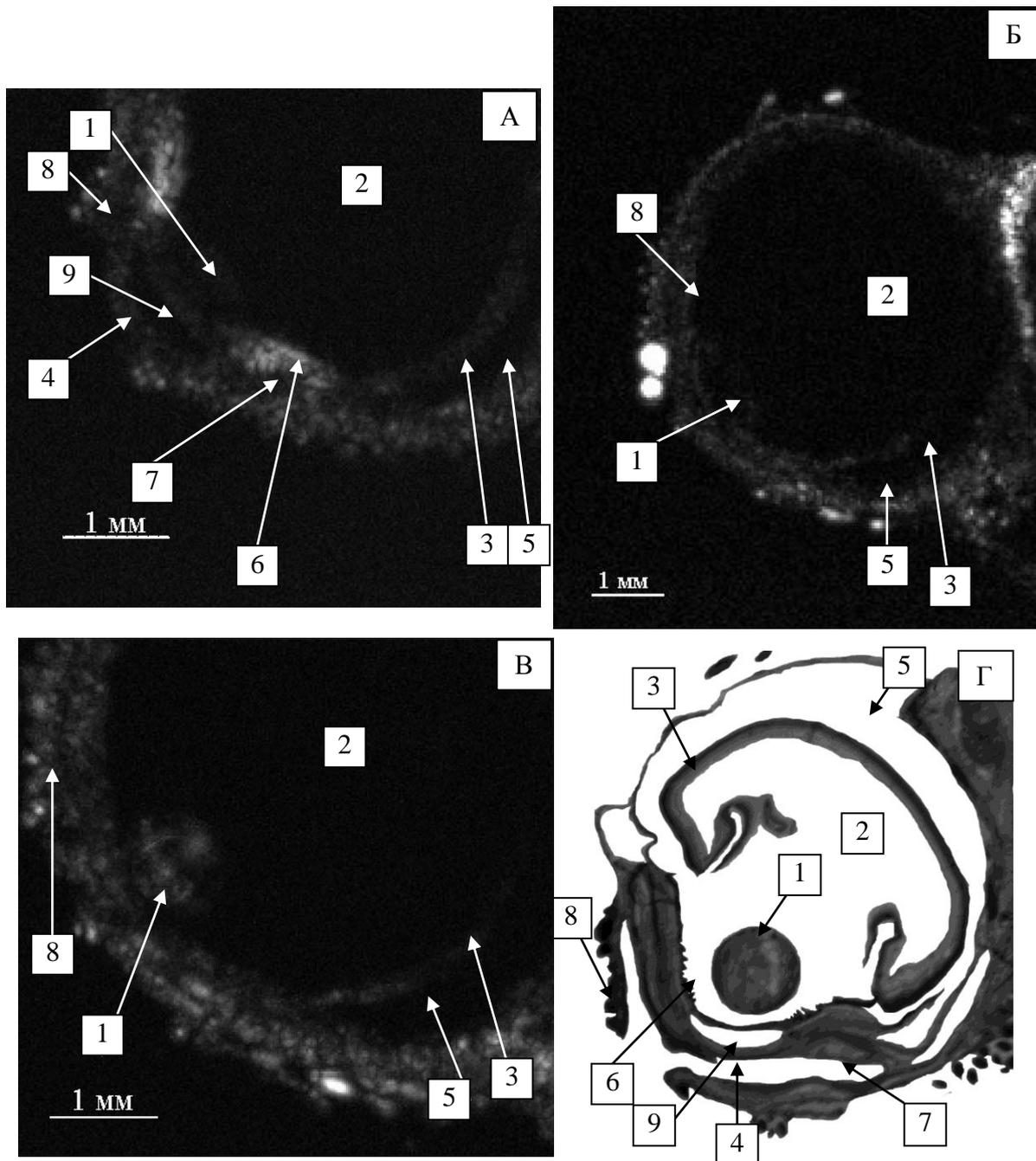


Рисунок 3.21. Сравнение акустических и оптического изображений глаза перепела на 11-е сутки развития: А (глубина 1460 мкм, толщина 104 мкм); Б (глубина 1974 мкм, толщина 115 мкм); В (глубина 2175 мкм, толщина 138 мкм) 1 – тело хрусталика; 2 - стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глазница; 6 – ресничное тело; 7 – конъюнктивный мешок; 8 – верхнее веко; 9 – передняя камера глаза.

3.2.1.4 Получение акустических изображений скелета конечностей эмбрионов перепела (5-11 сутки развития)

Особенность исследования этой системы заключается в том, что в процессе формирования эмбрионального скелета происходит окостенение, т.е. появляется ткань с высоким акустическим импедансом, за счет чего на границе мягких тканей с костной существенно (в 2-3 раза) повышается амплитуда отраженного ультразвукового сигнала. С методической точки зрения, затруднения могут возникнуть в получении изображений отдельных костей в связи с их трубчатой формой. При интерпретации изображений трубчатых костей необходимо учитывать, что при наклоне длинной оси объекта по отношению к оси акустической линзы получаются изображения, соответствующие сечениям цилиндра в различных плоскостях (рисунок 3.10А).

В задачу данного исследования входило получение изображений костей передних и задних конечностей. Относительные размеры конечностей, начиная с седьмых суток развития, превышают 2 мм, что позволяет проводить достаточно точные измерения с технической точки зрения. Для удобства сканирования конечности были удалены и без предварительной обработки закреплены в желатине горизонтально, дорсальной стороной к акустической линзе. Все участки конечности эмбриона при таком расположении находятся практически в одной плоскости, что позволило получить на одном С-скане изображения всех костей конечности. Для этой цели необходимо правильно позиционировать конечность, чтобы не возникало сдвигов отдельных участков по оси Z, и увеличить протяженность акустических ворот до 700-800 мкм.

Для детального анализа полученных на акустических изображениях данных, были изготовлены препараты конечностей по методике Доусона (рисунок 3.22-3.23). На рисунке 3.22А показано акустическое изображение правого крыла эмбриона перепела на 7-е сутки развития с дорсальной стороны. Глубина акустического среза составляет 370 мкм, что позволяет увидеть скелет крыла. Окостеневшие фрагменты кости окрашены белым цветом (лучевая и локтевая кость), серым цветом – мягкие ткани крыла. Длина плечевой кости на данной стадии достигает 2.3 мм. Плечо окостенело на 30%. Зачатки кости появились в лучевой и локтевой кости. Все остальные части представлены хрящами. На гистологических препаратах согласно сведениям из литературы [31] на 7-е сутки развития в лучевой и локтевой кости зачатки окостенения только появляются, в то время как акустическая микроскопия позволяет провести уже количественный анализ, по данным которого длина локтевой кости в среднем составляет 0.45 мм, а лучевой – 0.75 мм.

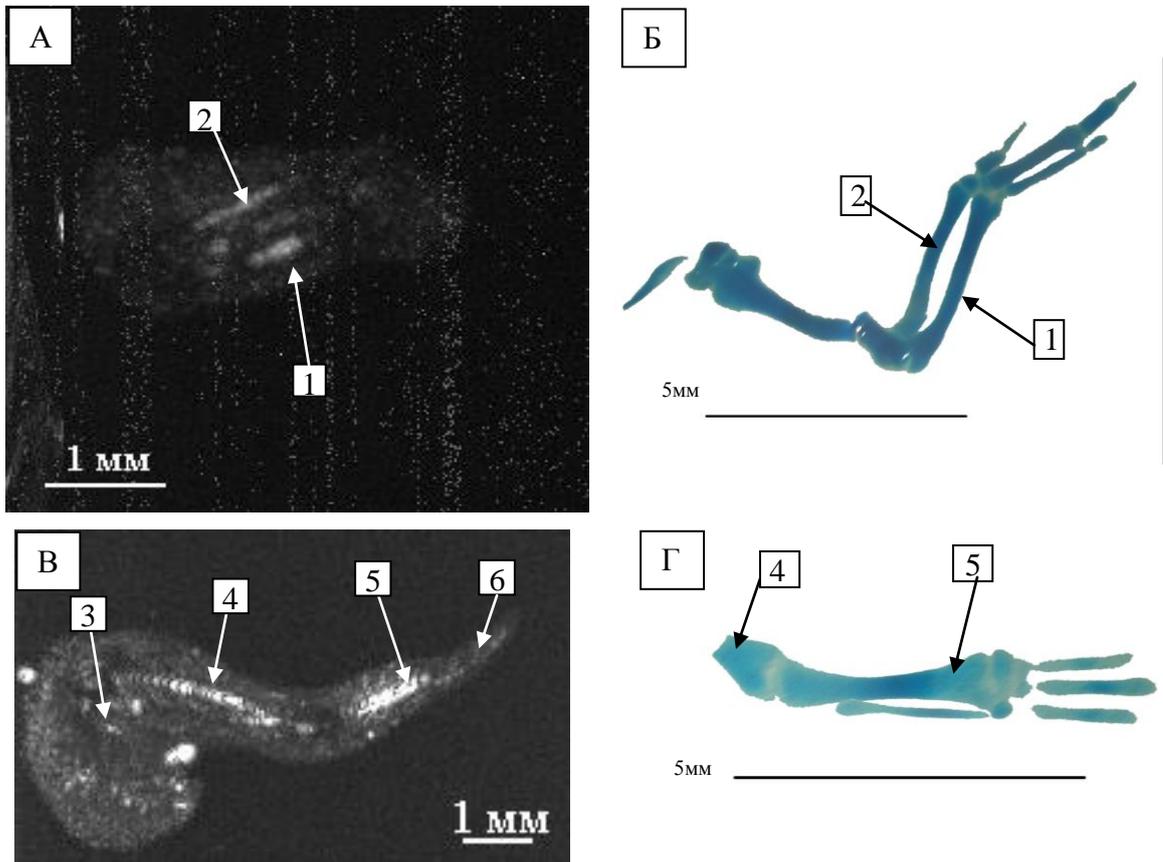


Рисунок 3.22. Сравнение акустических (С-скан) (А, В) (А - глубина 370 мкм, толщина 520 мкм, В - глубина 670 мкм, толщина 660 мкм) и оптических (Б, Г) изображений крыла и ноги эмбриона перепела на 7-е сутки развития: 1 – локтевая кость; 2 – лучевая кость; 3 – бедро; 4–голень; 5 – цевка; 6 – стопа.

На рисунке 3.22В также показано акустическое изображение правой ноги эмбриона перепела на 7-е сутки развития с дорсальной стороны. Длина бедренной кости достигает 2.9 мм. Бедро окостенело на 30%. Зачатки кости появились в голени и цевке. Все остальные части представлены хрящами.

Таким образом, в начале остеогенеза акустическая микроскопия позволяет провести количественный анализ динамики развития скелета. Для более полного анализа возможностей ультразвуковых исследований так же были получены акустические изображения конечностей эмбриона перепела на 10-е сутки развития (рисунок 3.23).

На 10-е сутки развития зачатки кости появились во всех отделах как верхней, так и нижней конечности, что хорошо видно на акустических изображениях. Длина плечевой кости (рисунок 3.23А) достигает 5 мм. Плечо окостенело на 57%. Длина бедренной кости (рисунок 3.23В) – 6.6 мм. Бедро окостенело на 63%.

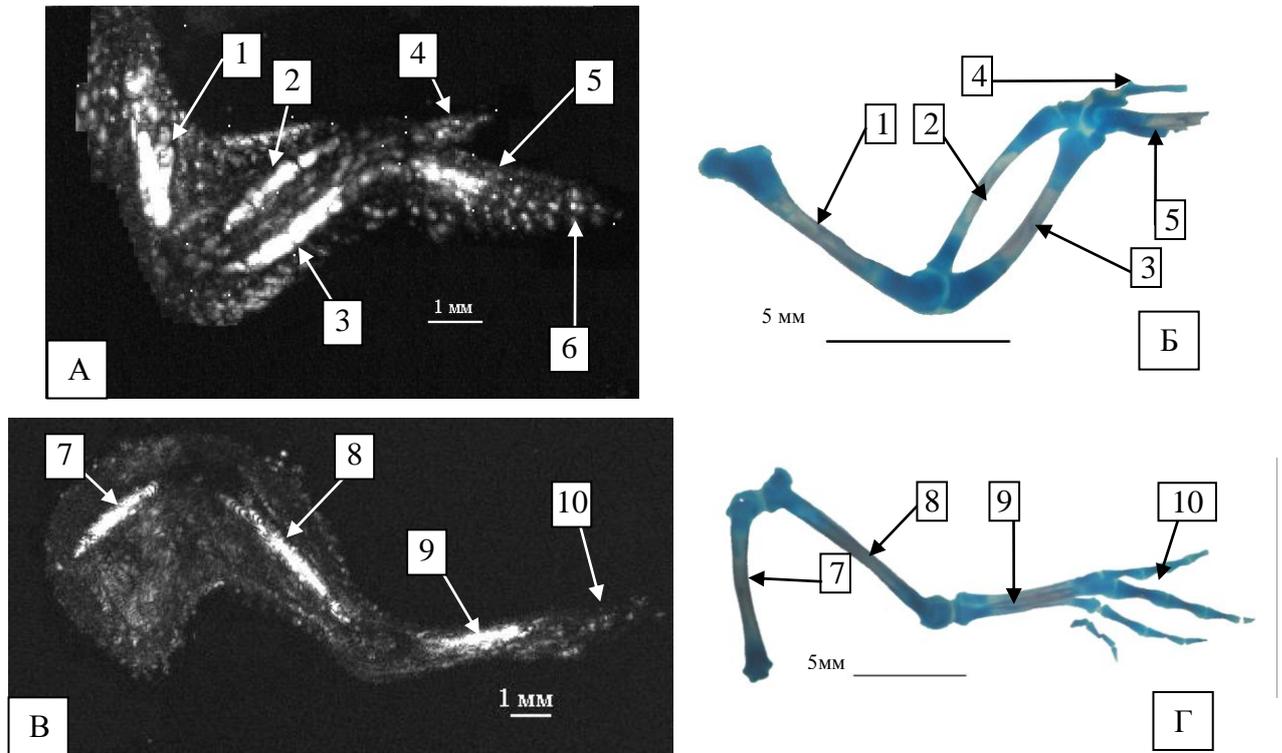


Рисунок 3.23. Сравнение акустических (С-скан) (А,В) (А – глубина 687 мкм, толщина 785 мкм, В - глубина 1730 мкм, толщина 735 мкм) и оптических (Б,Г) изображений крыла и ноги эмбриона перепела на 10-е сутки развития: 1 – плечевая кость; 2 – лучевая кость; 3 - локтевая кость; 4 – третий палец; 5 – пястно-запястная кость; 6 – второй палец; 7 – бедро; 8 – голень; 9 – цевка; 10 – стопа.

На основании полученных с помощью акустической микроскопии данных составлена таблица 3.7.

Соотнося длину участка окостенения к длине закладки соответствующей кости по данным неразрушающего исследования с применением ультразвука и по данным оптической микроскопии (с использованием последовательно фиксации, обезвоживания, просветления и окрашивания препаратов), можно убедиться в хорошей корреляции данных, полученных этими методами. Кроме того, представленные в таблице результаты, в большой степени согласуются с данными из литературы [31].

Отдельно нужно отметить, что изготовление гистологических препаратов по методике Доусона заняло более 15 дней, в то время как сканирование каждой отдельной конечности занимало не более 6-7 минут в зависимости от требуемого качества получаемого изображения. Особым преимуществом разрабатываемого метода является комплексный анализ строения конечности, включающий в себя не только сведения о строении скелета конечности, но и данные о состоянии кожного покрова (рисунок 3.23А), развития мускулатуры, что невозможно при использовании методики Доусона, т.к. на полученных препаратах все мягкие ткани просветлены и практически не видны.

Таблица 3.7. Нормальное развитие скелета конечностей эмбрионов японского перепела по данным акустической микроскопии для 5-11 суток развития.

Стадия	Передняя конечность, 10^{-3} м			Задняя конечность, 10^{-3} м		
	плечевая кость	локтевая кость	лучевая кость	бедро	голень	цевка
5 суток	0.40±0.05	-	-	0.50±0.09	-	-
6 суток	0.80±0.10	-	-	1.10±0.15	-	-
7 суток	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 суток	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 суток	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 суток	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 суток	5.60±0.75	4.10±0.35	4.20±0.35	6.60±1.20	5.20±0.65	4.00±0.30

Акустическая микроскопия дает хороший результат при исследовании развития скелета без предварительной подготовки эмбрионов и на поздних стадиях, в то время как использование некоторых гистологических методик, например методики Доусона, требует удаления перьевого покрова и внутренних органов.

3.2.1.5 Получение акустических изображений кожных покровов эмбрионов перепела (7-11 сутки развития)

В доступной литературе данных по развитию кожи и перьевого покрова перепела не обнаружено, а сведения такого рода важны не только для орнитологии, но и для птицеводства, ветеринарии, космической биологии. С этой целью было проведено акустическое исследование, охватывающее весь период развития ювенального пуха.

Для исследования были взяты эмбрионы с 7 по 11 день развития, то есть был охвачен период начала закладки перьев, при этом были получены изображения дорсальной части эмбриона, соответствующие сагиттальным срезам, когда эмбрион располагался боковой стороной к акустической линзе. Для анализа были выбраны именно С-сканы, т.к. за счет изменения ширины акустических ворот на С-скане возможно получить целиком изображение отдельного зачатка пуха, включая очин, находящийся под складкой эпидермиса.

Для наглядного сравнительного гистологического анализа были выбраны препараты, окрашенные по Маллори, ввиду разнородности исследуемого образца: наличие мышечного слоя, подкожной жировой клетчатки, эпидермиса и дермы подчеркивается разными цветами окраски за счет связывания красителей: коллагеновые волокна окрашиваются в темно-синий, миофибриллы – в красный, эластические волокна – в бледно-розовый, а соединительная ткань – в голубой [157].

На акустических изображениях можно видеть, что кожа перепела в процессе эмбриогенеза представляет собой тонкий однородный слой ткани, толщина кожи практически

одинакова во всех отделах и не превышает 0.3 мм. Лишь на 7-е сутки в дерме в области поясничного отдела спины появляются небольшие уплотнения, которые выделяются как мелкие округлые структуры диаметром 150-250 мкм с более высоким акустическим импедансом (рисунок 3.24).

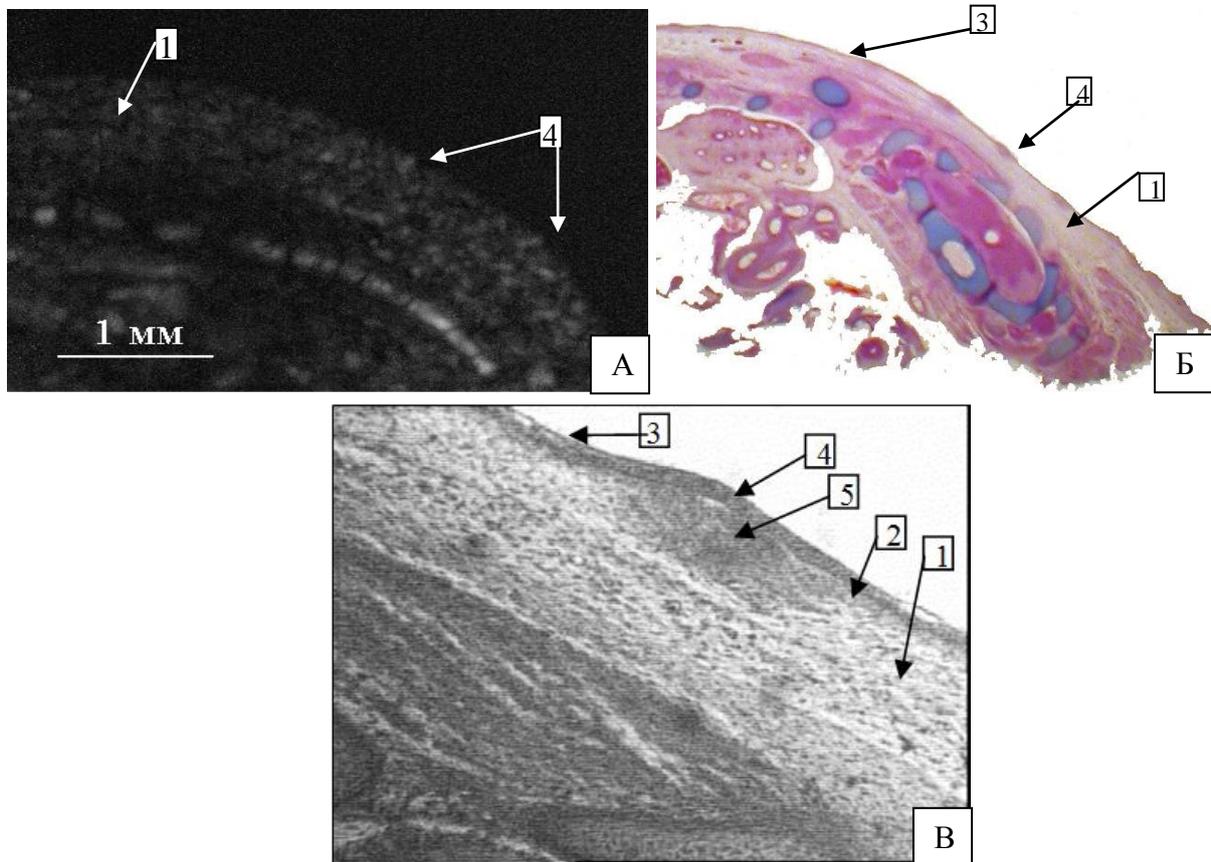


Рисунок 3.24. Акустическое (А – глубина 2444 мкм, толщина 136 мкм) и оптические (Б – увеличение $\times 16$, В – увеличение $\times 400$) изображения зачатка ювенального пуха и кожного покрова в поясничной области эмбриона перепела на 7-е сутки развития: 1 – соединительнотканная часть кожи; 2 – мальпигиев слой кожи; 3 – роговой слой; 4 – зачаток пера (сосочек); 5 – выросты мальпигиева слоя в зачатке пера.

На рисунке 3.24А представлен С-скан спины в поясничном отделе. Пласт «акустического среза» захватывает не только поверхность кожи, но и ткани, лежащие глубже – в центральной части проступает мышечная ткань. Перья располагаются метамерно. Закладки перьев видны так же отчетливо, как на гистологическом срезе. На рисунке 3.24Б-В представлено микроскопическое строение тканей в дистальном отделе туловища 7-дневного эмбриона японского перепела. Изображение получено с гистологического среза толщиной 10 мкм, выполненного в продольном направлении в области пера; окраска по Маллори, увеличение $\times 16$ и $\times 400$ соответственно. Диаметр перьевых зачатков 150-250 мкм, толщина –

90-150 мкм. Толщина кожи 15-20 мкм, над перьевыми зачатками она несколько толще – до 25 мкм. Толщина подкожного слоя (до мышц) – в среднем 200 мкм, он слабо дифференцирован.

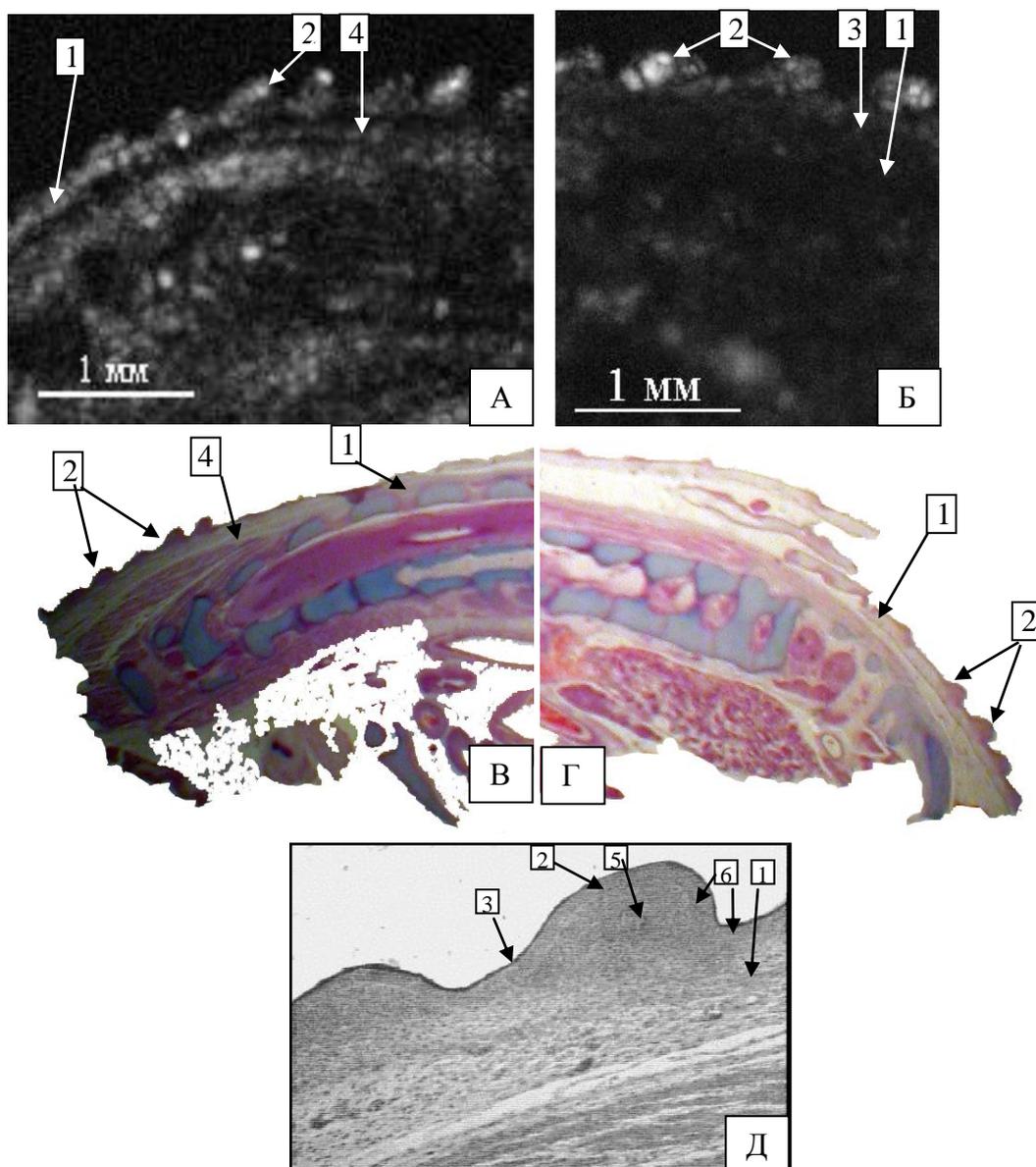


Рисунок 3.25. Акустические (А, Б – глубина 1850 мкм, толщина 186 мкм) и оптические (В, Г – увеличение $\times 16$, Д – увеличение $\times 400$) изображения зачатка ювенального пуха и кожного покрова в поясничной области (А,В,Д) и шейной области (Б,Г) эмбриона перепела на 8-е сутки развития: 1 – соединительнотканная часть кожи; 2 – зачаток пера (сосочек); 3 – роговой слой; 4 – мышечный слой; 5 – выросты мальпигиева слоя в зачатке пера; 6 – мальпигиев слой кожи.

На восьмые сутки в поясничной области зачатки пера удлиняются до 0.3 мм, а в шейной зоне только начинают появляться и составляют до 0.15 мм. Кожа над перьями и между ними – 23-31 мкм, подкожный слой – 150-160 мкм (рисунок 3.25). На акустическом изображении поверхностного участка кожи в поясничном отделе спины на этой стадии развития уже хорошо видны зачатки перьев, благодаря высокому содержанию кератина. Они так же имеют более высокую плотность и отражают ультразвук лучше, чем окружающие мягкие ткани, благодаря

чему на акустическом изображении они выглядят как четкие белые бугорки и точки. На акустическом изображении шейного отдела виден четкий переход между птерилиями. В затылочной области зачатки находятся на ранней стадии развития, бугорки слабо выступают над поверхностью кожи. В шейном отделе перья развиваются несколько быстрее, чем в поясничной области: зачатки имеют вид цилиндров и удлинены в сторону хвоста. На гистологическом препарате закладки перьев выглядят как чешуйки – выросты эпидермиса, направленные в сторону хвоста. На рисунке 3.25Д показано детальное изображение зачатка пуха: зачаток имеет вид бугорка с основанием 250-300 мкм и высотой 150-200 мкм.

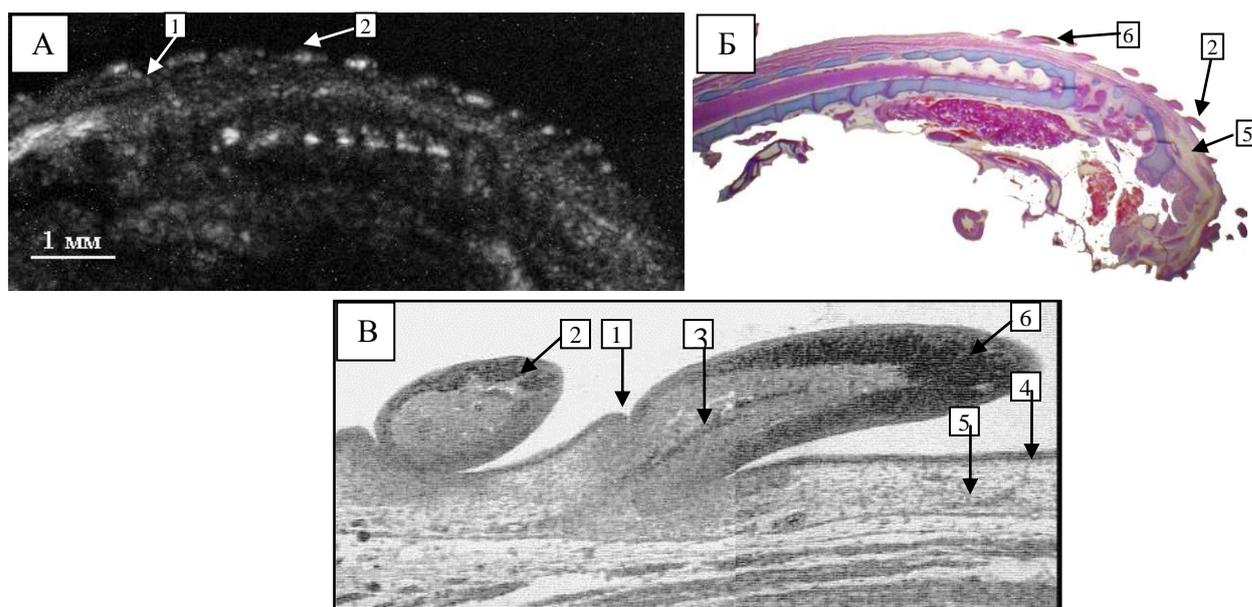


Рисунок 3.26. Акустическое (А – глубина 2650 мкм, толщина 173 мкм) и оптические (Б – увеличение $\times 16$, В – увеличение $\times 400$) изображения ювенального пуха и кожного покрова в поясничной области эмбриона перепела на 9-е сутки развития: 1 – зачаток влагалища пера; 2 – зачаток пера; 3 – сердцевина пера; 4 – эпидермис; 5 – жировая ткань; 6 – пигментированная часть зачатка пера.

На 9-сутки закладки ювенального пуха покрывают всю дорсальную часть эмбриона, их размеры достигают 0.5 мм (рисунок 3.26). На этой стадии эмбриональный пух приобретает характерную для цыплят окраску (рисунок 3.26Б,В). Толщина кожи между перьями – 12-17 мкм, подкожный слой - до мышц - 117 мкм. В нем видны кровеносные сосуды, которые проникают в зачаток пера на стадии бугорка и в процессе развития достигают удаленных участков, оставляя свободным только самые дистальные отделы пера, где идет процесс кератинизации и потребность кровоснабжении снижена. На 9-е сутки пух очень быстро растет наружу, образуя конический цилиндр, который удлиняется по направлению к хвосту. Зачаток пера покрыт эпидермисом и заполнен мезодермой. Зачатки перьев покрывают практически все тело эмбриона, в тазовой области развитие идет быстрее и на оптическом изображении

(рисунок 3.27) видно, что внутри зачатка уже формируются эпидермальные гребни, которые станут бородками первого порядка после вылупления.

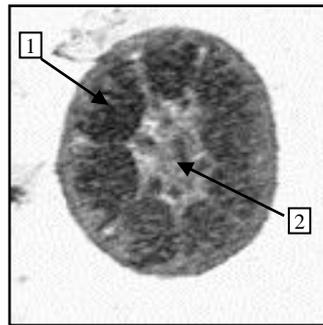


Рисунок 3.27. Оптическое изображения зачатка пера поперечный срез (увеличение $\times 400$): 1 – бородка; 2 – сердцевина.

На 10-й день заметно сильное удлинение всех перьев по сравнению с предыдущей стадией, что подтверждается при исследовании кожи как в оптическом, так и в акустическом микроскопах. Длина ювенального пуха достигает половины своей окончательной длины. Пух окрашен в темный цвет и покрывает всего цыпленка (рисунок 3.28).

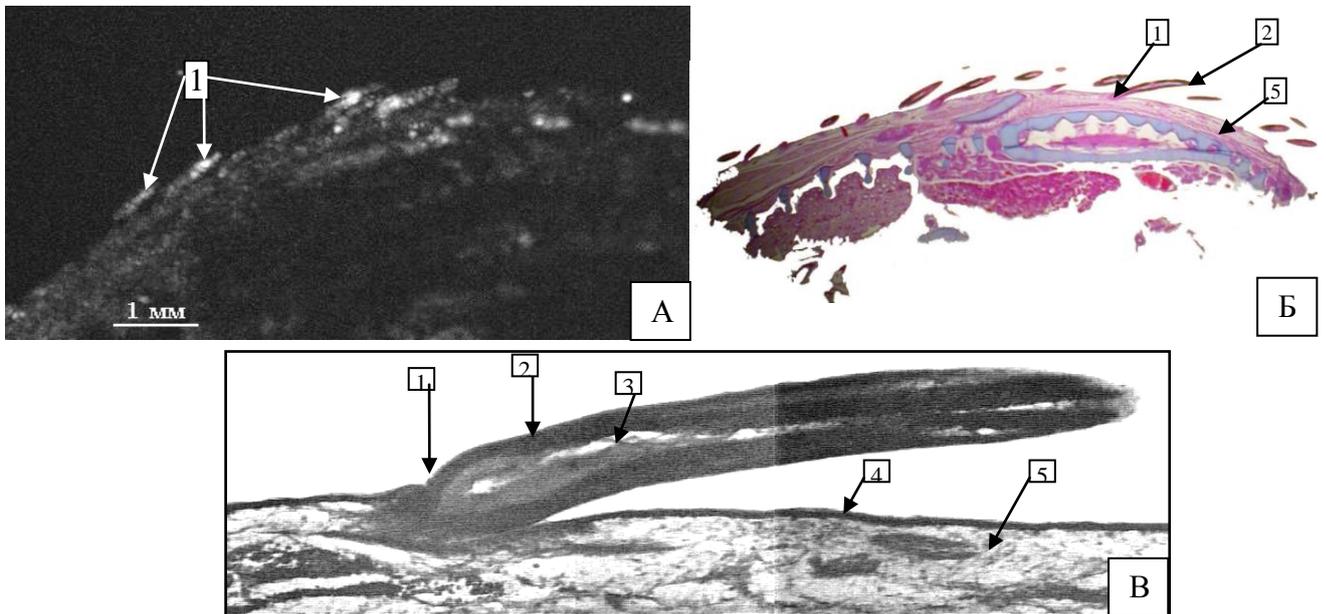


Рисунок 3.28. Акустическое (А – глубина 2600 мкм, толщина 173 мкм) и оптические (Б – увеличение $\times 16$, В – увеличение $\times 400$) изображения ювенального пуха и кожного покрова в поясничной области эмбриона перепела на 10-е сутки развития: 1 – влагалище пера; 2 – перо; 3 – сердцевина пера; 4 – эпидермис; 5 – жировая ткань.

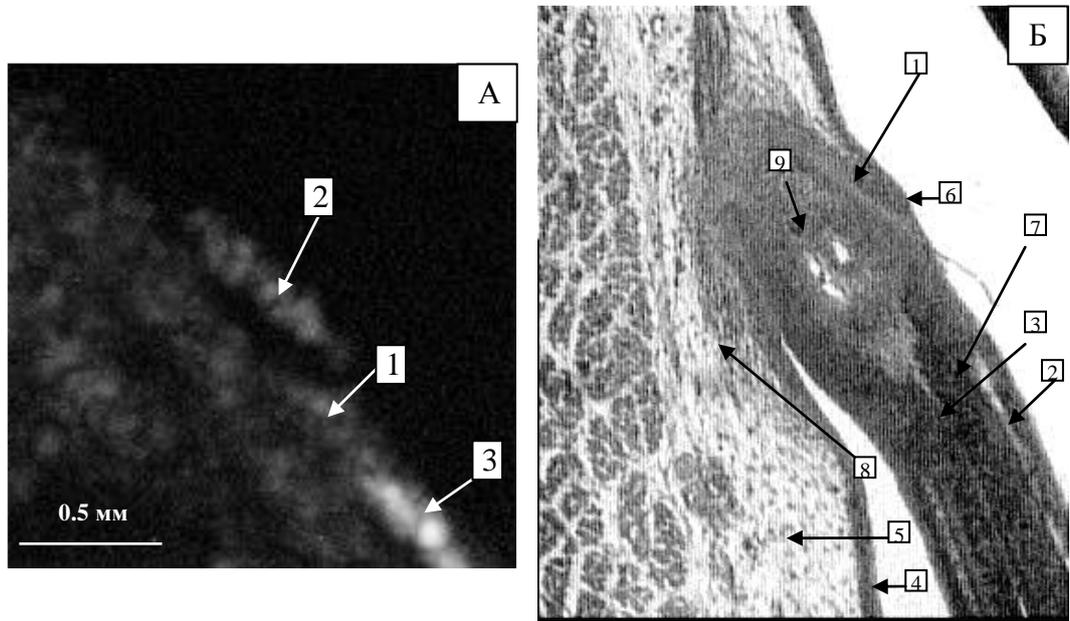


Рисунок 3.29. Детальное акустическое (Б - глубина 2600 мкм, толщина 173 мкм) и оптическое (А - увеличение $\times 400$) изображения зачатка пера в поясничной области эмбриона перепела на 10-е сутки развития: 1 – влагалище пера; 2 – перо; 3 - сердцевина пера; 4 – эпидермис; 5 – жировая ткань; 6 - кожная ресничка; 7 – бородка; 8 – гладкая мышца; 9 – очин.

Рассмотрим микроструктуру ювенального пуха на данной стадии. Сверху на перо, выходящее из кожи, как бы налегает кожная складка. Толщина кожи – 12-17 мкм, подкожный слой – 120-200 мкм. В основании диаметр перьев достигает 160-220 мкм, длина перьев от 1600 до 2000 мкм (рисунок 3.29).

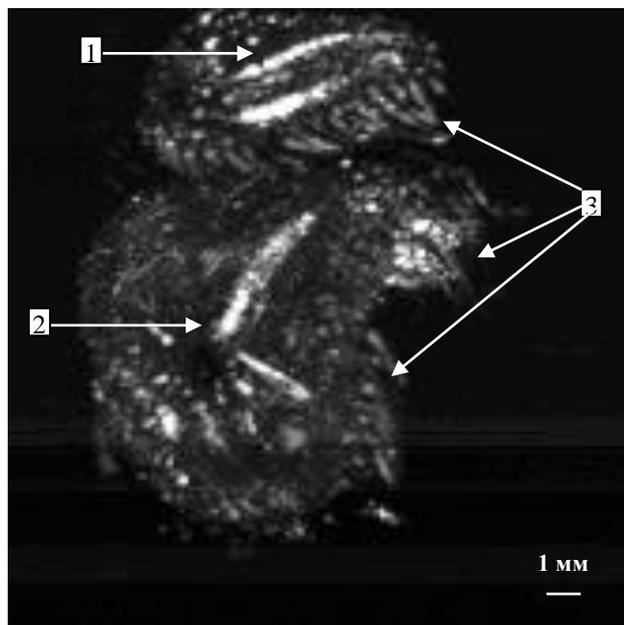


Рисунок 3.30. Акустическое изображение туловища эмбриона перепела на 11-е сутки развития (глубина 3150 мкм, толщина 248 мкм): 1 – передняя конечность; 2 – задняя конечность; 3 – перьевой покров.

На 11 сутки пух покрывает все тело эмбриона и практически достигает своей конечной длины, что существенно затрудняет получение изображений собственно кожного покрова (рисунок 3.30). Диаметр пера в основании 170-220 мкм, длина перьев около 5000 мкм.

На основании данных проведенных измерений была составлена таблица 3.8.

Таблица 3.8. Измерение параметров кожи и перьевого покрова эмбрионов перепела на разных стадиях развития.

Стадия	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 суток	15-20	180-200	150-250	90-150
8 суток	23-31	150-160	250-300	150-200
9 суток	12-17	115-140	220-250	350-670
10 суток	12-17	120-200	160-200	1600-2000
11 суток	-	-	170-200	более 5000

Благодаря сопоставлению с изображениями, полученными в световом микроскопе, стало возможным дать точную интерпретацию данных, полученных на акустическом микроскопе. Однако получение качественных оптических изображений кожного покрова птиц сильно затруднено, т.к. относительно тонкая кожа с ярко выраженной подкожной клетчаткой плохо поддается проводке и резке, в результате чего происходит отслоение кожных покровов, множественные разрывы и нарушение единой картины. Развитие ювенального пуха на поздних стадиях так же ухудшает качество получаемых препаратов. При получении акустических изображений искажения получаемых изображений в результате химической и механической обработки не наблюдаются. Вместе с тем, проведенное исследование позволило не только обосновать интерпретацию данных акустической микроскопии, но и получить новые данные о развитии одной из наименее изученных систем перепела – кожи и ее производных, перьев.

Полученные в этом разделе работы данные акустической микроскопии о развитии отдельных систем органов эмбриона легли в основу наглядных таблиц нормального развития эмбрионов перепела (Приложение А, рисунки А.1-А.30).

3.3 Исследование эмбрионов в патологическом состоянии

После того как были установлены основные закономерности формирования акустических изображений основных систем и органов эмбрионов перепела при нормальном развитии, полученные экспериментальные данные были использованы для оценки влияния

внешних факторов на эмбриогенез. Так как внешние факторы, такие как газовые смеси и условия невесомости, могут вызывать изменения отдельных органов, систем органов и т.д., для получения качественных изображений эмбрионов целиком было выбрано С-сканирование, при котором эмбрионы располагались боковой стороной к акустической линзе.

Для оценки изменений, произошедших в процессе развития эмбрионов, полученные изображения сравнивались с аналогичными при нормальном развитии. При этом нормальные эмбрионы исследовались в нативном состоянии, а в патологическом – после предварительной фиксации в спиртоглицериновом растворе.

3.3.1 Влияние факторов космического полета

Ниже приведены результаты ультразвуковых исследований эмбрионов после космического полета с различными нарушениями.

На рисунке 3.31А, Б показаны изображения эмбриона на 14 сутки развития. Эмбрион был мертв и после сравнения с акустическими изображениями в норме было установлено, что по состоянию органов и размерам тела его развитие соответствует эмбрионам на 6 сутки развития. В тканях произошли сильные некротические изменения, которые, как было показано ранее, приводят к падению скорости звука в тканях и снижению контрастности получаемых акустических изображений. Особенно хорошо это видно при сравнении с нормой. Кроме того, отсутствуют очаги окостенения, что может быть свидетельством нарушения кальциевого обмена под действием условий космического полета.

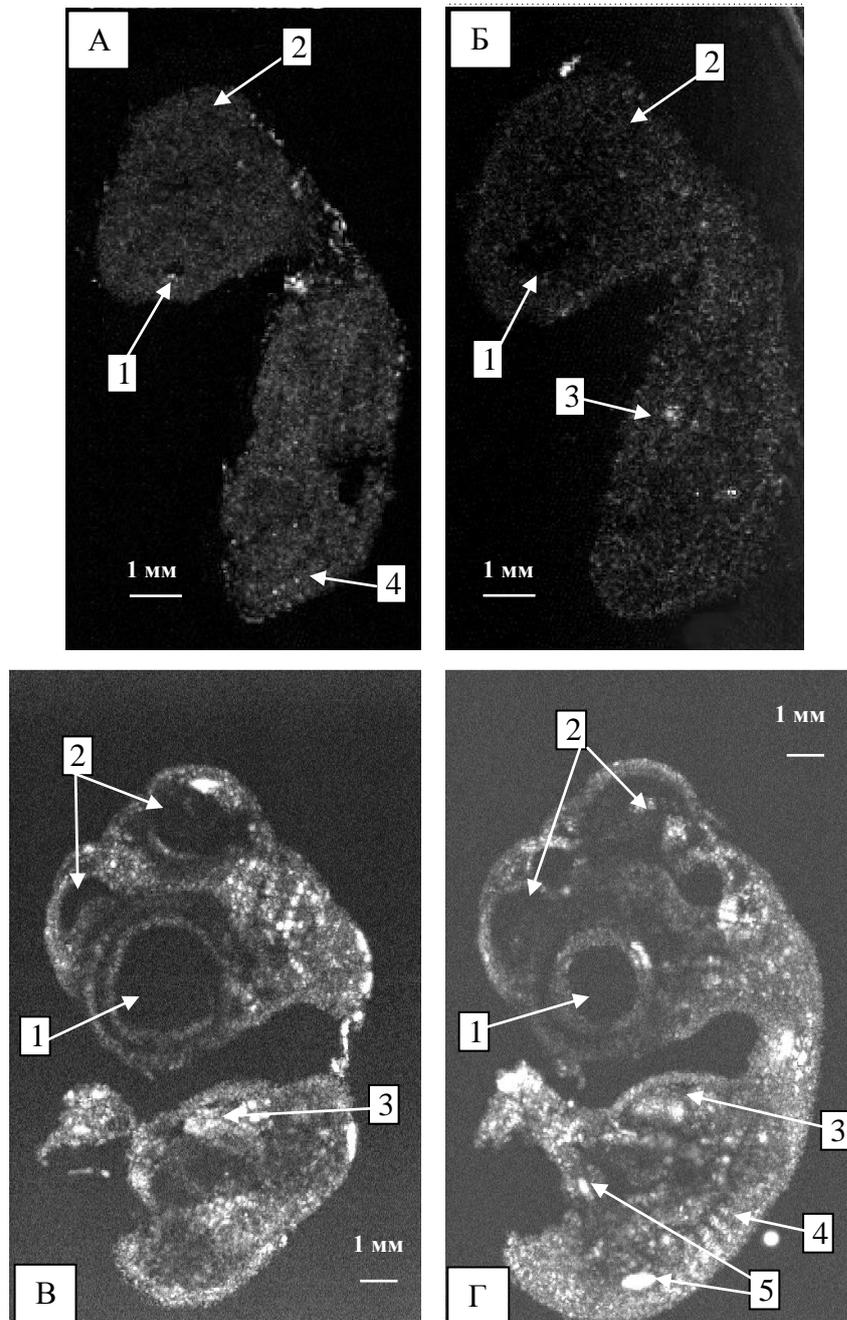


Рисунок 3.31. Акустические изображения эмбриона перепела после эксперимента («Полет») А (глубина 1097 мкм, толщина 404 мкм); А (глубина 2066 мкм, толщина 519 мкм) и в норме (6-е сутки) В (глубина 2655 мкм, толщина 115 мкм); Г (глубина 3116 мкм, толщина 115 мкм): 1 – глаз; 2 – головной мозг; 3 – сердце; 4 – позвоночный столб; 5 – очаги окостенения.

Эмбрион на рисунке 3.32А, Б также находился в условиях космического полета. Яйцо было вскрыто на 7 день, но по результатам сравнения с нормой развитие соответствует стадии 5 суток. Некротические изменения проявились существенно меньше, чем в предыдущем эксперименте, хорошо виден позвоночный столб, который развит соответственно стадии 5 суток, но обнаружены нарушения во фронтальной части головы эмбриона: недоразвитие клюва, нарушение развития больших полушарий и смещение среднего мозга в переднюю часть головы. Что видимо и стало причиной преждевременной гибели эмбриона.

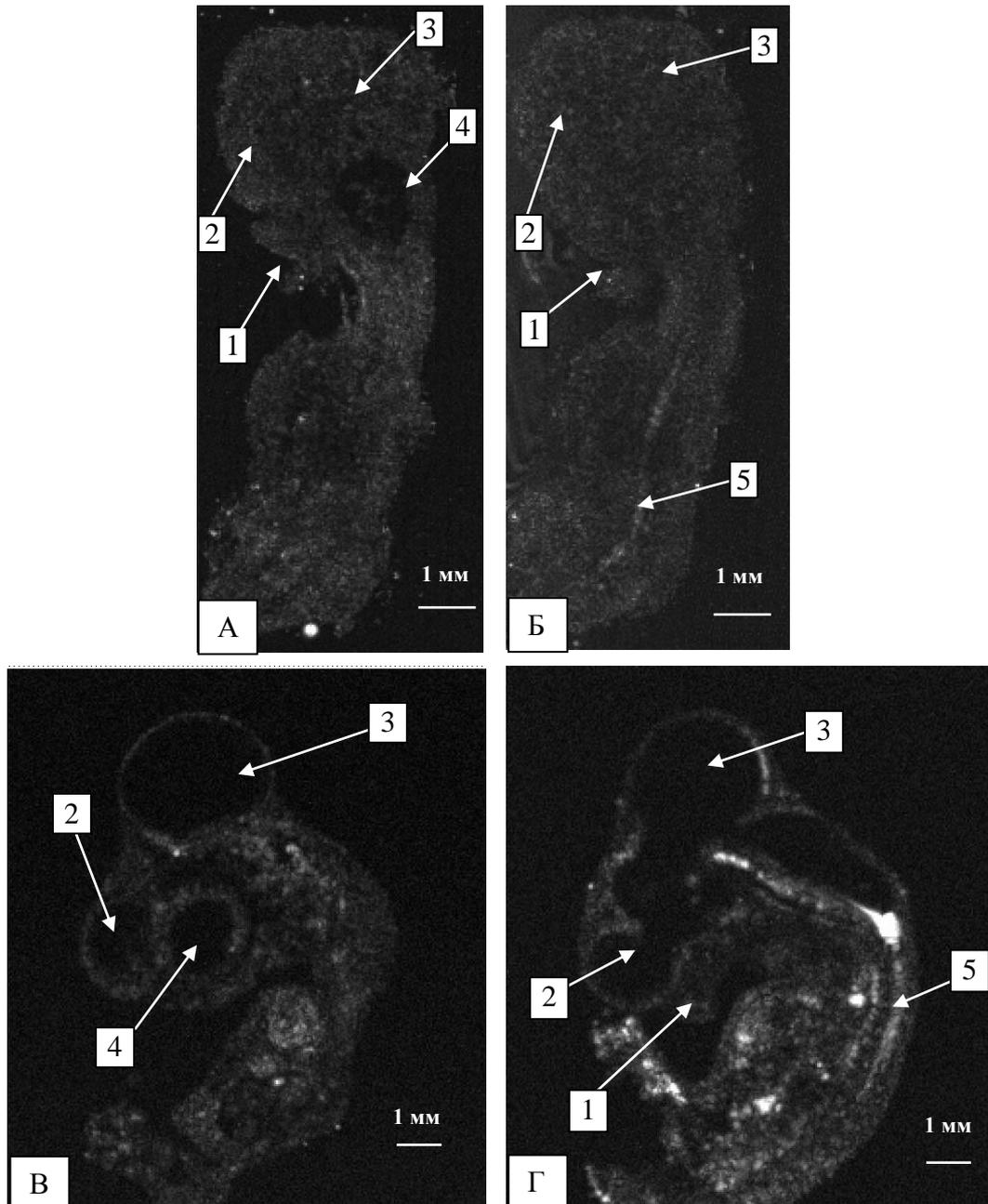


Рисунок 3.32. Эксперимент («Полет») А (глубина 2000 мкм, толщина 125 мкм); Б (глубина 2560 мкм, толщина 130 мкм). Норма (5-е сутки) В (глубина 1905 мкм, толщина 132 мкм); Г (глубина 2605 мкм, толщина 109 мкм): 1 – клюв; 2 – передний мозг; 3 – средний мозг (зрительная доля); 4 – глаз; 5 – позвоночный столб.

Необходимо отметить, что количество отклонений в развитии у «полетной» группы составляло около 15%, в то время как в контрольной группе не превышало 2%. Природа данного явления пока точно не определена.

3.3.2 Влияние газовых смесей

В данной серии экспериментов эмбрионы развивались в атмосфере криптона (рисунок 3.33А). При вскрытии яйца на шестые сутки эмбрион был мертв. После проведения ультразвуковых исследований и сравнения с нормой было установлено, что пропорции тела и

отдельных органов соответствуют эмбрионам на шестые сутки развития, однако ткани стали отечными и рыхлыми, начался процесс некроза. Кроме того, была обнаружена эктопия грудной клетки, что возможно являлось одной из причин преждевременной гибели.

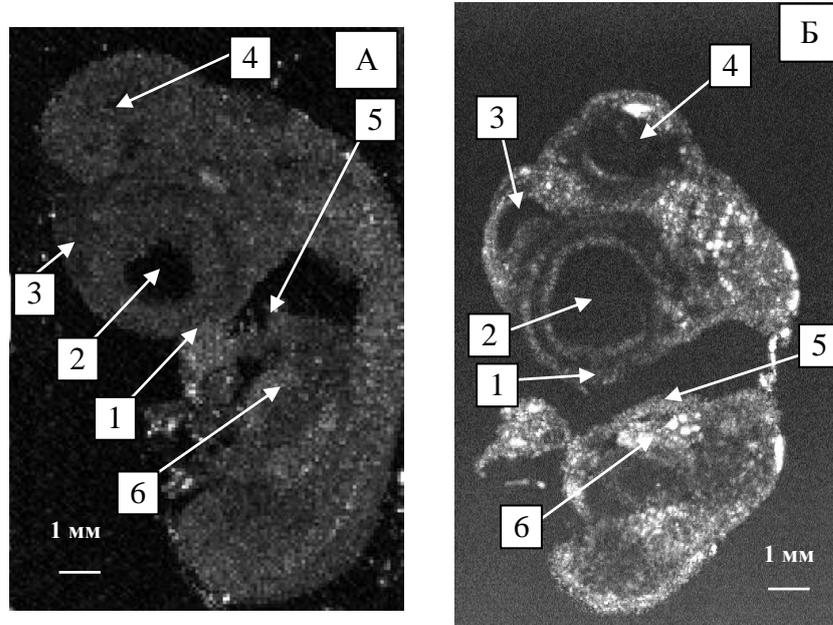


Рисунок 3.33. Эксперимент (криптон) А (глубина 2332 мкм, толщина 543 мкм); норма Б (6-е сутки) (глубина 2655 мкм, толщина 115 мкм): 1 – клюв; 2 – глаз; 3 – передний мозг, 4 – средний мозг (зрительная доля); 5 – грудная клетка; 6 – сердце.

Еще одна серия экспериментов было посвящена влиянию криптона в условиях гипербарии. Данный эмбрион (рисунок 3.34А,Б) так же развивался в атмосфере криптона, но дополнительно был введен фактор гипербарии (5 атмосфер). На четвертые сутки яйцо с развивающимся эмбрионом извлекли из инкубатора, произвели ультразвуковые исследования и сравнили их с данными на эмбрионах, развивавшихся в нормальных условиях (рисунок 3.34). При вскрытии эмбрион был жив, при детальном исследовании было обнаружено, что размеры тела соответствуют эмбрионам на 4.5 суток. Так же было установлено, что пропорции отдельных органов и их систем сохранены, что позволяет утверждать, что в данных условиях эмбрион развивался на 0.5 суток быстрее, чем в нормальных условиях. Однако обнаружены нарушения дифференцировки тканей глаза, особенно сетчатки.

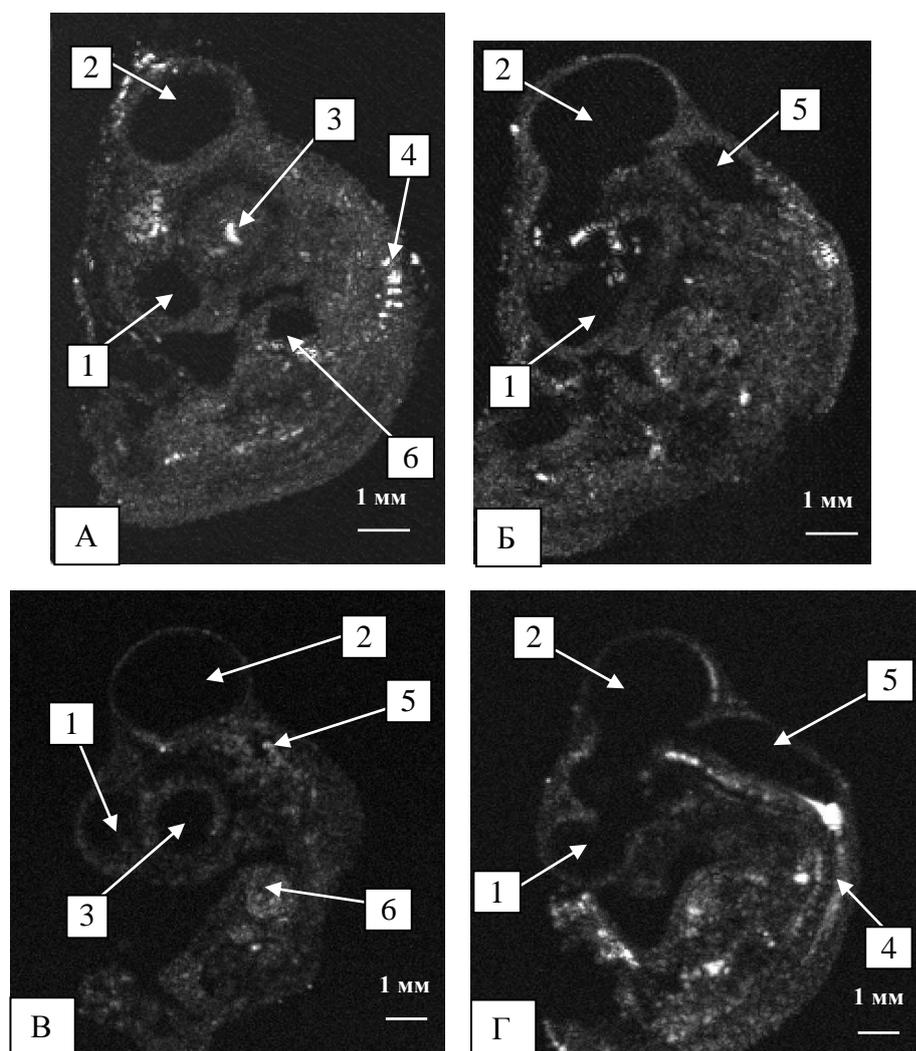


Рисунок 3.34. Эксперимент (криптон, гипербария 5 атмосфер на 4 сутки) А (глубина 1617 мкм, толщина 404 мкм); Б (глубина 2366 мкм, толщина 358 мкм); норма (5-е сутки) В (глубина 1905 мкм, толщина 132 мкм); Г (глубина 2605 мкм, толщина 109 мкм): 1 – передний мозг; 2 – средний мозг (зрительная доля); 3 - глаз; 4 – позвоночный столб; 5 – задний мозг; 6 – сердце.

В третьей серии экспериментов развитие эмбрионов происходило в атмосфере закиси азота (рисунок 3.35А). Данный эмбрион на шестые сутки развития при вскрытии яйца был жив, размеры тела соответствовали эмбрионам из контроля (длина тела около 13.5 мм). Ультразвуковые исследования также не выявили никаких патологий внутренних органов. Эмбрион развивался нормально.

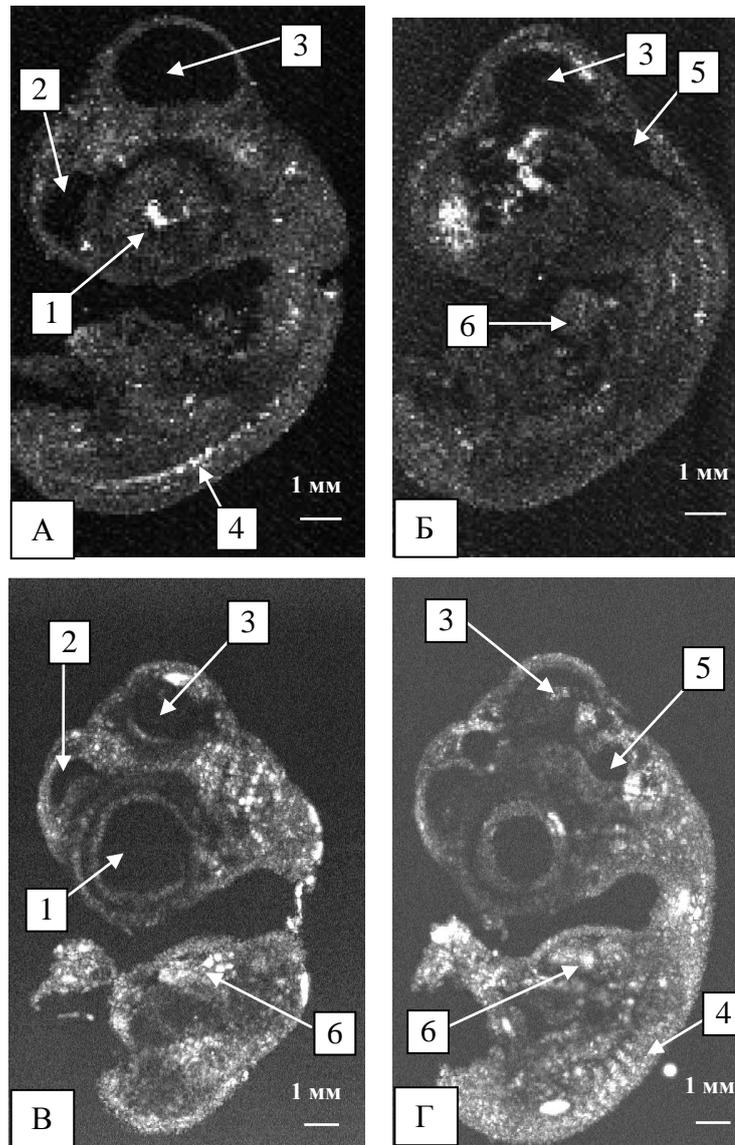


Рисунок 3.35. Эксперимент (закись азота) А (глубина 2435 мкм, толщина 381 мкм); Б (глубина 3093 мкм, толщина 254 мкм); норма (6-е сутки) В (глубина 2655 мкм, толщина 115 мкм); Г (глубина 3116 мкм, толщина 115 мкм): 1 – глаз, 2 – передний мозг; 3 – средний мозг (зрительная доля); 4 – позвоночный столб; 5 – задний мозг; 6 – сердце.

В четвертой серии экспериментов кроме закиси азота было добавлено избыточное давление (5 атмосфер). При вскрытии на шестые сутки эмбрион был жив, однако размеры тела были меньше, чем в норме (рисунок 3.36А). После проведения ультразвуковых исследований было установлено, что эмбрион развивался нормально, но стадия соответствует пятым суткам.

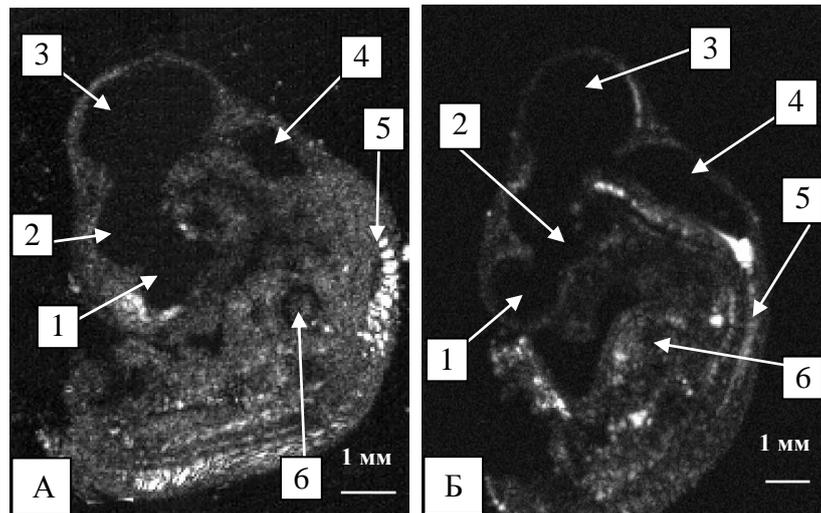


Рисунок 3.36. Эксперимент (закись азота, гипербария) А (глубина 2435 мкм, толщина 230 мкм); норма Б (5-е сутки) (глубина 2605 мкм, толщина 109 мкм): 1 – передний мозг; 2 – промежуточный мозг; 3 – средний мозг (зрительная доля); 4 – задний мозг; 5 – позвоночный столб; 6 – сердце.

В описанных выше циклах экспериментов, акустическая микроскопия была основным методом исследования, за исключением визуального осмотра и измерений видимых частей тела, доступным для исследования эмбрионов, т.к. экспериментальный материал должен был остаться интактным для длительного хранения. Ультразвуковое исследование дало полное представление о состоянии внутренних органов эмбрионов, позволило уточнить измерения после визуального осмотра и не оказало существенного влияния на сам биологический материал.

Глава 4. Обсуждение

В связи с тем, что применяемый в данной работе метод является относительно новым, первоочередной задачей в данной работе являлась разработка собственной методики исследования нативных эмбриональных объектов [158]. Однако даже в отсутствие внешних воздействий на объект возникали артефакты, связанные с гетерогенностью и многослойностью образца, а также с его нелинейной формой. В то же время некоторые артефакты на изображениях появлялись в процессе дифференцировки и роста тканей и органов, что наблюдалось в данной работе при исследовании эмбрионов на более поздних сроках (появление участков окостенения в конечностях, полостей головного мозга, изменение перьевого покрова и т.д.). Это явление является причиной появления артефакта типа «акустическая тень», рассмотренного ранее.

К сожалению, в лабораторной практике исследование биологических тканей в нативном состоянии сразу после забора материала является большой редкостью и требует как временных затрат, так и наличия исследовательского оборудования. В то время как после фиксации и обработки тканей образец может храниться длительное время. Как было показано ранее в литературе на различных биологических тканях и подтверждено в данной работе на эмбриональных объектах, фиксаторы меняют акустические параметры объекта, в том числе скорость звука. Экспериментально установлено, что для эмбрионов перепела фиксатором с наименьшим влиянием на данный диагностический параметр является смесь этанола и формалина (формалин 40% : этанол 96% / 1:1). Скорость звука при использовании данной смеси возрастает только на 5%, что легко отследить и учесть в количественных исследованиях.

В отличие от использованных в других экспериментах мягких фиксаторов, предназначенных для длительного хранения образцов, в данном исследовании эксперименты проводились с классическими гистологическими фиксаторами – более агрессивными, но позволяющими после акустических исследований изготовить гистологические срезы из тех же образцов. Разница в полученных данных с данными из источников литературы объясняется как самой методикой изготовления образцов: сроками фиксации, дальнейшим хранением фиксированного материала, расположением образца под акустической линзой (для анизотропных тканей) и т.д., так и изначальным выбором гистологического материала для исследования.

Необходимо отметить, что после извлечения объекта из фиксирующего раствора и помещения его в иммерсионную среду часть фиксирующей смеси попадет в окружающую объект иммерсионную жидкость, и хотя ее количество не оказывает существенного влияния на качество получаемых изображений в рамках данного эксперимента, этого лучше не допускать.

Промывка образца в течение нескольких минут в чистой воде позволяет обойти данную проблему.

Зачастую в рамках эксперимента у исследователя нет возможности зафиксировать материал непосредственно после гибели объекта или получения материала. В эмбриологическом образце, подвергшемся старению и некротическим изменениям, скорость звука стремительно падает в результате деятельности анаэробных бактерий (в среднем на 3% в течение первых суток). Так как все исследования проводились при температуре окружающей среды 25°C, различия в скорости звука для нативных и некротизированных тканей обусловлены только процессами, протекающими в образце, а не изменением внешних условий. Таким образом, объекты необходимо фиксировать сразу после получения материала. В случае, когда это невозможно, следует вносить поправку на изменение скорости звука в тканях в результате некротических изменений.

После оценки и исключения влияния внешних и внутренних факторов на акустические свойства исследуемых объектов остается только вклад, вносимый самим образцом в формирование изображения. Рассмотрим поэтапно процесс развития эмбриона перепела, а так же изменение акустических свойств данного объекта, начиная с первых суток развития.

В процессе гаструляции у позвоночных животных формируется зародыш, состоящий из трех листков: энтодермы, мезодермы и эктодермы. Вслед за этим начинается нейруляция – трансформация плоского слоя эктодермальных клеток в полую нервную трубку. Формирование нервной трубки идет не одновременно по всей эктодерме, лучше всего это видно на эмбрионах птиц. Вместе с этим начинается очень важный этап развития эмбриона – органогенез. Данная стадия характеризуется отсутствием сформировавшихся специализированных тканей, клетки не содержат влияющих на распространение ультразвука специфических включений. В тканях и межклеточном веществе нет таких элементов, как волокна коллагена, минеральные включения и т.д. В ходе образования головной складки в переднем отделе закладывается головная кишка, которая дает начало образованию кишки у зародышей, на гистологических препаратах она выглядит как серповидное образование спереди от нервных валиков. Нервные валики на акустических изображениях выглядят светлыми областями, что вероятнее всего обусловлено не только изменением формы, но и направлением ориентации микротрубочек, играющих первостепенную роль в изгибании и утолщении нервной пластинки. В самом зародыше идут процессы дифференцировки зародышевых листков, в результате образуются органы осевого комплекса: сомиты, хорда и нервная трубка. На акустических изображениях в срединной части зародыша находятся симметричные парные структуры, которые также выглядят светлыми, что обусловлено не только изменением формы и образованием выпуклостей, но и утолщением и уплотнением ткани, в данном случае – мезодермы в ходе сомитогенеза.

В начале вторых суток развития, после образования зародышевых листков, начинается период органогенеза, характеризующийся активной дифференцировкой всех трех зародышевых листков и изменением формы тела, с образованием основных закладок внешних и внутренних органов, что не может не сказаться на изменении акустических свойств исследуемого объекта и соответственно полученных изображений. Ткани эмбриона на этой стадии все еще акустически однородны, ультразвуковой контраст возникает в основном благодаря наличию кривизны поверхности таких органов как глаз и сердце. Эмбрион остается достаточно плоским и любые сдвиги относительно плоскости сканирования дают существенную потерю информации. Например, на рисунке 3.15Б в заданные акустические ворота не попала каудальная часть эмбриона. При сканировании на ранних стадиях позиционированию объекта необходимо уделять дополнительное внимание.

На последующих стадиях раннего развития (третьи и четвертые сутки), продолжается дифференцировка нервной трубки и полости в ней. Так же светлые участки наблюдаются в дорсальной части зародыша, акустический контраст здесь обусловлен наличием метамерно расположенных сомитов, которые не только обладают выпуклой формой, но и являются дифференцированной тканью с активно пролиферирующими клетками.

Таким образом, ранние стадии развития характеризуются наличием метамерных структур и осевой симметрии, что существенно облегчает процесс сканирования и интерпретации изображений, при условии корректного позиционирования объектов под акустической линзой.

На более поздних стадиях развития, исследование отдельных органов или их систем представляется более перспективным, т.к. для решения большинства задач биологии развития, эксперименты проводятся на отдельных органах, что так же позволяют провести сканирование с большим разрешением и за меньшее время. Так, например, изучение процессов и механизмов формирования головного мозга до сих пор продолжается, ведутся исследования на химерных и мутантных животных, исследуется влияние лекарств и биологически активных веществ, введенных в полость мозга, ищутся способы преодоления гематоэнцефалического барьера. Зачастую изменение внешних условий в ходе других экспериментов также отражается на состоянии головного мозга (состояние невесомости, гипоксия и т.д.). Этот процесс необходимо контролировать и наблюдать в динамике.

Головной мозг является одним из самых сложных по строению органов в организме животных. Его формирование включает в себя множество процессов, таких как формообразование за счет механического давления жидкости в нервной трубке, миграция клеток с образованием функциональных отделов и дифференцировка клеток в специфические типы нейронов и глиальных клеток. В самом начале развития зачаток головного мозга

представляет собой нервную трубку, образованную однослойным нейральным эпителием. Эти клетки непрерывно делятся, однако вскоре в митоз вступают только клетки, обращенные к полостям нервной трубки. Остальные клетки мигрируют к периферии, где происходит их дальнейшая дифференцировка. Таким образом, формируется сложная архитектура головного мозга [2]. Интересно, что в процессе роста и развития эмбрионов полости головного мозга уменьшаются благодаря размножению внутреннего слоя клеток, при этом как на акустических, так и на оптических изображениях данный слой (называемый эпендимным) выглядит более контрастным (светлым на акустических изображениях). Это может быть обусловлено как небольшими размерами клеток, образующихся в процессе митоза, так и их структурными особенностями (на поздних стадиях желудочки головного мозга выстланы однослойной эпендимной глией, низкопризматической или кубической формы, имеющей ворсинки на апикальной стороне) [159]. Краевая зона, прилегающая к черепной коробке, может быть выделена на акустических изображениях в основном благодаря наличию заполненного жидкостью просвета между черепной коробкой и головным мозгом. Также возможной причиной этого является миелиновая оболочка, покрывающая аксоны нейронов, которые в большом количестве присутствуют в краевой зоне. Основной составляющей частью миелиновой оболочки является миелин, который хорошо поглощает ультразвук [130]. Для более полного представления о состоянии головного мозга, а также для анализа направленного введения лекарств в полость мозга рекомендуется провести повторное сканирование с теменной области, что позволит при достаточно широких акустических воротах получить изображение практически всех желудочков одновременно.

Глаза птиц в процессе онтогенеза, являются, после мозга, вторым по популярности объектом исследования в биологии. Эффективность применения акустической микроскопии для изучения развития глаза обусловлена, с одной стороны, сродством акустических импедансов иммерсионной жидкости и основных структур глаза [160] и особенностями анатомического расположения и физическим размером глаз птиц с другой стороны. Особенно эффективна акустическая микроскопия для точных количественных измерений параметров отдельных структур глаза, а также обнаружения паталогических изменений. Закладка глаза начинается примерно к моменту формирования нервной трубки. Еще до возникновения отчетливого деления мозгового пузыря на будущие отделы головного мозга появляются выпячивания на боковых стенках промежуточного мозга, называемые глазными пузырями. Глазные пузыри птиц имеют достаточно крупные размеры, что облегчает их исследование. В ходе развития глаз постепенно обособляется от головного мозга, оставаясь связанным с ним только глазным стебельком. Глазное отверстие, вначале очень широкое, постепенно сужается, формируя края зрачка. Сужение происходит неравномерно, на вентральной стороне сужение

идет медленнее, здесь располагается желобок (зрительная щель), по которому к глазу подходят кровеносные сосуды. Увеличиваясь в размере, глазной пузырь приходит в соприкосновение с эктодермой, что вызывает ряд структурных изменений. Передняя поверхность глазного пузыря уплощается и постепенно инвагинирует внутрь, так что глазной пузырь превращается в двухслойное образование - глазной бокал. Внутренний слой глазного бокала намного толще внешнего, это закладка сетчатки. Сетчатая оболочка глаза по мере развития теряет свою контрастность, благодаря дифференцировке клеток сетчатки [115] и уменьшению ее относительных размеров.

Внешний слой дает пигментную оболочку. В месте соприкосновения глазного пузыря и эктодермы, из эктодермального эпителия формируется хрусталик: эктодерма инвагинирует внутрь глазной чаши, образуя хрусталиковую плакodu. Края хрусталиковой плакоды постепенно смыкаются, образуя пузырек (зачаток хрусталика). Хрусталик отделяется от эктодермы, эктодерма над ним просветляется и формирует роговицу глаза. Хрусталик состоит из нескольких структурных элементов: капсулы, эпителия хрусталика и собственно тела хрусталика. Капсула представляет собой бесструктурную однородную прозрачную оболочку, сильно преломляющую свет и защищающую хрусталик. Эпителий хрусталика характеризуется как однослойный, плоский, неороговевающий. Центральная часть хрусталика прозрачна, лишена сосудов и нервов и заполнена белком кристаллином. Кристаллин состоит из нескольких индивидуальных белков: α - и β - кристаллины — белки-шапероны, поддерживающие структуру белков хрусталика и, следовательно, его прозрачность. γ -кристаллин — структурный белок хрусталика [161]. Вещество хрусталика совершенно прозрачно и так же, как и другие компоненты светопреломляющего аппарата, лишено сосудов и нервов. По мере развития хрусталика и формирования хрусталиковых волокон меняются его акустические свойства. В норме у взрослого организма хрусталик становится акустически прозрачным [162], но в процессе роста хрусталик выглядит контрастным не только из-за своей сферической формы, но и благодаря наличию растущих клеток во внутренней зоне хрусталика.

Белковая оболочка в задней части глазного яблока носит название склеры. В склере преобладают волокна, собранные в плоские пучки различной толщины, обычно волокна в пучке ориентированы в одном направлении. Индивидуальная толщина волокон, плотность упаковки, размеры пучков и т.д. зависят от возраста и местоположения в склере, в связи с чем наблюдаются сильные вариации скорости звука в склере от 1690 до 1835 м/с [63].

Основная камера глаза, располагающаяся между хрусталиком и сетчаткой, заполнена стекловидным телом, которое развивается из внутреннего слоя глазного бокала. Стекловидное тело на 90% состоит из воды и хорошо пропускает ультразвук, вследствие чего на акустических изображениях внутренняя область выглядит темной. Однако при попадании в область

получения акустического изображения поверхности стекловидного тела может происходить сильное отражение [163].

С возрастом происходит формирование передней камеры глаза, а также появляются такие образования как ресничное тело и конъюнктивный мешок. Передняя камера, как и конъюнктивный мешок, заполнена жидкостью, что хорошо видно на акустических изображениях (рисунок 3.20А). Ресничное тело содержит гладкомышечные волокна, которые дают хороший акустический контраст благодаря наличию структурных белков.

Возможно, для получения большего количества информации и наглядности будет целесообразным провести дополнительную серию опытов, в результате которых будет виден глазной стебелек и одновременно в область сканирования попадет головной мозг. Для этого сканирование нужно проводить с затылочной области.

Значительным изменениям в процессе роста подвергается опорно-двигательная система эмбрионов, что связано не только с изменением структуры, но и механических свойств костной ткани. Исследование развития скелета эмбрионов является как самостоятельной задачей (нарушения кальциевого обмена, диагностика на ранних стадиях развития таких заболеваний как, например, остеопороз и т.д.), так и входит в состав комплексного исследования объектов (формирование скелета является диагностическим признаком при исследованиях, проводящихся в невесомости, отражает экологию среды обитания и т.д.). Однако большинство методик для исследования скелета являются трудоемкими и длительными. Оценим возможности применения акустической микроскопии для исследования скелета конечностей японского перепела.

На ранних стадиях, как уже говорилось, закладки костей на акустических изображениях выглядят менее контрастными. Это обусловлено наличием большого количества пор, внутри которых происходят множественные переотражения, и слабой минерализацией ткани. По мере роста костной ткани, она все больше уплотняется и становится максимально контрастной. При сканировании трубчатых костей возможно появление артефактов и сложностей трактовки изображения из-за их цилиндрического строения [164]. При этом если акустические ворота не охватывают кость целиком или произошло смещение объекта, возможно появление срезов кости, на которых видна внутренняя полость. На более поздних стадиях получение изображений осевого скелета и поясов конечностей затруднено, т.к. в связи с ростом размеров тела, получение качественных ультразвуковых изображений на большой глубине невозможно. Кроме того, активно растущий перьевой покров затрудняет прохождение ультразвука вглубь тканей.

Необходимо отметить, что кости обладают высоким акустическим контрастом по сравнению с соседними мягкими тканями, что позволяет получить изображения высокого

качество. Однако большая часть звука отражается на границе раздела мягкие ткани – кость и не проходит вглубь образца. Благодаря этому за ней в мягких тканях получается так называемая акустическая тень, которая выглядит как фрагмент изображения темного цвета (рисунок 3.23В в районе коленного сустава). На этом участке изображения идет потеря информации о состоянии подлежащих тканей. На ранних сроках развития это практически незаметно, т.к. участки окостенения относительно невелики. На более поздних этапах избежать этого позволит повторное сканирование с изменением позиции эмбриона относительно акустической линзы. В результате сравнения акустического и оптического изображения можно с уверенностью утверждать, что все детали скелета достаточно хорошо видны на С-сканах. Возможно проведение количественного анализа закладок костей.

В перспективе практически важным было бы исследовать развитие костей черепа и осевого скелета. Позвоночник удобнее всего сканировать так же в сагиттальной плоскости, когда все естественные изгибы не окажут влияния на качество изображения, в то время как череп необходимо сканировать с нескольких позиций ввиду его сложной сферической поверхности и наличие множества мелких костей.

При изучении влияния тех или иных факторов окружающей среды на организм большое значение имеет оценка морфофункционального состояния кожных покровов, поскольку кожа интегрально отражает состояние многих внутренних органов и систем, а также всего организма в целом. При этом особенно важно проводить неоднократные повторные наблюдения в динамике, в процессе воздействия исследуемых факторов. Так как в доступной литературе полных и детальных сведений о развитии перьевого покрова эмбрионов птиц практически нет [165, 166], были проведены не только ультразвуковые исследования на каждой стадии, но также получены гистологические препараты, позволяющие детально изучить строение ювенального пуха.

Развитие кожи у птиц делится на три периода. Во время первого периода (со второго по седьмой день развития) происходит гистогенез эпителия и соединительной ткани. Кожные закладки перьев появляются в виде концентрации клеток, этот процесс индуцируется несколькими органами, в первую очередь нервной трубкой. Во время второго периода дифференцируются слои кожи и появляются закладки перьев (с восьмого по пятнадцатый день развития). Индуцированный эпидермис сам продолжает нормальное развитие перьев. После дифференцировки эпидермис индуцирует передне-заднюю ориентацию пера и образование мезодермального осевого цилиндра. Начиная с пятнадцатого дня развития наступает третий период, во время которого развиваются гистологические структуры характерные для данного вида птиц. Третий период заканчивается перед вылуплением [167].

Для изучения перьевого и кожного покрова японского перепела наибольший интерес представляла вторая стадия развития кожи. В доступной литературе, посвященной эмбриогенезу кожи у птиц, были найдены сведения лишь о развитии кожи и перьевого покрова у эмбрионов кур. Общий план развития кожи и перьев сходен у эмбрионов кур и перепелов, основные отличия проявляются лишь в том, что эмбрионы перепела проходят все те же стадии развития, что и куры, но несколько быстрее, в результате чего вторая стадия у перепела начинается на седьмые сутки развития. На седьмой день эмбрионального развития только начинается развитие пера. Клетки мезенхимы формируют сосочек, над которым утолщается слой эпидермиса. Так формируется перьевого зачаток [168]. Перья по всей поверхности тела развиваются не одинаково. В каждой из областей, называемых птерилиями, перо начинает развиваться с участка, где зачатки появляются раньше всего (индукционный центр). Птерилии ограничены друг от друга, из-за чего у одного и того же эмбриона в каждой птерилии перья находятся на разных стадиях развития (рисунок 3.23А,Б) [167]. Для примера были взяты различные птерилии. На акустическом изображении поясничного отдела все зачатки перьев имеют одинаковый размер и расположены метамерно, т.к. закладки перьев формировались над каждым миотомом.

Начиная с восьмых суток развития и далее, в коже вокруг пера начинает образовываться углубление, которое положит начало будущей перьевого сумке [168], а благодаря активному отложению кератина повышается акустическая контрастность этих структур.

На поздних стадиях эмбрионального развития формирование пуха заканчивается, в течение третьего периода развития пера будет происходить удлинение и ороговение зачатка.

Проведенное в рамках данного раздела исследование позволило не только обосновать интерпретацию изображений, полученных с помощью акустической микроскопии, но и получить новые данные о развитии одной из наименее изученных систем перепела – кожи и ее производных, перьев [169].

Скорость развития отдельных систем органов может служить диагностическим признаком нормального развития. Известно, что в невесомости замедляется развитие эмбрионов перепела, также замедляется дифференцировка кожного покрова и образование его производных [144]. Таким образом, хорошая корреляция акустомикроскопических и оптических изображений кожного покрова и перьев показывает, что метод акустической микроскопии эффективен для проведения экспресс-диагностики нормального развития кожных покровов и, как следствие, самого эмбриона птиц.

Сравнительный анализ данных, полученных неинвазивным способом в акустическом микроскопе и в оптическом микроскопе после вскрытия и фиксации эмбрионов позволил на акустических изображениях идентифицировать отдельные органы и элементы внутреннего

строения. Установлено, что на акустических изображениях не возникает существенных искажений при передаче локализации органа, его характерной формы и размеров в отдельных сечениях. Так же стоит подчеркнуть, что возможность сохранить на компьютере весь объем полученных во время сканирования данных существенно сокращает время будущих исследований, т.к. нет необходимости возвращаться к биологическому образцу и проводить повторное сканирование, достаточно воспользоваться сохраненным файлом со всеми количественными характеристиками. Более того, для нефиксированных, живых объектов и в ходе эксперимента метод позволяет запечатлеть текущее состояние и наблюдать дальнейшую динамику.

Заключение

В ходе данного исследования разработан новый комплексный метод для визуализации микроанатомического строения и оценки биофизических свойств тканей и органов в процессе их эмбрионального развития без фиксации, изготовления препаратов, окрашивания или контрастирования, позволивший впервые провести детальное исследование акустических свойств эмбриональных тканей птиц в норме и установить характер их изменений при возникновении некоторых патологических состояний. Полученные с помощью акустического микроскопа изображения позволили провести детальный микроанатомический анализ внутреннего строения эмбрионов перепела и отдельных его систем в процессе эмбрионального развития. Показана эффективность использования методов акустической микроскопии для выявления изменений состояния и свойств эмбриональных тканей при воздействии различных фиксирующих агентов. Был проведен углубленный анализ эмбриотропного действия факторов космического полета на примере перепела *Coturnix coturnix japonica dom.* и оценено влияние на развивающийся организм измененной газовой среды.

Полученные результаты позволили создать теоретические и практические основы для широкого внедрения сравнительно нового научного метода – акустической микроскопии, – в экспериментальные исследования в области биофизики и биологии развития. Разработаны научно-методические подходы практического применения акустической микроскопии для решения разнообразных задач экспериментальной биологии, в том числе для оценки морфофункционального состояния эмбриональных тканей в норме, при различных неблагоприятных воздействиях или наличии патологических изменений. Полученные новые данные об особенностях внутреннего микроанатомического строения эмбрионов и акустических свойствах эмбриональных тканей расширяют представление о процессах формообразования и дифференцировки в норме и патологии.

Результаты диссертации имеют фундаментальное и прикладное значение и могут найти применение как в научно-экспериментальных исследованиях в области биофизики, биотехнологии, морфологии, общей патологии, так и при создании новых биофизических приборов и методов.

Полученные данные открывают для исследователей новые горизонты, в том числе в космической биологии. Проведенные на данный момент исследования продемонстрировали уникальные результаты, но также обозначили поле для будущей деятельности в этом направлении.

Практические рекомендации

1. Внедрить в рутинную научно-практическую деятельность кафедр эмбриологии, гистологии и биофизики разработанную совокупность неразрушающего количественного комплексного анализа минерализованных тканей.

2. Новые данные о морфологических и биофизических особенностях эмбриональных тканей и органов необходимо использовать в качестве базисных при разработке технических условий для создания новых приборов и неинвазивных методов для нужд экспериментальной биологии, космической биологии, фармакологии, токсикологии, медицины и при исследовании эмбриотропного действия окружающей среды.

3. Разработанные научно-методические подходы исследования объектов биологии развития с использованием акустической микроскопии были применены при создании новых специализированных моделей акустических микроскопов и совершенствовании существующих ультразвуковых приборов, предназначенных для экспериментальной биологии и медицины.

Акустическая микроскопия в биологии и медицине предоставляет собой новый и перспективный инструмент экспресс исследования, сравнения с ранее полученными и сохраненными данными (как с нормой и контролем, так и с патологией), не изменяющий исходный материал и не мешающий дальнейшему использованию материала в других исследованиях и экспериментах [170].

Выводы

Основные результаты могут быть сформулированы следующим образом:

1. Впервые проведены постадийные ультразвуковые исследования внутреннего строения эмбрионов японского перепела *in vivo* с 1 по 11 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).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность доктору биологических наук Людмиле Александровне Денисовой, за обучение основам акустической микроскопии в биологии и постановке актуальных задач в диссертационной работе, а также сотрудниками ИМБП РАН профессору, кандидату биологических наук, ведущему научному сотруднику Тамаре Сергеевне Гурьевой, и научному сотруднику, эмбриологу, Ольге Алексеевне Дадашевой за предоставление уникального биологического материала и научное консультирование по теме диссертационной работы.

Список литературы

1. Balaban, R.S. Challenges in Small Animal Noninvasive Imaging / R.S. Balaban, V.A. Hampshire // *ILAR journal*. – 2001. – Vol. 42. – P. 248-262.
2. Gilbert, S. *Developmental biology* / S. Gilbert, M. Barresi. – 11 edition. – Sinauer : Associates Oxford University Press, 2016. – 500 p.
3. Ромер, А. *Анатомия позвоночных: в 2 т.* / А. Ромер, Т. Парсонс. – М.: Мир, 1992. – 2 т.
4. 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.
5. Foster, F.S. Advances in ultrasound biomicroscopy / F.S. Foster, C.J. Pavlin, K.A. Harasiewicz et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 2000. – Vol. 26. – P. 1-27.
6. Маев, Р.Г. *Акустическая микроскопия. Состояние и перспективы.* / Р.Г. Маев // *Вестник АН СССР*. – 1988. – № 2. – С. 74-84.
7. Маев, Р.Г. *Методы акустической микроскопии в исследовании микроструктуры и физико-химических свойств материалов: дис. ...д-ра физ.-мат. наук : 01.04.01* / Маев Роман Григорьевич. – М., 2002. – 243 с.
8. Briggs, G.A.D. *Acoustic microscopy* / G.A.D. Briggs. – Oxford : Clarendon Press, 1992. – 496 p.
9. Briggs, G.A.D. *Acoustic microscopy* / G.A.D. Briggs, M. Hoppe // *Images of materials*. – 1991. – P. 154-172.
10. 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.
11. Маев, Р.Г. *Акустическая микроскопия* / Р.Г. Маев. – М.: Торус Пресс, 2005. – 402 с.
12. Saijo, Y. The ultrasonic properties of gastric cancer tissues obtained with a scanning acoustic microscope system / Y. Saijo, M. Tanaka, H. Okawai et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1991. – Vol. 17. – P. 709-714.
13. Saijo, Y. Ultrasonic tissue characterization of infarcted myocardium by scanning acoustic microscopy / Y. Saijo, M. Tanaka, H. Okawai et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1997. – Vol. 23. – P. 77-85.
14. Bereiter-Hahn, J. Probing Biological cells and tissues with acoustic microscopy / J. Bereiter-Hahn // *Advances in Acoustic Microscopy*. – 1995. – Vol.1. – P. 79-115.

15. 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.
16. 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.
17. Turnbull, D.H. Ultrasound backscatter microscope analysis of mouse melanoma progression / D.H. Turnbull, J.A. Ramsay, G.S. Shivji et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1996. – Vol. 22 (7). – P. 845-853.
18. Zhou, Y.Q. Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic resonance imaging / Y.Q. Zhou, F.S. Foster, B. J. Nieman et al. // *Physiol Genomics.* – 2004. – Vol. 18. – P. 232-244.
19. Zhou, Y.Q. Applications for multifrequency ultrasound biomicroscopy in mice from implantation to adulthood / Y.Q. Zhou, F.S. Foster, D.W. Qu et al. // *Physiol Genomics.* – 2002. – Vol. 10. – P. 113-126.
20. Eggleton, R.C. Mouse embryo heart in organ culture visualized by the acoustic microscope / R.C. Eggleton, L.W. Kessler // *Ultrasound in medicine.* – 1975. – Vol. 1. – P. 437.
21. O'Brien, W.D. Examination of mouse embryological development with an acoustic microscope / W.D. O'Brien, L.W. Kessler // *Am. Zool.* – 1985. – Vol. 15. – P. 807.
22. Ahmed, M. Microanatomy of a histologically unstained embryo as revealed by acoustic microscopy / M. Ahmed, L.W. Kessler // *Acoustical Holography.* – 1975. – Vol. 6. – P. 319-325.
23. Kessler, L.W. Acoustic microscopy / L.W. Kessler // *ASM Handbook Materials Characterization* : 9 edition. – 1996. – Vol. 17. – P. 465-482.
24. Дабагян, Н.В. Объекты биологии развития / Н.В. Дабагян, Л.А. Слепцова. – М. : Наука, 1975. – С. 442-463.
25. Guryeva, T.S. The quail embryonic development under the conditions of weightlessness / T.S. Guryeva, O.A. Dadasheva, G.I. Meleshko et al. // *Acta Vet Brno.* – 1993. – Vol. 62. – P. 25-30.
26. Dadasheva, O.A. Bone and muscular tissue development in embryos and newly hatched quails incubated in weightlessness / O.A. Dadasheva, T.S. Guryeva // *Acta Vet Brno.* – 1993. – Vol. 62 (6). – P. 51-59.
27. Ricklefs, R.E. Avian embryonic growth / R.E. Ricklefs, J.M. Starck. – New York : Oxford University Press, 1998. – P. 31-58.

28. Woodard, A.E. Japanese quail husbandry in the laboratory (*Coturnix coturnix japonica*) / A.E. Woodard, H. Abplanalp, W.O. Wilson, P. Vohra. – Davis : Department of Avian Sciences University of California, 1973. – P. 22.
29. Padgett, C.S. The normal embryology of the *Coturnix* quail / C.S. Padgett., W.D. Ivey // *Anat Rec.* – 1960. – Vol. 137. – P. 1-11.
30. Tsudzuki, M. Hereditary multiple malformation in Japanese quail: A possible powerful animal model for morphogenetic studies / M. Tsudzuki, Y. Nakane, A. Wada // *J. Hered.* – 1998. – Vol. 89. – P. 24-31.
31. Nakane, Y. Development of the skeleton in Japanese quail embryos / Y. Nakane, M. Tsudzuki, A. Wada // *Develop. Growth Differ.* – 1999. – Vol. 41. – P. 523-534.
32. Ainsworth, S. J. Developmental stages of the Japanese quail / S.J. Ainsworth, R.L. Stanley, D.J.R. Evans // *J. Anat.* – 2010. – Vol. 216. – P. 3-15.
33. Роскин, Г.И. Микроскопическая техника / Г.И. Роскин, Л.Б. Левинсон. – 3-е издание. – М. : Советская наука, 1957. – 468 с.
34. Doroski, D. Study of biomedical specimens using scanning acoustic microscopy / D. Doroski, B.R. Tittmann, C. Miyasaka // *Acoustical Imaging.* – 2007. – Vol. 28. – P. 13-20.
35. Yao, S. Equally sloped X-ray microtomography of living insects with low radiation dose and improved resolution capability / S. Yao, J. Fan, Y. Zong et al. // *Appl. Phys. Lett.* – 2016. – Vol. 108. – 123702.
36. Maev, R.Gr. New generation of High resolution Ultrasonic Imaging technique for advanced material characterization: Review / R.Gr. Maev // *Acoustical Imaging.* – 2008. – Vol. 29. – P. 163-172.
37. Tittmann, B.R. Technique for Visualization of Anisotropy of Biomedical Tissue by ShearWave / B.R. Tittmann, C. Miyasaka, E.Y. Maeva et al. // *Acoustical Imaging.* – 2011. – Vol. 30. – P. 113-118.
38. Salvesen, K.A. Ultrasound during pregnancy and birthweight, childhood malignancies and neurological development / K.A. Salvesen, S.H. Eik-Nes // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1999. – Vol. 25 (7). – P. 1025-1031.
39. Hopp, T. Image fusion of Ultrasound Computer Tomography volumes with X-ray mammograms using a biomechanical model based 2D/3D registration / T. Hopp, N. Duric, N.V. Ruiter // *Computerized Medical Imaging and Graphics.* – 2015. – №40. – P. 170-181.

40. Акопян, В. Б. Ультразвук в медицине, ветеринарии и биологии : учебное пособие для бакалавриата и магистратуры / В. Б. Акопян, Ю. А. Ершов. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : ЮРАЙТ, 2018. – 223 с.
41. Соколов, С.Я. Авторское свидетельство / С.Я. Соколов. - № 49426. – кл.42, 31.08. 1936.
42. Соколов, С.Я. Ультразвуковой микроскоп / С.Я. Соколов // ДАН СССР. – 1949. – Т. 64 (3). – P. 333-335.
43. Miller, A.J. Application of acoustic microscopy in the semiconductor industry / A.J. Miller // Acoustical Imaging Proceedings. – 1982. – P. 67-68.
44. Miller, A.J. Scanning acoustic microscopy in electronics research / A.J. Miller // IEEE Transaction Sonics Ultrasonics. – 1985. – Vol. 32. – P. 411-421.
45. Crean, G.M. Acoustic microscopy analysis of microelectronic interconnection and packaging technologies / G.M. Crean, C.M. Flannery, S.C. O'Mathuna // Advances in acoustic microscopy / New York : Plenum Press., 1995. – P. 1-49.
46. Chapman, G.B. Polymer composites for improved automotive energy efficiency / G.B. Chapman // Physical sciences and advanced vehicle technologies. Proceed. of the Symp., 2000. – P. 7-49.
47. Mason, T.J. Ultrasound in environmental protection : book review / T.J. Mason, A. Tiehm // Ultrasonics. – 2001. – Vol. 39. – P. 469.
48. Quate, C.F. Acoustic microscope with mechanical scanning – a review / C.F. Quate, A. Atalar, H.K. Wickramasinghe // IEEE. – 1979. – Vol. 67. – P. 1092-1114.
49. Hildebrand, J.A. Acoustic microscopy of living cells / J.A. Hildebrand, D. Rugar, R.N. Johnston et al. // Biophysics. – 1981. – Vol. 78 (3). – P. 1656-1660.
50. Hildebrand, J.A. Measurement cellular elastic properties by acoustic microscopy / J.A. Hildebrand, D. Rugar // J. Microscopy. – 1984. – Vol. 134. – P. 245-260.
51. Hoppe, M. Applications of scanning acoustic microscopy – survey and new aspects / M. Hoppe, J. Bereiter-Hahn IEEE // Trans. Sonics Ultrasound. – 1985. – Vol. 2. – P. 289-301.
52. Bereiter-Hahn, J. Cells as seen with the acoustic microscope / J. Bereiter-Hahn, C. Blasé, T. Kundu et al. // Acoustical Imaging. – 2002. – Vol. 26. – P. 83-90.
53. Lindner, A. Acoustic imaging of the mitotic spindle in dividing XTH2-Cells / A. Lindner, S. Winkelhaus, M. Hauser // Acoustical Imaging. – 1992. – Vol. 19. – P. 523-528.

54. Okawai, H. An Approach to Acoustic Properties of Biological Tissues Using Acoustic Micrographs of Attenuation Constant and Sound Speed / H. Okawai, K. Kobayashi, S. Nitta // *Ultrasound Med.* – 2001. – Vol. 20. – P. 891-907.
55. Van der Steen, A.F.W. . Preparation techniques in acoustical and optical microscopy of biological tissues. A study at 5MHz and 1.2 GHz / A.F.W. Van der Steen, M.H.M. Cuypers, J.M. Thijssen et al. // *Acoustical imaging.* – 1992. – Vol. 19. – P. 529-533.
56. Van der Steen, A.F.W. Effect of tissue-processing techniques in acoustic and light microscopy / A.F.W. Van der Steen, J.M. Thijssen, G.P.J. Ebben et al. // *Histochem. J.* – 1992. – Vol. 97. – P. 195-199.
57. Sasaki, H. Acoustic properties of dialysed kidney by scanning acoustic microscopy / H. Sasaki, Y. Saijo, M. Tanaka et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 1997. – Vol. 12. – P. 2151-2154.
58. Maev, R.G. Acoustic microscopy application for observing microstructure of bones and bone-implant system / R.G. Maev, R.M. Pilliar, V.M. Levin et al. // *Acoustical Imaging.* – 1996. – Vol. 22. – P. 323-328.
59. Kolosov, O.V. The use of acoustic microscopy for biological tissue characterization / O.V. Kolosov, V.M. Levin, R.G. Maev et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1987. – Vol. 13. – P. 477-483.
60. Кулаков, М.А. Акустический микроскоп с высоким разрешением / М.А. Кулаков, А.И. Морозов // *Электронная промышленность.* – 1983. – №6. – С. 36-37.
61. Fields, S. Correlation of echographic vizualizability to tissue with biological composition and physiological state / S. Fields, F. Dunn // *J. Acoust. Soc. Amer.* – 1973. – Vol. 54. – P. 809-812.
62. O'Brien, W.D. The relationships between collagen and ultrasound attenuation and velocities in tissue / W.D. O'Brien // *Ultrasonics Intern.* – 1977. – P. 194-205.
63. 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.
64. Хэм, А. Гистология : в 5 т. / А. Хэм, Д. Кормак. – М.: Мир, 1982-1983. – 5 т.
65. Itoh, K. Studies of the relationship between acoustic patterns produced by liver carcinoma in ultrasonography and in scanning acoustic microscopy / Itoh K., Gosung G., Jeno E. et al. // *Asian Medical Journal.* – 1983. – Vol. 26 (9). – P. 585-597.

66. Berube, L.R. Use of a high-frequency ultrasound microscope to image the action of 2-nitroimidazoles in multicellular spheroids / L.R. Berube, K. Harasiewicz, F.S. Foster et al. // *Brit. J. Cancer.* – 1992. – Vol. 65. – P. 633-640.
67. Berson, M. High-resolution real-time ultrasonic scanner / M. Berson, L. Valiant, F. Patat et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1992. – Vol. 18. – P. 471-478.
68. Turnbull, D.H. A 40-100 MHz B-scan ultrasound backscatter microscope for skin imaging / D.H. Turnbull, B.G. Starkoski, K.A. Harasiewicz et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1995. – Vol. 21 (1). – P. 79-88.
69. Milner, S.M. The histological interpretation of high frequency cutaneous ultrasound imaging / S.M. Milner, O.M. Memar, G. Gherardini et al. // *J. Dermatol. Surg.* – 1997. – Vol. 23. – P. 43-45.
70. Wollina, U. Calculation of nail plate and nail matrix parameters by 20 MHz ultrasound in healthy volunteers and patients with skin disease / U. Wollina, M. Berger, K. Karte // *Skin Res. and Technol.* – 2001. – Vol. 7. – P. 60-64.
71. Fournier, C. In vivo normal human dermis characterization by 20-MHz ultrasound backscatter / C. Fournier, S.L. Bridal, G. Berger et al. // *Proc. IEEE Ultrasonics Symp.* – 2000. – P. 1303-1306.
72. Seidenary, S. Echographic evaluation with image analysis of normal skin: variations according to age and sex / S. Seidenary, A. Pagnoni, A. Di Nardo et al. // *Skin Pharmacol.* – 1994. – Vol. 7. – P. 201-209.
73. Lebertre, M. Human dermis ultrasound characterization: backscattering parameters between 22-45 MHz / M. Lebertre, F. Ossant, J. Bouyer et al. // *Proc. IEEE Ultrasonics Symp.* – 2000. – P. 1371-1374.
74. Pan, L. In vivo frequency ultrasound Assessment of skin elasticity / L. Pan, L. Zan, F.S. Foster // *Proc. IEEE Ultrasonics Symp.* – 1997. – P. 1088-1091.
75. Kleinerman, R. Ultrasound in dermatology: principles and applications / R. Kleinerman, T. Whang, R. Bard et al. // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2012. – Vol. 67 (3). – P. 478-487.
76. Lethiecq, M. Principles and applications of high-frequency medical imaging / M. Lethiecq, M. Berson, G. Feuillard et al. // *Advances in Acoustic Microscopy.* – 1995. – Vol. 2. – P. 39-102.
77. Passman, C. Adaptive 150 MHz Ultrasound imaging of the skin and eye using an optimal combination of short pulse mode and pulse compression mode / C. Passman, H. Ermert // *Proc. IEEE Ultrasonics Symp.* – 1995. – P. 1291-1294.

78. Gniadecka, M. Age-related diurnal changes of dermal oedema: evaluation by high-frequency ultrasound / M. Gniadecka, J. Serup, J. Sondergaard // *Journ. Dermatol.* – 1994. – Vol. 131. – P. 849-855.
79. Serup, J. Ultrasound for assessment of allergic and irritant patch test reactions / J. Serup, B. Staberg // *Contact Dermatitis.* – 1987. – Vol. 17. – P. 80-84.
80. Broby-Johansen, U. Ranking of the antipsoriatic effect of various topical corticosteroids applied under a hydrocolloid dressing: skin thickness, blood flow and colour measurements compared to clinical assessments / U. Broby-Johansen, T. Karlsmark, L.J. Peterson et al. // *Clin Exp. Dermatol.* – 1990. – Vol. 15. – P. 343-348.
81. Hoffman, K. Skin tumours in high-frequency ultrasound / K. Hoffman, S. El Gammal, K. Winkler et al. // *Ultrasound in dermatology.* – 1992. – P. 171-180.
82. Serup, J. Characterization of contact dermatitis and atopy using bioengineering techniques – a survey / J. Serup // *Acta Dermatol. Venereol.* – 1992. – Suppl. – P. 177-182.
83. Gupta, A.K. High frequency 40 MHz ultrasound. A possible non-invasive method for the assessment of the boundary of basal cell carcinomas / A.K. Gupta, D.H. Turnbull, F.S. Foster // *Dermatol. Surg.* – 1996. – Vol. 22. – P. 131-136.
84. Stiller, M.J. Three-dimensional imaging for diagnostic ultrasound in dermatology / M.J. Stiller, J. Driller, J.L. Shupak et al. // *J. Amer. Acad. Dermatol.* – 1993. – Vol. 29. – P. 171-175.
85. Agner, T. Quantification of the DMSO-response – a test for assessment of sensitive skin / T. Agner, J. Serup // *Clin. Exp. Dermatol.* – 1989. – Vol. 14. – P. 214-217.
86. Pulgiese, P.T. Use of ultrasound in evaluation of skin care products / P.T. Pulgiese // *Cosmet. Toil.* – 1989. – Vol. 104. – P. 61-75.
87. Agner, T. Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods / T. Agner, J. Serup // *Contact Dermatitis.* – 1989. – Vol. 20. – P. 352-359.
88. Agner, T. Seasonal variation of skin resistance to irritants / T. Agner, J. Serup // *Br. Journ. Dermatol.* – 1989. – Vol. 121. – P. 323-328.
89. Agner, T. Individual and instrumental variations in irritant patch-test reactions – clinical evaluation and quantification by bioengineering methods / T. Agner, J. Serup // *Clin Exp. Dermatol.* – 1990. – Vol. 15. – P. 29-33.
90. El-Hammal, S. A 50 MHz high-resolution ultrasound imaging system for dermatology / S. El-Hammal, K. Hoffman, T. Auer et al. // *Ultrasound in dermatology.* – 1992. – P. 297-322.

91. Raju, B.I. High-frequency ultrasonic attenuation and backscatter coefficients of in vivo normal human dermis and subcutaneous fat / B.I. Raju, M.A. Srinivasan // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 2001. – Vol. 27 (11). – P. 1543-1556.
92. De Rigal, J. Assessment of aging of the human skin in vivo / J. De Rigal, C. Escoffier, B. Querleux et al. // *Ultrasound imaging.* – 1989. – Vol. 93. – P. 621-625.
93. Schatz, H. Ultrasound: applications in the study of human skin disorders and the response to treatment / H. Schatz, T. Stoudemayer, A.M. Kligman // *Ultrasound in dermatology.* – 1992. – P. 256-263.
94. O'Brien, W.D. Quantitative acoustical assessment of wound maturation with acoustic microscopy / W.D. O'Brien, J. Olerud, K.K. Shung et al. // *J. Acoust. Soc. Amer.* – 1981. – Vol. 69 (2). – P. 575-579.
95. Olerud, J.E. Correlation of tissue constituents with the acoustic properties of skin and wound / J.E. Olerud, W.D. O'Brien, M.A. Riederer-Henderson et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1990. – Vol. 16. – P. 55-64.
96. Saijo, Y. Visualization of Microvessels in Skin by Three-Dimensional Ultrasound Microscope / Y. Saijo, K. Kobayashi, N. Hozumi et al. // *Acoustical Imaging.* – 2011. – Vol. 30. – P. 107-112.
97. Edwards, C. Ultrasound velocities in skin components. International society for Bioengineering and the skin / C. Edwards, P.A. Payne // *Ultrasound in dermatology.* – 1984. – P. 187-189.
98. Escoffier, C. In vitro study of the velocity of ultrasound in the skin / C. Escoffier, B. Querleux, J. De Rigal et al. // *Bioeng. Skin.* – 1986. – Vol. 2. – P. 87-94.
99. Altmeyer, P. General phenomena of ultrasound in dermatology / P. Altmeyer, K. Hoffman, M. Stucker et al. // *Ultrasound in dermatology.* – 1992. – P. 55-79.
100. Pavlin, C.J. Clinical application of ultrasound biomicroscopy / C.J. Pavlin, R. Harasiewicz, F.S. Foster // *Ophthalmology.* – 1991. – Vol. 98. – P. 287-295.
101. Sherar, M.D. A 100 MHz B-scan ultrasound backscatter microscope / M.D. Sherar, B.G. Starkoski, W.B. Taylor et al. // *Ultrason. Imaging.* – 1989. – Vol. 11. – P. 95-104.
102. Foster, F.S. Ultrasound backscatter microscopy of the eye in vivo / F.S. Foster, C.J. Pavlin, B. Starkoski et al. // *Proc. IEEE Ultrasonics Symp.* – 1990. – P. 1481-1484.
103. Pavlin, C.J. High frequency ultrasound biomicroscopy / C.J. Pavlin, F.S. Foster // *Ophthalmol. Clin.* – 1994. – Vol. 7. – P. 509-522.

104. Pavlin, C.J. Ultrasound biomicroscopy of the eye / C.J. Pavlin, F.S. Foster. – New York : Springer-Verlag, 1995. – 280 P.
105. Pavlin, C.J. Ultrasound biomicroscopy of anterior segment tumours / C.J. Pavlin, J.A. McWhae, F.S. Foster // *Ophthalmology*. – 1992. – Vol. 99. – P. 1220-1228.
106. Pavlin, C.J. Ultrasound biomicroscopy in the assessment of anterior scleral disease / C.J. Pavlin, M. Easterbrook, J.J. Hurwitz et al. // *J. Ophthalmol.* – 1993. – Vol. 116. – P. 628-635.
107. Mannino, G. A review of the role of ultrasound biomicroscopy in glaucoma associated with rare diseases of the anterior segment / G. Mannino, B. Abdolrahimzadeh, S. Calafiore et al. // *Clinical Ophthalmology*. – 2016. – № 10. – P. 1453–1459.
108. Foster, F.S. Principles and application of ultrasound backscatter microscopy / F.S. Foster, C.J. Pavlin, G.R. Lockwood et al. // *Proceed. IEEE UFFC*. – 1993. – № 40. – P. 608-616.
109. Silverman, R.H. Improved system for sonographic imaging and biometry of the cornea / R.H. Silverman, D.Z. Reinstein, T. Raevsky et al. // *Ultrasound in Med. and Biol.* – 1997. – Vol. 16. – P. 117-124.
110. Lizzi, F.L. High-resolution 3-dimensional visualization and morphological assays of the in-vivo ciliary body / F.L. E.J. Lizzi, Feleppa, A. Kalisz et al. // *Proceed. IEEE Ultrasonics Symp.* – 2000. – P. 1421-1423.
111. Silverman, R.H. Three-dimensional high-frequency ultrasonic parameter imaging of anterior segment pathology / R.H. Silverman, M.J. Rondeau, F.L. Lizzi et al. // *Ophthalmology*. – 1995. – Vol. 102. – P. 837-843.
112. Lizzi, F.L. Ocular tumor treatments with focused ultrasound: effects of beam geometry, tissue morphology, and adjacent tissues / F.L. Lizzi, C.X. Deng, S.K. Alam // *Proceed. IEEE Ultrasonics Symp.* – 2000. – P. 1299-1301.
113. Saied, A. Detection of early bone and cartilage remodeling in a rat model of osteoarthritis by high resolution echography / A. Saied, H. Gaucher, C. Guingamp et al. // *Inflammatory Res.* – 1995. – Vol. 44. – P. 255-257.
114. Saied, A. Assessment of articular cartilage and subchondral bone subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro / A. Saied, E. Cherin, H. Gaucher et al. // *J. Bone Mineral Res.* – 1997. – Vol. 12. – P. 1378-1386.
115. Marmor, M.F. Acoustic microscopy of the human retina and pigment epithelium / M.F. Marmor, H.K. Wickramasinghe, R.A. Lemons // *Invest. Ophthalmol Vic. Sci.* – 1977. – Vol. 16. – P. 660-666.

116. Raum, K. Bone microstructure and elastic tissue properties are reflected in QUS axial transmission measurements / K. Raum, I. Leguerney, F. Chandelier et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 2005. – Vol. 31 (9). – P. 1225-1235.
117. Lemkamp, M. Quantification of bone maturity using scanning acoustic microscopy / M. Lemkamp, L. Feuz, M. Hagenmuller et al. // *European Cells and Materials.* – 2003. – Vol. 5. – P. 77.
118. 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.
119. Khramtsova, E. Impulse acoustic microscopy: A new approach for investigation of polymer and natural scaffolds / E. Khramtsova, E. Morokov, K. Lukanina et al. // *Polymer Engineering and Science.* – 2017. – Vol. 57 (7). – P. 709-715.
120. 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.
121. Храмова, Е.А. Импульсная ультразвуковая микроскопия материалов и объектов тканевой инженерии / Е.А. Храмова, Е.С. Морокков, Т.Е. Григорьев, Е.А. Губарева, А.С. Сотниченко, Е.В. Кувда, В.М. Левин, Ю.С. Петронюк // *Ученые записки физического факультета Московского университета.* – 2017. – № 5. – С. 1750710.
122. 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.
123. 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. Zykova, Y.S. Petronyuk, V.M. Levin, V.A. Demina, N.G. Sedush, T.E. Grigoriev, S.N. Chvalun // *AIP Conference Proceedings.* – 2018. – P. 020138.
124. 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.
125. Greco, A. High Frequency Ultrasound for In Vivo Pregnancy Diagnosis and Staging of Placental and Fetal Development in Mice / A. Greco, M. Ragucci, A.R.D. Coda et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8 (10). – e77205.

126. 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.
127. Bamber, J.C. Ultrasonic propagation through fixed and unfixed tissues / J.C. Bamber, C.R. Hill, J.A. King et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1979. – Vol. 5 (2). – P. 159-165.
128. Baldwin, S.L. Measurements of the anisotropy of ultrasonic velocity in freshly excised and formalin-fixed myocardial tissue / S.L. Baldwin, K.R. Marutyan, K.D. Wallace et al. // *J. Acoust. Soc. Am.* – 2005. – Vol. 118 (1). – P. 505-513.
129. Денисова, Л.А. Морфо-механическая характеристика биологических тканей и синтетических медицинских материалов по данным акустической микроскопии : дис. ... док. биол. наук : 03.00.02, 03.00.25 / Денисова Людмила Александровна. – М., 2006. – 333 с.
130. 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.
131. Kundu, T. *Ultrasonic nondestructive evaluation (engineering and biological material characterization)* / Kundu T. – Boca Raton-London-New York-Washington : CRC Press, 2004. – 848 p.
132. Shenk, E.A. *Acoustical microscopy of red blood cells : technical note* / E.A. Shenk, R.W. Waag, A.B. Shenk et al. // *J.of Histochem. and Cytochem.* – 1988. – Vol. 36 (10). – P. 1341- 1351.
133. Jipson, J. B. *Acoustic microscopy of interior planes* / J. B. Jipson // *Appl. Phys. Lett.* – 1979. – Vol. 35 (5). – P. 385–387.
134. Attal, J. *Acoustic microscopy: Imaging microelectronic circuits with liquid metals* / J. Attal // *Scanned image microscopy.* – 1980. – P. 97–118.
135. Kundu ,T. *Cell property determination from the acoustic microscope generated voltage versus frequency curves* / T. Kundu, J. Bereiter-Hahn, I. Karl // *Biophysical Journal.* – 2000. – Vol. 78. – P. 2270-2279.
136. Feigl, T. *Biophysical effects of high-energy pulsed ultrasound on human cells* / T. Feigl, B. Volklein, H. Iro et al. // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 1996. – Vol. 22 (9). – P. 1267-1275.
137. Dalecki, D. *Mechanical bioeffects of ultrasound* / D. Dalecki // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2004. – Vol. 6. – P. 229-248.
138. Baker, K.G. *A review of therapeutical ultrasound : Biophysical effects* / K.G. Baker, V.J. Robertson, F.A. Duck // *Phys. Ther.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1351–1358.

139. Nyborg, W.L. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines / W.L. Nyborg // *Ultrasound in Med. & Biol.* – 2000. – Vol. 26 (6). – P. 911–964.
140. Maslov, K.I. High-frequency focusing transducer for acoustic microscope / K.I. Maslov, R.G. Maev, L.M. Dorozhkin et al. // *Acoustical Imaging.* – 1996. – Vol. 22. – P. 689-694.
141. Осипов, Л.В. Ультразвуковые диагностические приборы / Л.В. Осипов. – М. : Видар, 1999. – 235 с.
142. Белоусов, Л.В. О некоторых особенностях биологического действия ультразвука / Л.В. Белоусов, Л.Р. Гаврилов, Т.В. Остроумова, Л.В. Солонцова // *Акустический журнал.* – 1985. – Т. 31 (4). – С. 439-444.
143. Сидорова, Е. Возьмут ли птиц в полет / Е. Сидорова // *Наука в России.* – 2007. – № 2. – С. 23-28.
144. Серова, Л.В. Невесомость и онтогенез млекопитающих : актовая речь [Электронный ресурс] / Л.В. Серова // Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем. – 2002. – Режим доступа:
http://www.imbp.ru/webpages/win1251/Science/Serova_actsp.html.
145. Гапонов, В.А. Станция «Мир»: от триумфа до ... / В.А. Гапонов, А.Б. Железняков. – Санкт-Петербург : Система ЦНИИ РТК, 2006. – 160 с.
146. Burov, N.E. Clinical and experimental study of xenon anesthesia / N.E. Burov, L. Kornienko, G.N. Makeev et al. // *Anesteziol Reanimatol.* – 1999. – Vol. 6. – P. 56-60.
147. Куссмауль, А.Р. Биологическое действие криптона на животных и человека в условиях повышенного давления : дис. ... канд. биол. наук : 14.00.32 / Куссмауль Анна Рейнгольдовна. – М., 2007. – 191 с.
148. Dawson, A. A. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S / A. A. Dawson // *Stain Technology.* – 1926. – Vol. 1. – P. 123-124.
149. Weglein, R.D. Image resolution of the scanning acoustic microscope / R.D. Weglein, R.G. Wilson // *Appl. Phys. Lett.* – 1977. – Vol. 31 (12). – P. 793-796.
150. Maslov, K.I. Acoustic scanning microscope for investigation of subsurface defects / K.I. Maslov // *Acoustical Imaging.* – 1992. – Vol. 19. – P. 645-649.
151. Красильников, В.А. Введение в физическую акустику / В.А. Красильников, В.В. Крылов. – М. : Наука, 1985. – 479 с.

152. Голямина, И.П. Ультразвук : энциклопедия / И.П. Голямина. – М. : Советская энциклопедия, 1979. – 400 с.
153. Zacchei, A.M. Lo svilippo embrionale della guaglia giapponese (*Coturnix coturnix japonica* T. et S.) / A.M. Zacchei // Arch. ital. anat. ed embroil. – 1961. – Vol. 66 (1). – P. 36-62.
154. Chang, H.L. The relationship between indigenous animals and humans in APEC region / H.L. Chang, Y.C. Huang. – Taiwan : The Chinese Society of Animal Science, 2003. – 186 p.
155. Инкубатор [Текст] : пат. SU 812251 СССР : МПК: A01K 41/00 / Златорунский А.А., Полещук В.С., Котовская А.Р. и др.; заявитель и патентообладатель Самостоятельное конструкторско-технологическое бюро по разработке и проектированию биологических и физиологических приборов "Биофизприбор", Институт медико-биологических проблем. – № 2774030/30-15 ; заявл. 14.05.1979 ; опубл. 15.03.1981, Бюл. № 10.
156. Foster, F.S. In Vivo Imaging of Embryonic Development in the Mouse Eye by Ultrasound Biomicroscopy / F.S. Foster, M.Y. Zhang, A.S. Duckett et al. // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2003. – Vol. 44. – P. 2361-2366.
157. Селиванов, Е.В. Красители в биологии и медицине / Е.В. Селиванов. – Баранул : Азбука, 2003. – 40 с.
158. 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.
159. Быков, В.Л. Частная гистология человека : учебник / В.Л. Быков. – Санкт-Петербург : Сотис, 2001. – 468 с.
160. Bucsko, J. Imaging the eye with Very-High-Frequency Ultrasound / J. Bucsko // Radiology Today. – 2004. – Vol. 5 (19). – P. 10-18.
161. Островский, М.А. Молекулярные механизмы повреждающего света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения / М.А. Островский // Успехи биологической химии. – 2005. – Т. 45. – P. 173-204.
162. Raitelaitiene, R. Ultrasonic and biochemical evaluation of human diabetic lens / R. Raitelaitiene, A. Paunksnis, L. Ivanov et al. // Medicina (Kaunas) . – 2005. – Vol. 41 (8). – P. 641-648.
163. 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.

164. 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.
165. Бракин, В.Ф. Морфология сельскохозяйственных животных : анатомия с основами цитологии, эмбриологии и гистологии / В.Ф. Бракин, М.В. Сидорова. – М. : Гринлайт, 2008. – 616 с.
166. Шубникова, Е.А. Эпителиальные ткани / Е.А. Шубникова. – М. : МГУ, 1996. – 253 с.
167. Рольник, В.В. Биология эмбрионального развития птиц / В.В. Рольник. – Санкт-Петербург : Наука, 1968. – 424 с.
168. Селянский, В.М. Анатомия и физиология сельскохозяйственной птицы / В.М. Селянский. – М. : Колос, 1986. – 272 с.
169. 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.
170. 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.

Приложение А (обязательное).

Таблицы нормального развития эмбрионов японского перепела по данным акустической микроскопии

1 сутки

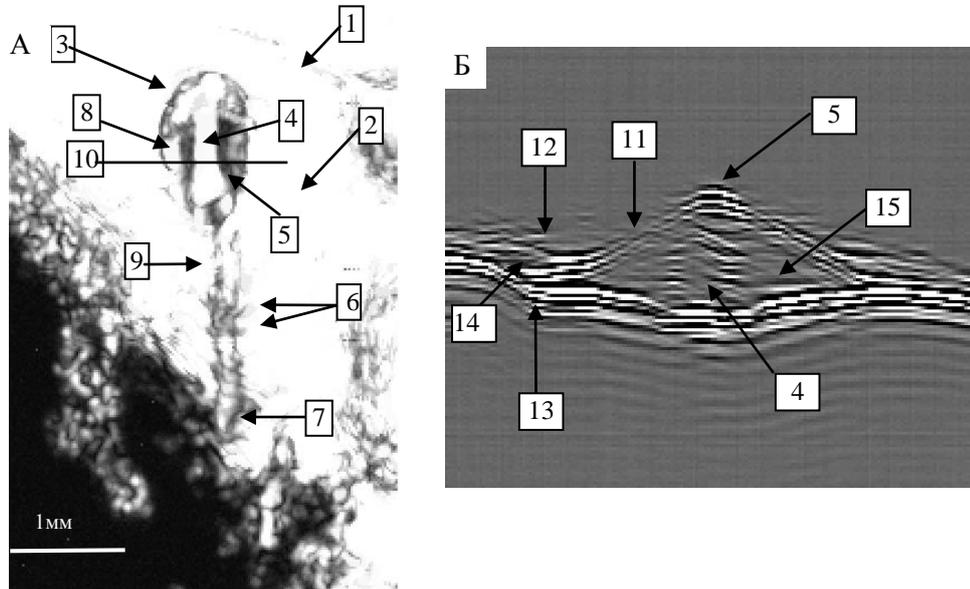


Рисунок А.1. Акустические изображения эмбриона перепела в 1-е сутки развития (А – С-скан: акустические ворота: 155 мкм, сразу от поверхности; длина зародыша – 3.5 мм; ширина головной складки – 1 мм; Б – В-скан): 1 – area opaca (темное поле); 2 – area pellucida (светлое поле); 3 – головная складка; 4 – 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.

2 сутки

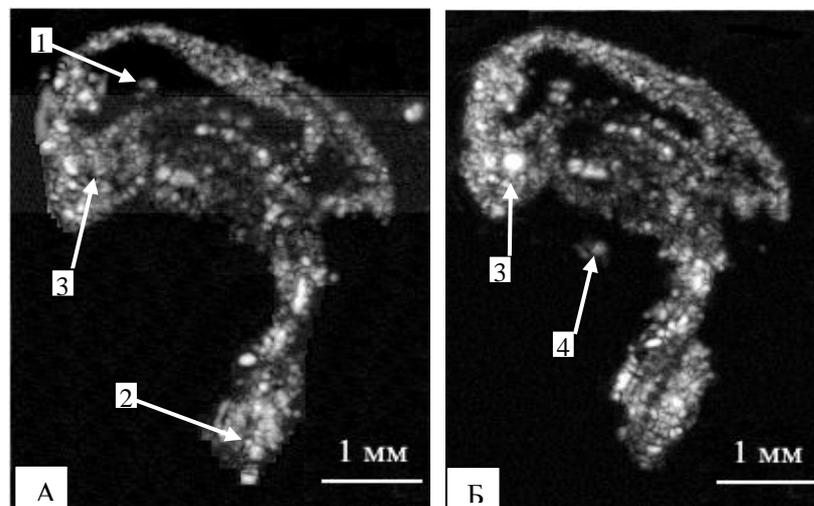


Рисунок А.2. Акустические изображения эмбриона перепела на 2-е сутки развития на разной глубине. А (С-скан, глубина 290 мкм, толщина 115 мкм) и Б (С-скан, глубина 433 мкм, толщина 115 мкм): 1 – полость головного мозга, 2 – хвостовая почка; 3 – глаз; 4 – сердце.

3 сутки

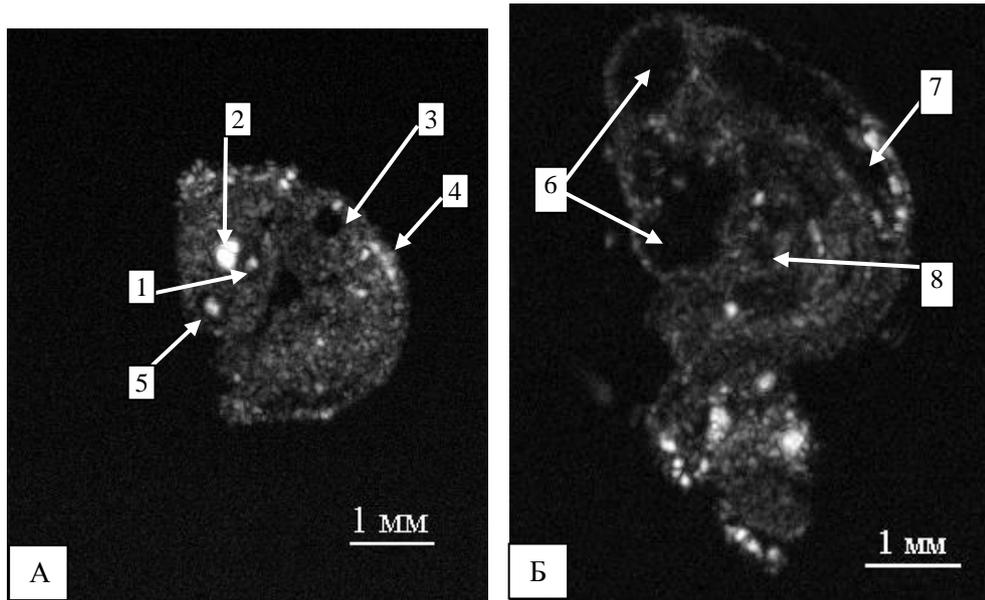


Рисунок А.3. Акустические изображения эмбриона перепела на 3-и сутки развития на разной глубине. А (С-скан, глубина 548 мкм, толщина 162 мкм) и Б (С-скан, глубина 739 мкм, толщина 115 мкм): 1 – хрусталиковый пузырек; 2 – глазная чаша; 3 – слуховая капсула; 4 – нервная трубка; 5 – поверхность переднего мозга; 6 – полости головного мозга; 7 – полость спинного мозга; 8 – сердце.

4 сутки

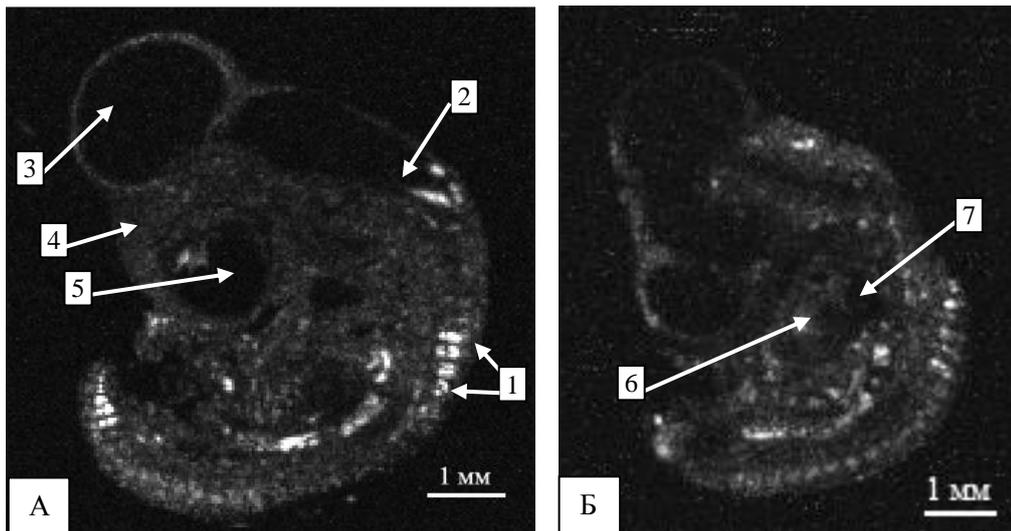


Рисунок А.4. Акустические изображения эмбриона перепела на 4-е сутки развития на разной глубине А (С-скан, глубина 1200 мкм, толщина 150 мкм) и Б (С-скан, глубина 2147 мкм, толщина 208 мкм): 1 – сомиты; 2 – полость заднего мозга; 3 – полость среднего мозга; 4 – передний мозг; 5 – полость глазной чаши; 6 – сердце; 7 – полость сердца.

5 сутки

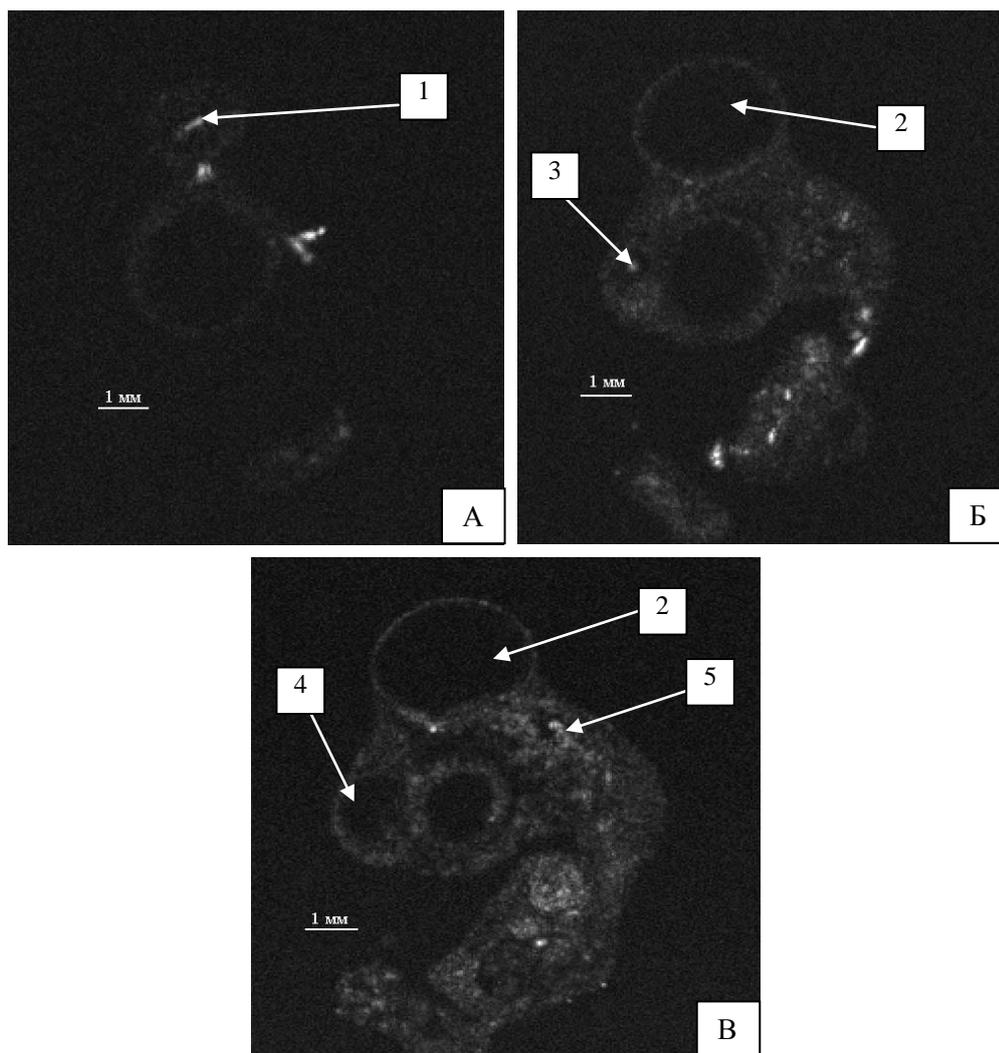


Рисунок А.5. Акустические изображения головного мозга перепела на 5-е сутки развития: А (С-скан, глубина 1010 мкм, толщина 127 мкм); Б (С-скан, глубина 1633 мкм, толщина 132 мкм); В (С-скан, глубина 1905 мкм, толщина 132 мкм): 1 – поверхность среднего мозга (зрительная доля); 2 – полость среднего мозга (зрительная доля); 3 – поверхность переднего мозга (большие полушария); 4 – полость переднего мозга (большие полушария); 5 – поверхность заднего мозга.

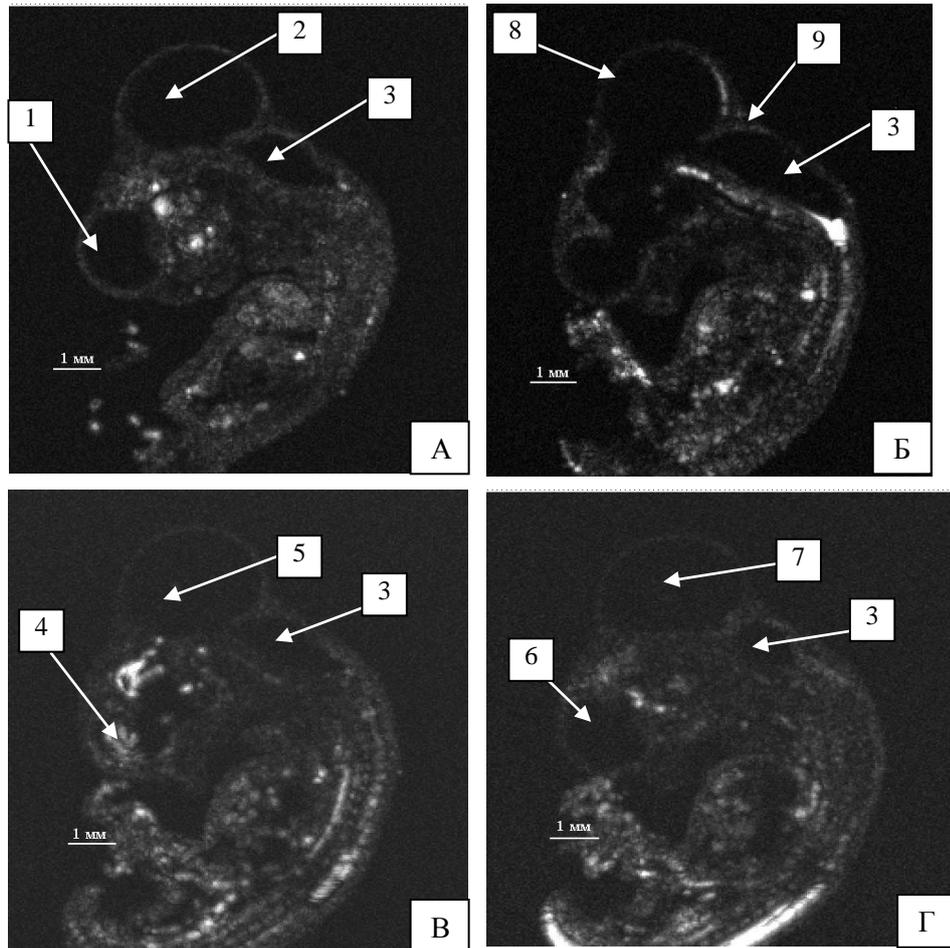


Рисунок А.6. Акустические изображения головного мозга перепела на 5-е сутки развития: А (С-скан, глубина 2193 мкм, толщина 132 мкм); Б (С-скан, глубина 2605 мкм, толщина 109 мкм); В (С-скан, глубина 3055 мкм, толщина 109 мкм); Г (С-скан, глубина 3355 мкм, толщина 109 мкм): 1 – полость переднего мозга (левое полушарие); 2 – полость среднего мозга (левая зрительная доля); 3 – полость заднего мозга; 4 – перегородка между большими полушариями; 5 – перегородка между зрительными долями; 6 – полость переднего мозга (правое полушарие); 7 – полость среднего мозга (правая зрительная доля); 8 – средний мозг; 9 – промежуточный мозг.

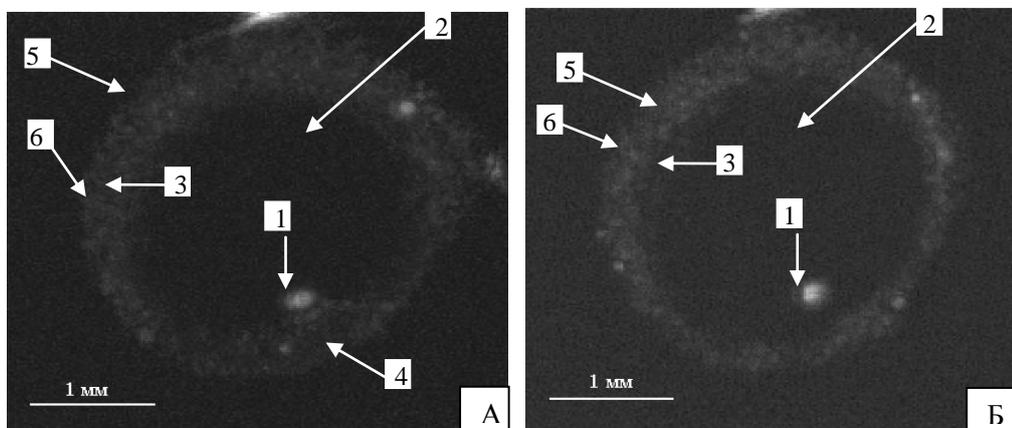


Рисунок А.7. Акустические изображения глаза перепела на 5-е сутки развития: А (С-скан, глубина 1102 мкм, толщина 501 мкм); Б (С-скан, глубина 1217 мкм, толщина 236 мкм): 1 – тело хрусталика; 2 – стекловидное тело; 3 – зачаток сетчатки; 4 – роговица; 5 – белочная оболочка; 6 – сосудистая оболочка.

6 сутки

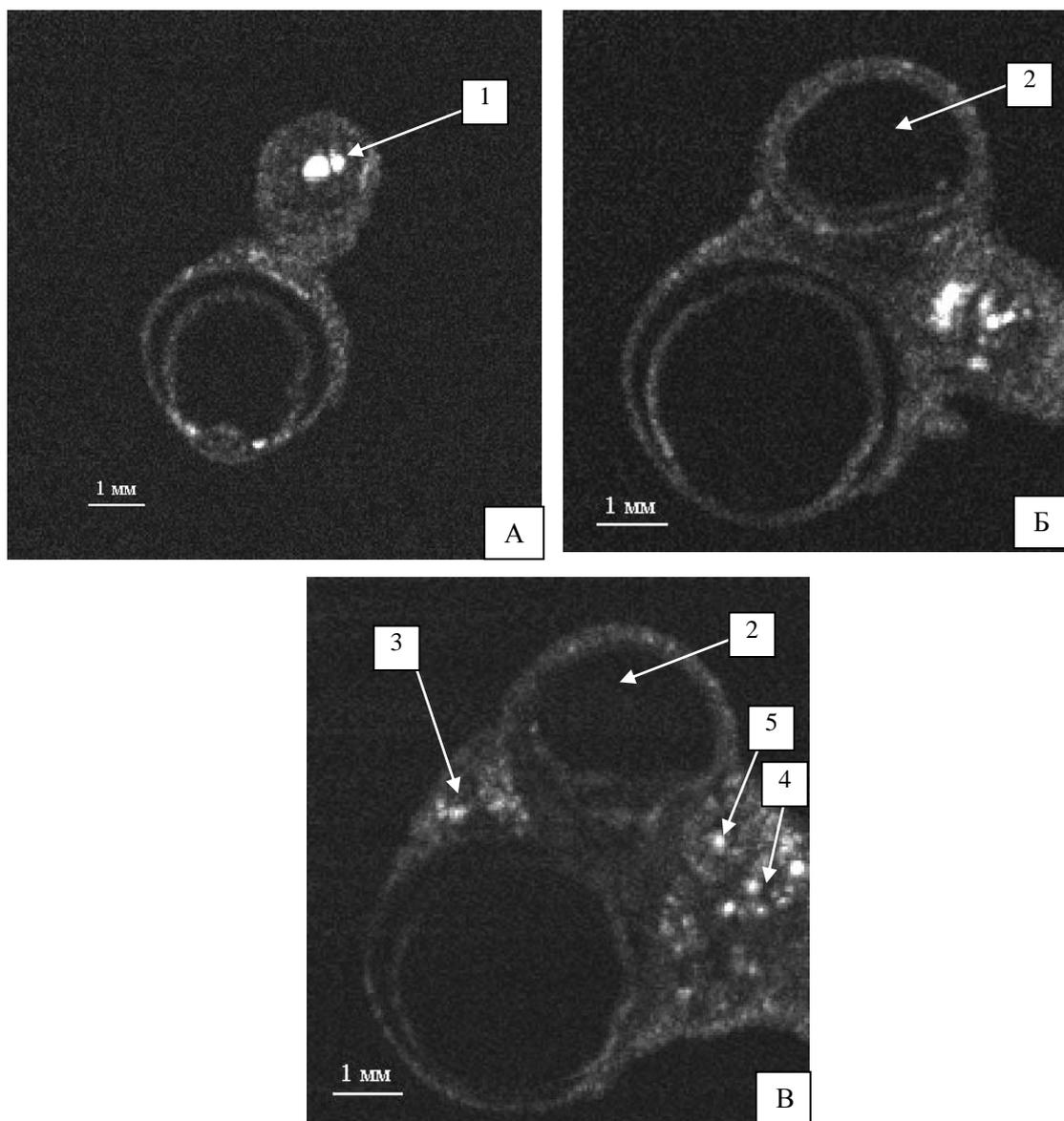


Рисунок А.8. Акустические изображения головного мозга перепела на 6-е сутки развития: А (С-скан, глубина 1073 мкм, толщина 92 мкм); Б (С-скан, глубина 1762 мкм, толщина 121 мкм); В (С-скан, глубина 2270 мкм, толщина 115 мкм): 1 – поверхность среднего мозга (зрительная доля); 2 – полость среднего мозга (зрительная доля); 3 – поверхность переднего мозга (большие полушария); 4 – поверхность заднего мозга; 5 – поверхность мозжечка.

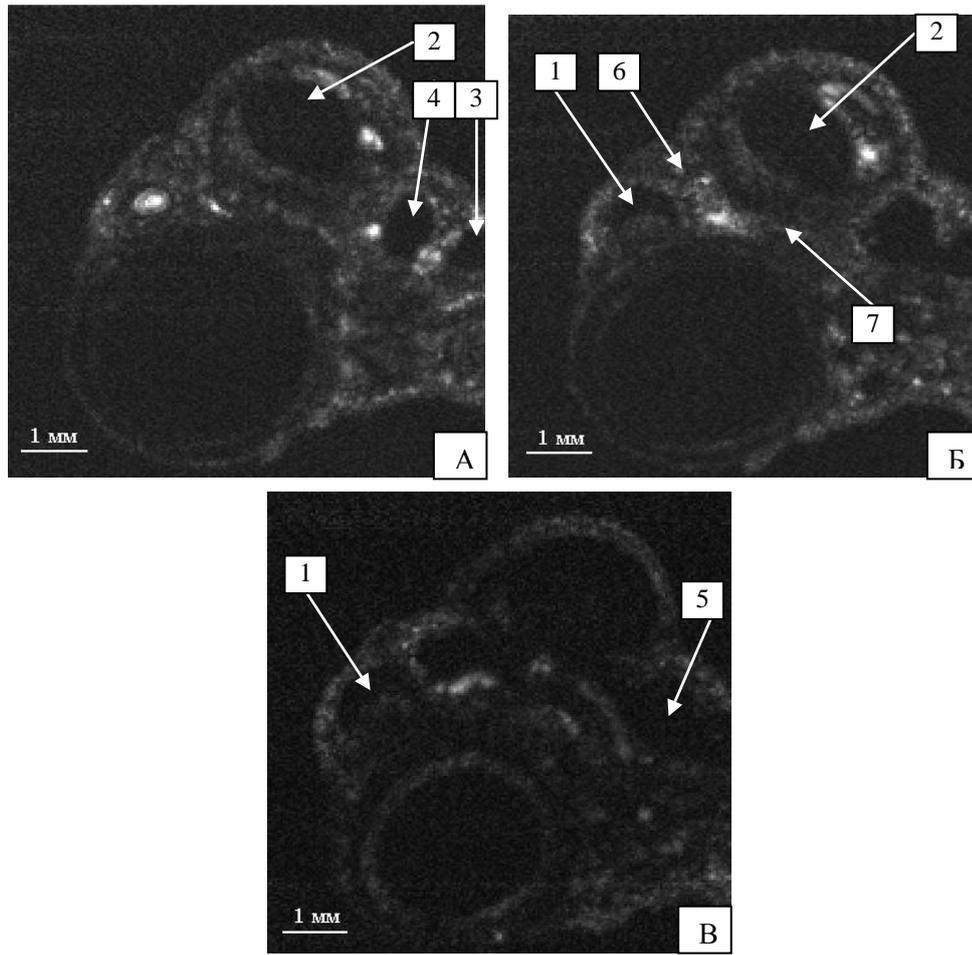


Рисунок А.9. Акустические изображения головного мозга перепела на 6-е сутки развития: А (С-скан, глубина 2475 мкм, толщина 115 мкм); Б (С-скан, глубина 2856 мкм, толщина 115 мкм); В (С-скан, глубина 3543 мкм, толщина 115 мкм): 1 – полость переднего мозга (левое полушарие); 2 – полость среднего мозга (левая зрительная доля); 3 – полость заднего мозга; 4 – полость мозжечка; 5 – полость четвертого желудочка; 6 – поверхность промежуточного мозга; 7 – средний мозг.

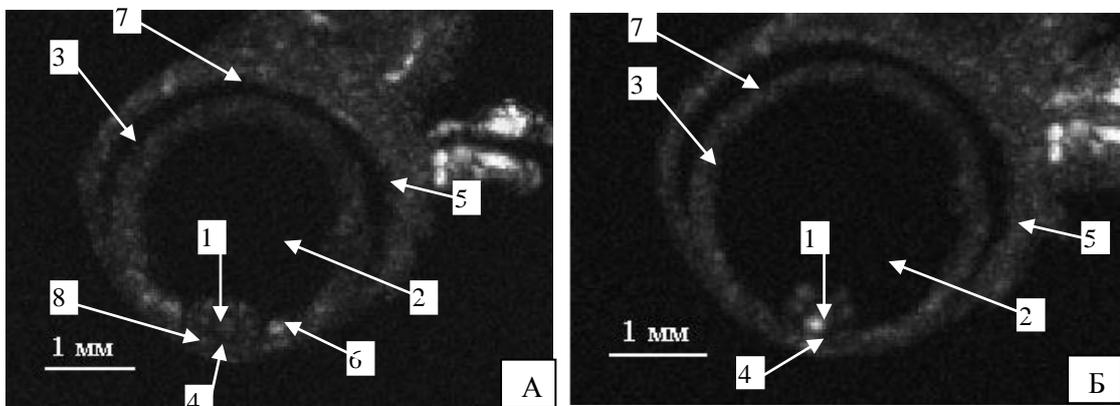


Рисунок А.10. Акустические изображения глаза перепела на 6-е сутки развития: А (С-скан, глубина 1506 мкм, толщина 363 мкм); Б (С-скан, глубина 1916 мкм, толщина 363 мкм): 1 – тело хрусталика; 2 – стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глазница; 6 – ресничное тело; 7 – полость глазницы; 8 – передняя камера глаза.

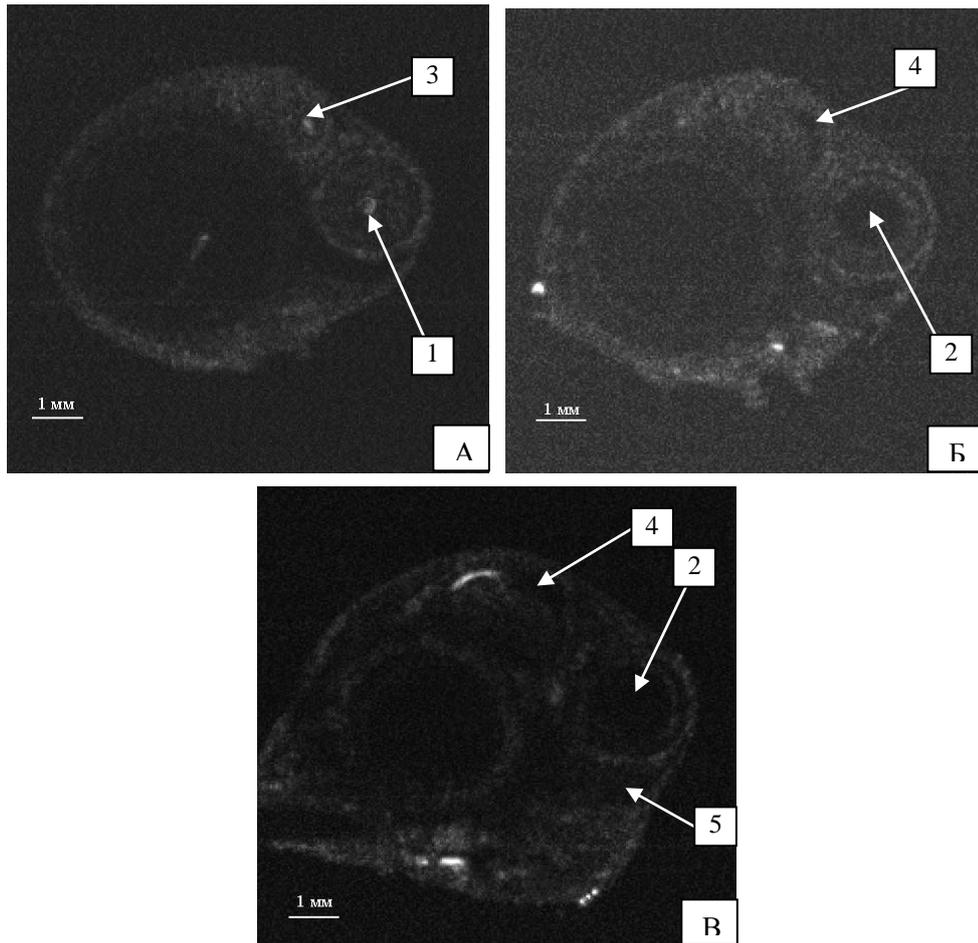


Рисунок А.11. Акустические изображения головного мозга перепела на 7-е сутки развития: А (С-скан, глубина 2539 мкм, толщина 115 мкм); Б (С-скан, глубина 3087 мкм, толщина 115 мкм); В (С-скан, глубина 3480 мкм, толщина 115 мкм): 1 – поверхность среднего мозга (зрительная доля); 2 – полость среднего мозга (зрительная доля); 3 – поверхность переднего мозга (большие полушария); 4 – полость переднего мозга; 5 – мозжечок.

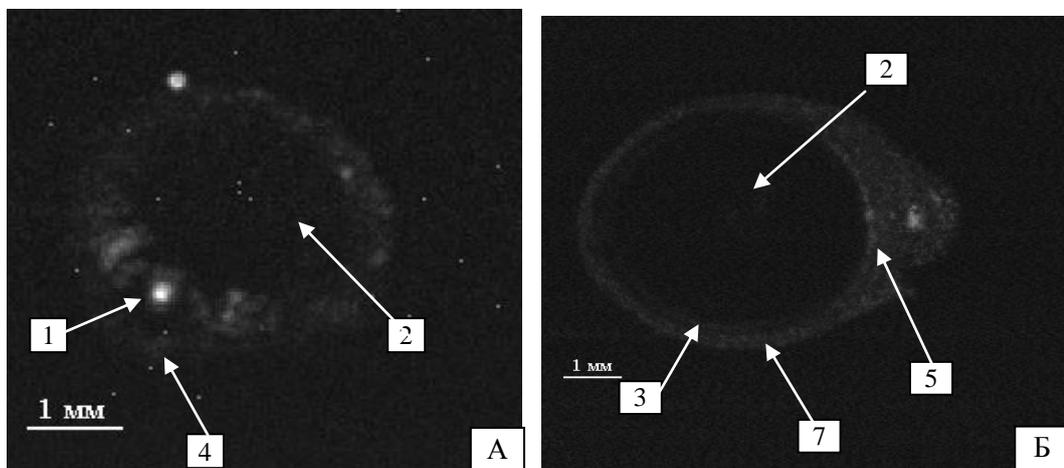


Рисунок А.12. Акустические изображения глаза перепела на 7-е сутки развития: А (С-скан, глубина 819 мкм, толщина 178 мкм); Б (С-скан, глубина 2325 мкм, толщина 282 мкм): 1 – тело хрусталика; 2 – стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глазница; 6 – верхнее веко; 7 – полость глазницы.

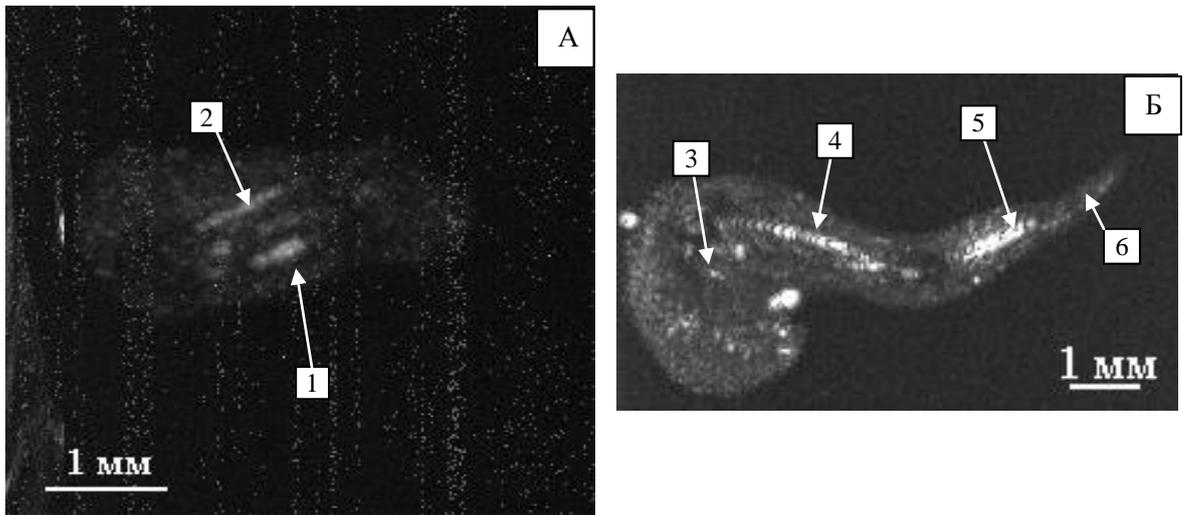


Рисунок А.13. Акустические изображения скелета конечностей перепела на 7-е сутки развития: А – крыло (С-скан, глубина 370 мкм, толщина 520 мкм); Б – нога (С-скан, глубина 670 мкм, толщина 660 мкм): 1 – локтевая кость; 2 – лучевая кость; 3 – бедро; 4 – голень; 5 – цевка; 6 – стопа.

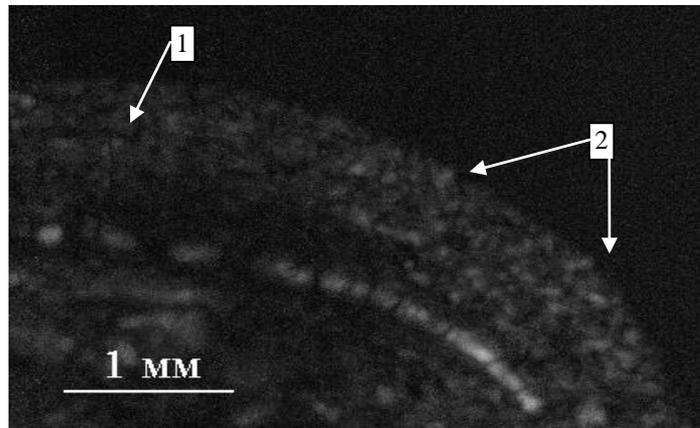


Рисунок А.14. Акустическое изображение зачатков ювенального пуха и кожного покрова в поясничной области эмбриона перепела на 7-е сутки развития (С-скан, глубина 2444 мкм, толщина 136 мкм): 1 – соединительнотканная часть кожи; 2 – зачаток пера (сосочек).

8 сутки

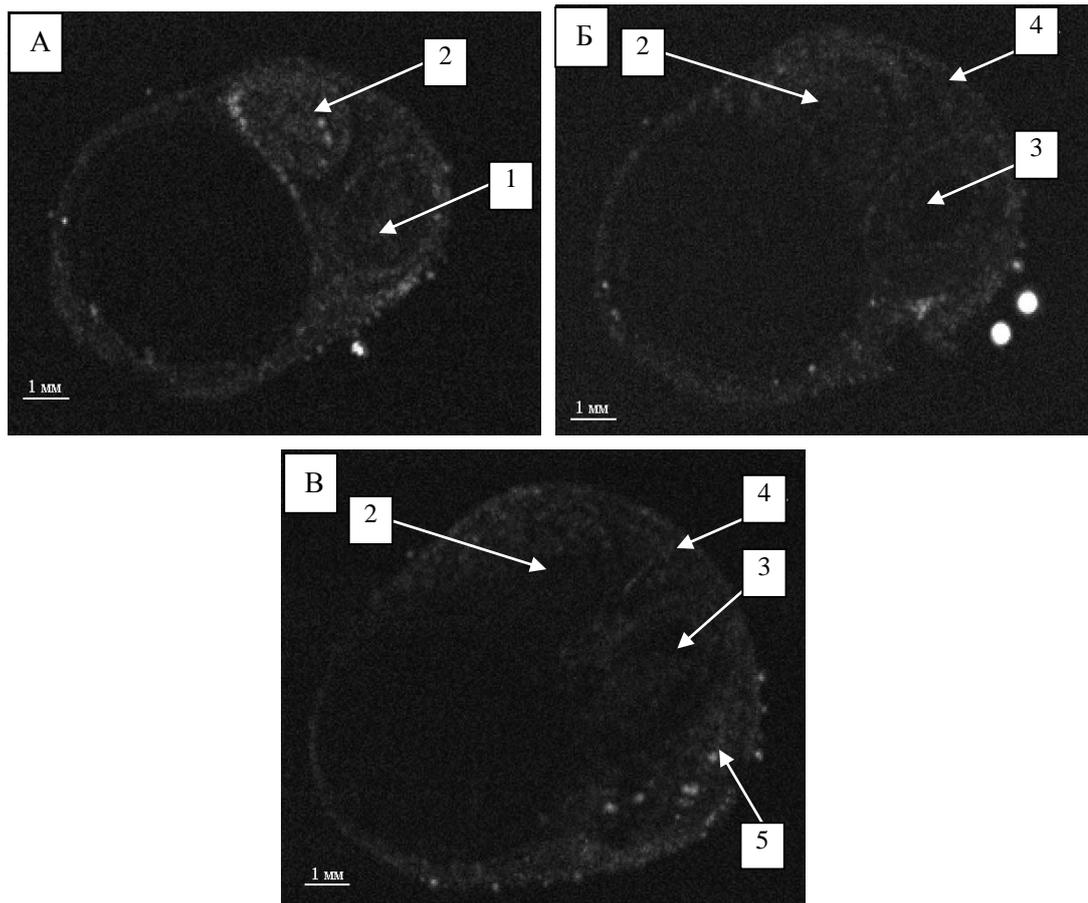


Рисунок А.15. Акустические изображения головного мозга перепела на 8-е сутки развития: А (С-скан, глубина 2106 мкм, толщина 115 мкм); Б С-скан, (глубина 2908 мкм, толщина 115 мкм); В (С-скан, глубина 3808 мкм, толщина 115 мкм): 1 – поверхность среднего мозга (зрительная доля); 2 – поверхность переднего мозга (большие полушария); 3 – полость зрительной доли; 4 – эпифиз; 5 – мозжечок.

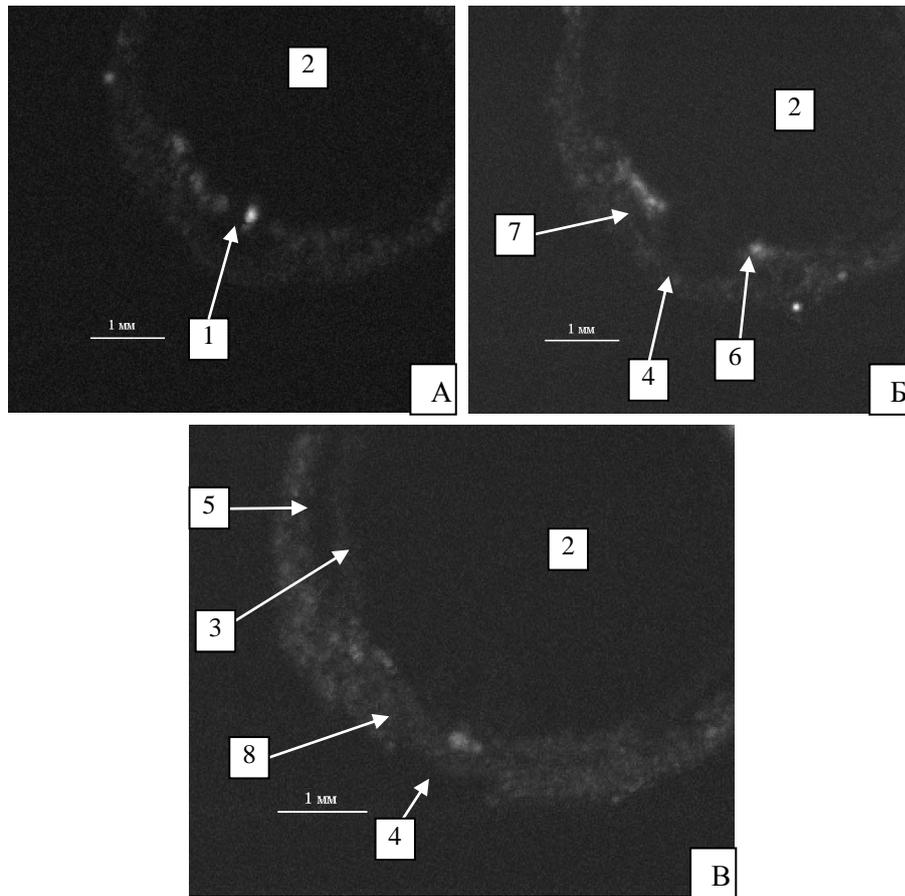


Рисунок А.16. Акустические изображения глаза перепела на 8-е сутки развития: А (С-скан, глубина 1425 мкм, толщина 86 мкм); Б (С-скан, глубина 1720 мкм, толщина 132 мкм); В (С-скан, глубина 2205 мкм, толщина 230 мкм): 1 – тело хрусталика; 2 – стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глазница; 6 – ресничное тело; 7 – конъюнктивный мешок; 8 – верхнее веко.

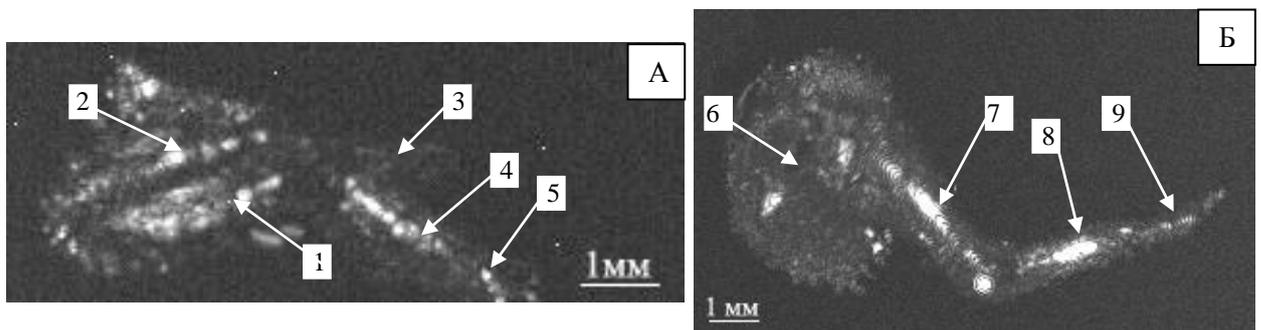


Рисунок А.17. Акустические изображения скелета конечностей перепела на 8-е сутки развития: А – крыло (С-скан, глубина 580 мкм, толщина 600 мкм); Б – нога (С-скан, глубина 920 мкм, толщина 600 мкм): 1 – локтевая кость; 2 – лучевая кость; 3 – третий палец; 4 – пястно-запястная кость; 5 – второй палец; 6 – бедро; 7 – голень; 8 – цевка; 9 – стопа.

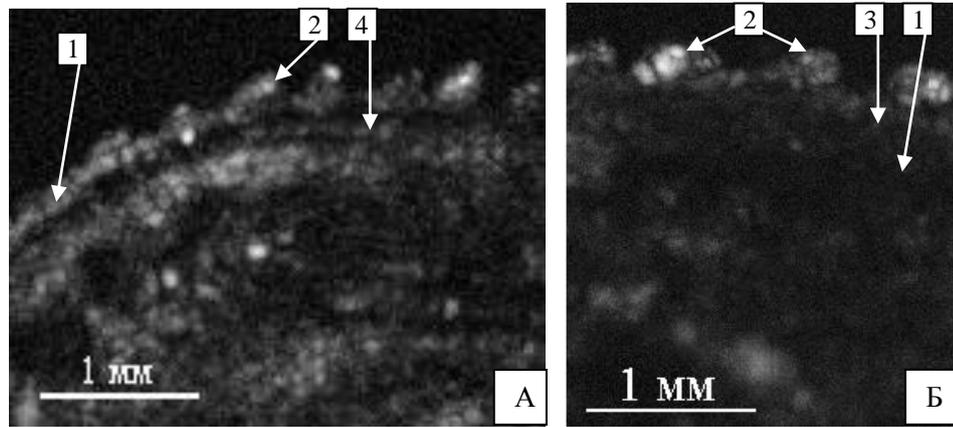


Рисунок А.18. Акустические изображения зачатков ювенольного пуха и кожного покрова в шейной (А) и поясничной (Б) области эмбриона перепела на 8-е сутки развития (С-скан, глубина 1850 мкм, толщина 186 мкм): 1 – соединительнотканная часть кожи; 2 – зачаток пера (сосочек); 3 – роговой слой; 4 – мышечный слой.

9 сутки

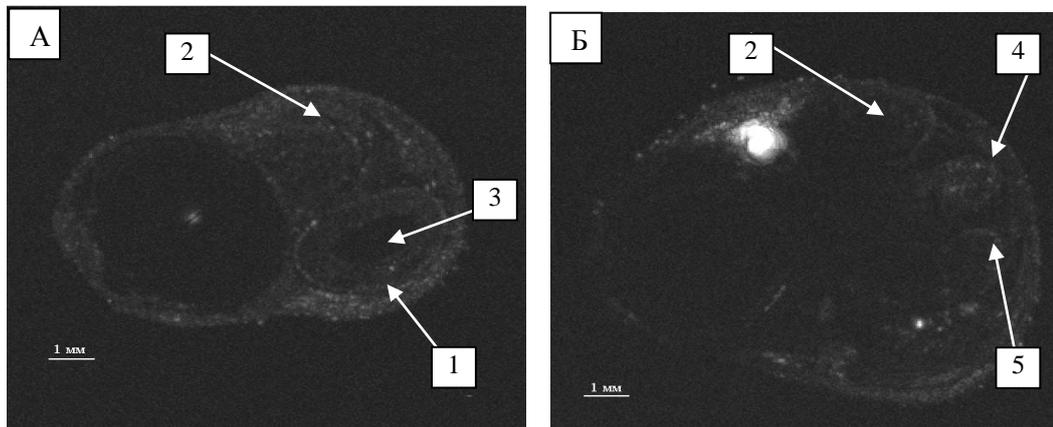


Рисунок А.19. Акустические изображения головного мозга перепела на 9-е сутки развития: А (С-скан, глубина 2291 мкм, толщина 230 мкм); Б (С-скан, глубина 3630 мкм, толщина 230 мкм): 1 – средний мозг зрительная доля; 2 – большие полушария; 3 – полость зрительной доли; 4 – эпифиз; 5 – мозжечок.

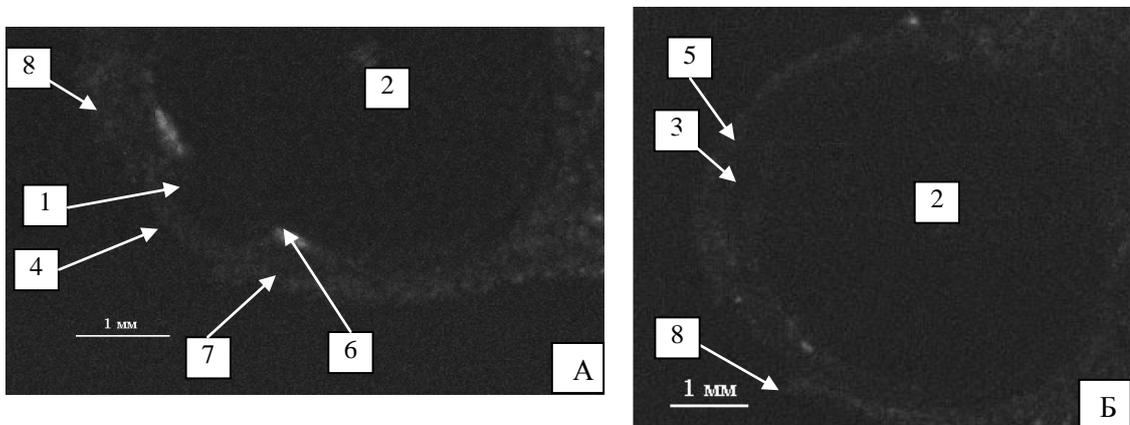


Рисунок А.20. Акустические изображения глаза перепела на 9-е сутки развития: А (С-скан, глубина 2262 мкм, толщина 190 мкм); Б (С-скан, глубина 2441 мкм, толщина 161 мкм): 1 – тело хрусталика; 2 – стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глазница; 6 – ресничное тело; 7 – конъюнктивный мешок; 8 – верхнее веко.

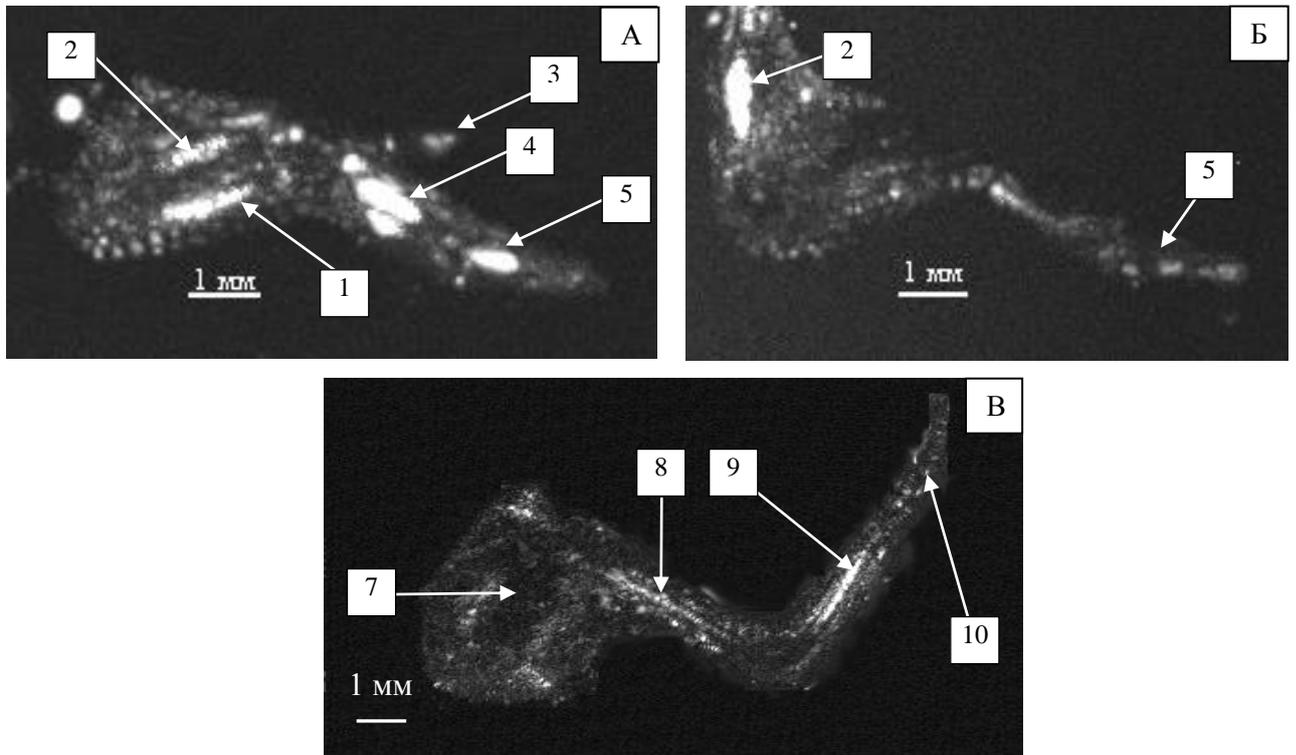


Рисунок А.21. Акустические изображения скелета конечностей перепела на 9-е сутки развития: А, Б – крыло (С-сканы, глубина 1220 и мкм 1710, толщина 632 мкм); В – нога (С-скан, глубина 1212 мкм, толщина 750 мкм): 1 – локтевая кость; 2 – лучевая кость; 3 – третий палец; 4 – пястно-запястная кость; 5 – второй палец; 6 – плечевая кость; 7 – бедро; 8 – голень; 9 – цевка; 10 – стопа.

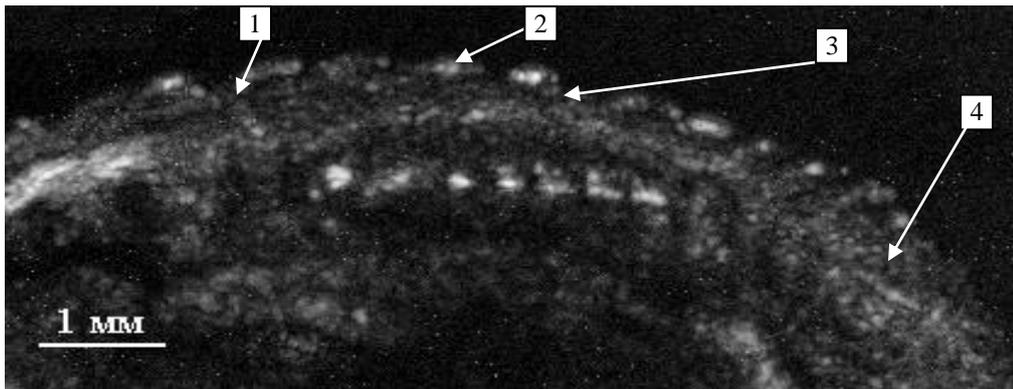


Рисунок А.22. Акустическое изображение ювенального пуха и кожного покрова в поясничной области эмбриона перепела на 9-е сутки развития (С-скан, глубина 2650 мкм, толщина 173 мкм): 1 – зачаток влагалища пера; 2 – зачаток пера; 3 – эпидермис; 4 – жировая ткань.

10 сутки

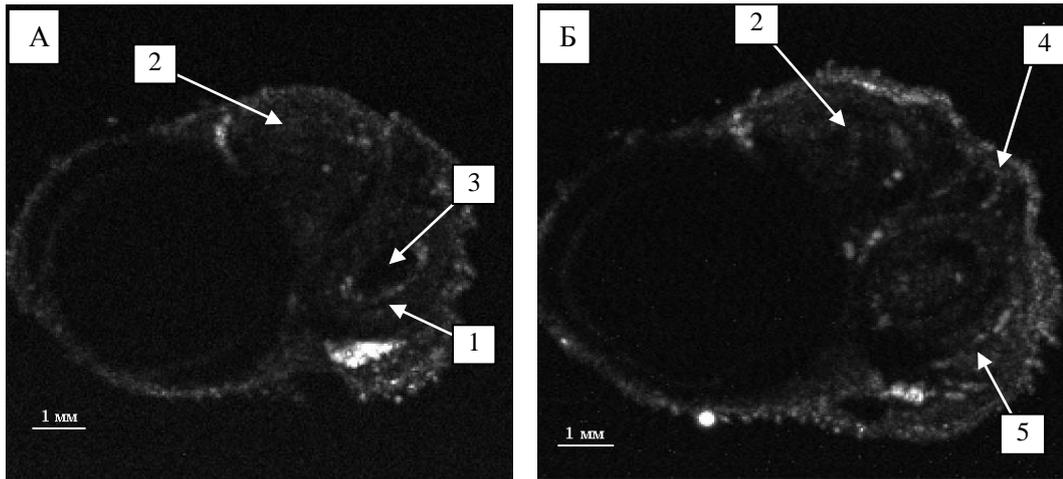


Рисунок А.23. Акустические изображения головного мозга перепела на 10-е сутки развития: А (С-скан, глубина 2383 мкм, толщина 230 мкм); Б (С-скан, глубина 3358 мкм, толщина 230 мкм): 1 – средний мозг зрительная доля; 2 – большие полушария; 3 – полость зрительной доли; 4 – эпифиз; 5 – мозжечок.

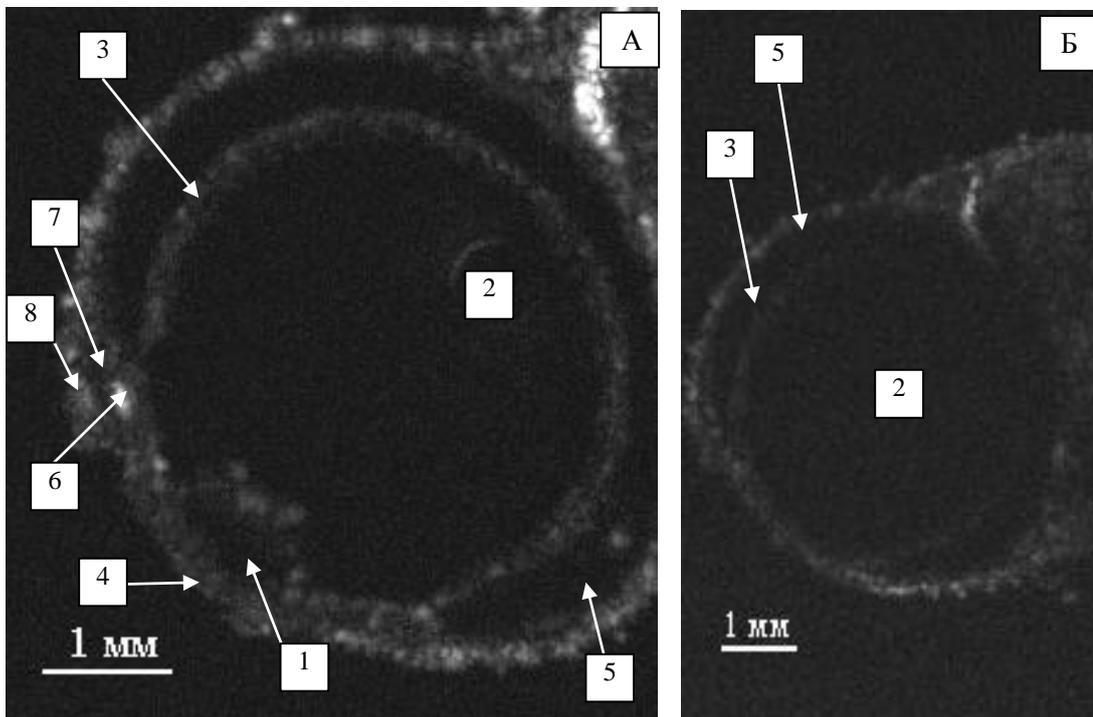


Рисунок А.24. Акустические изображения глаза перепела на 10-е сутки развития: А (С-скан, глубина 2129 мкм, толщина 120 мкм); Б (С-скан, глубина 2429 мкм, толщина 120 мкм): 1 – тело хрусталика; 2 - стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глазница; 6 – ресничное тело; 7 – конъюнктивный мешок; 8 – верхнее веко.

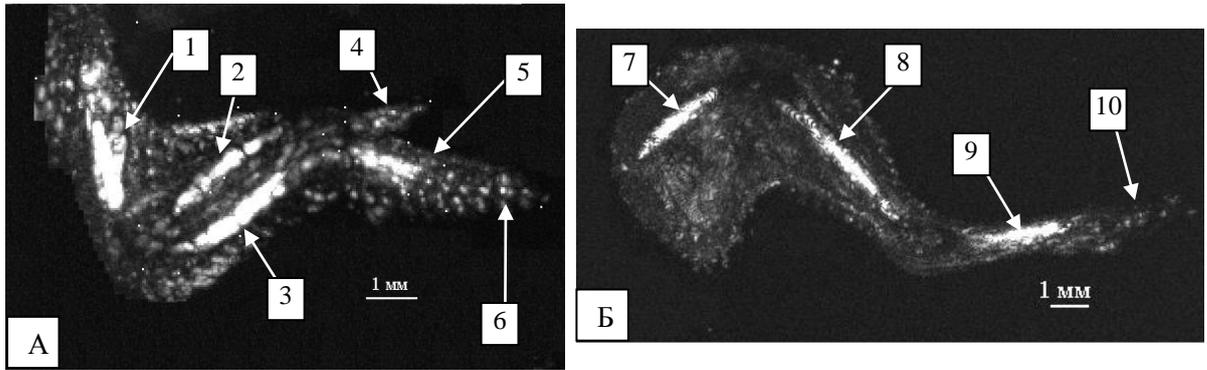


Рисунок А.25. Акустические изображения скелета конечностей перепела на 10-е сутки развития: А – крыло (С-скан, глубина 687 мкм, толщина 785 мкм), Б – нога (С-скан, глубина 1730 мкм, толщина 735 мкм): 1 – плечевая кость; 2 – лучевая кость; 3 – локтевая кость; 4 – третий палец; 5 – пястно-запястная кость; 6 – второй палец; 7 – бедро; 8 – голень; 9 – цевка; 10 – стопа.

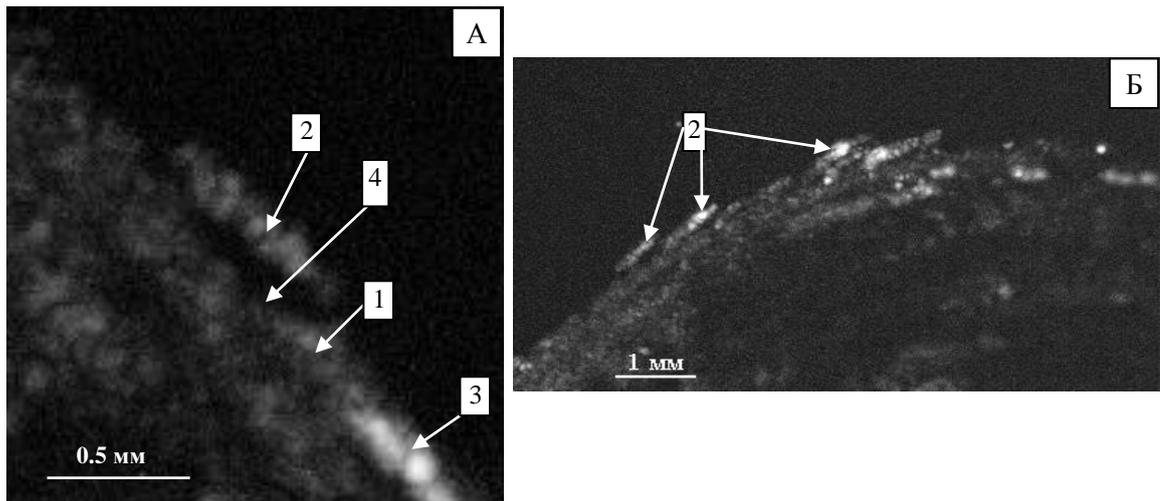


Рисунок А.26. Акустические изображения ювенального пуха и кожного покрова в поясничной области на 10-е сутки развития: А – детальное изображение пуха, Б – общий вид (С-скан, глубина 2600 мкм, толщина 173 мкм): 1 – влагалище пера; 2 – перо; 3 – сердцевина пера; 4 – эпидермис.

11 сутки

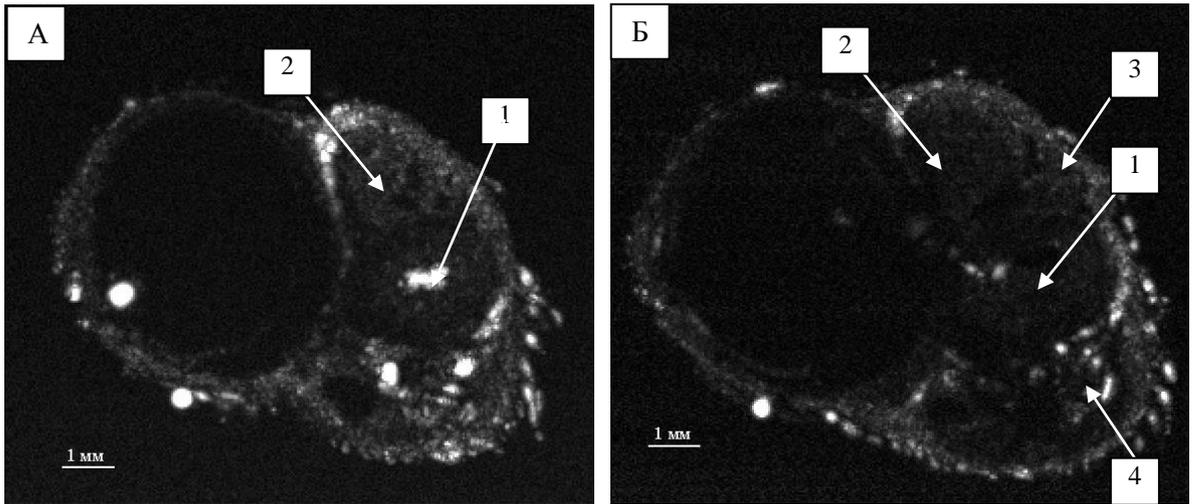


Рисунок А.27. Акустические изображения головного мозга перепела на 11-е сутки развития на разной глубине (С-сканы, глубина 2435 и 2963 мкм, толщина 230 мкм): 1 – средний мозг зрительная доля; 2 – большие полушария; 3 – эпифиз; 4 – мозжечок.

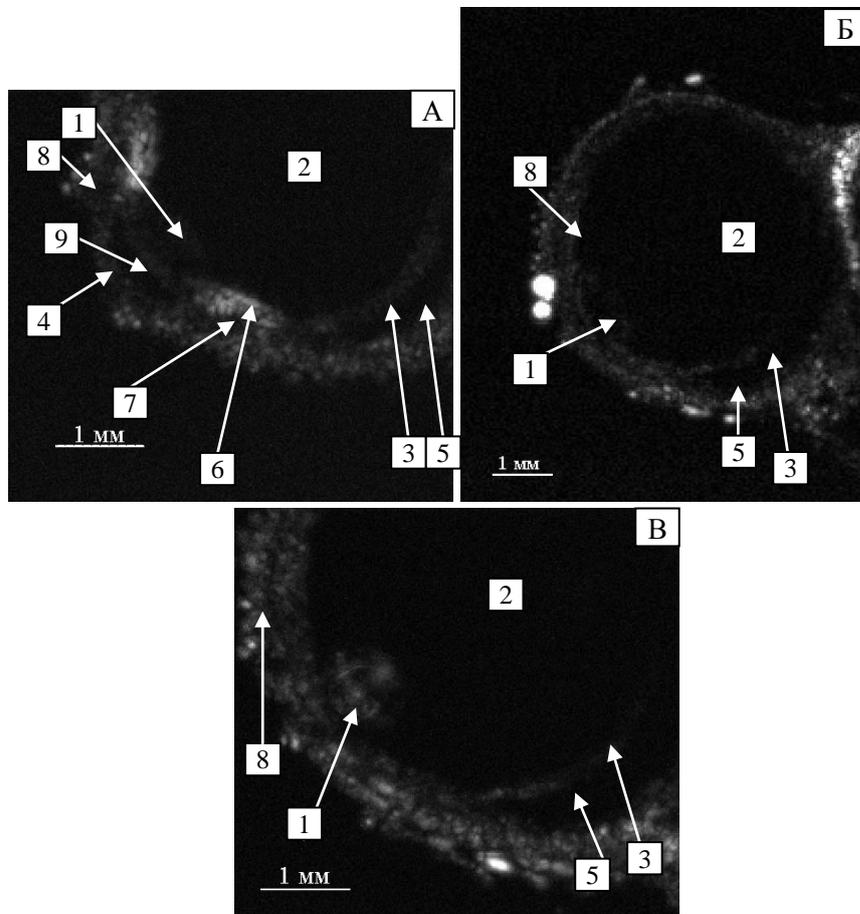


Рисунок А.28. Акустические изображения глаза перепела на 11-е сутки развития (С-скан, глубина 1460, 1974 и 2175 мкм, толщина 104, 115 и 138 мкм): 1 – тело хрусталика; 2 – стекловидное тело; 3 – сетчатка и пигментная оболочка; 4 – роговица; 5 – глазница; 6 – ресничное тело; 7 – конъюнктивный мешок; 8 – верхнее веко; 9 – передняя камера глаза.

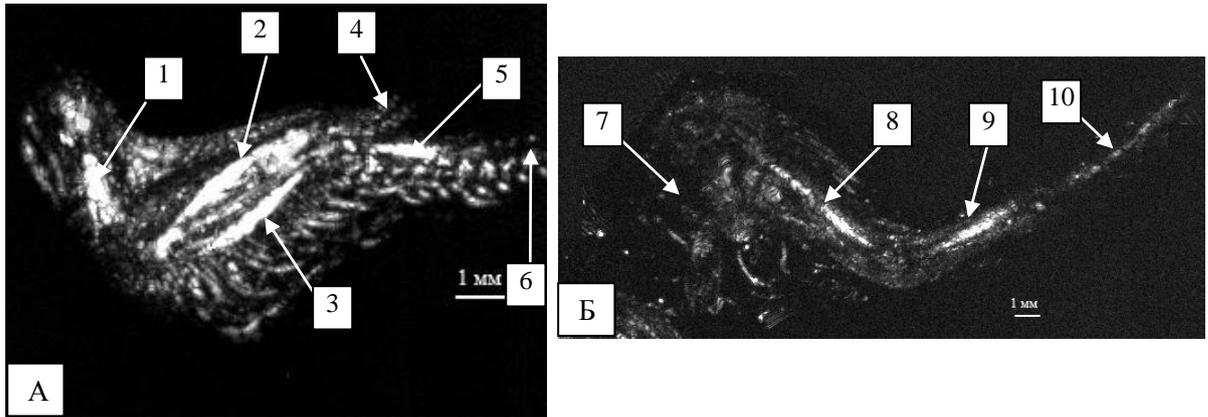


Рисунок А.29. Акустические изображения скелета конечностей перепела на 11-е сутки развития: А – крыло (С-скан, А – глубина 850 мкм, толщина 793 мкм), Б – нога (С-скан, глубина 2150 мкм, толщина 781 мкм): 1 – плечевая кость; 2 – лучевая кость; 3 – локтевая кость; 4 – третий палец; 5 – пястно-запястная кость; 6 – второй палец; 7 – бедро; 8 – голень; 9 – цевка; 10 – стопа.

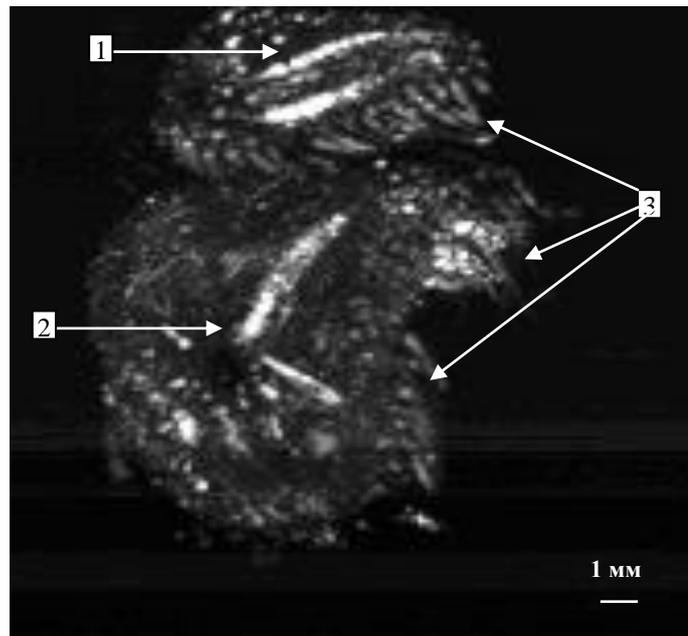


Рисунок А.30. Акустическое изображение туловища эмбриона перепела на 11-е сутки развития (С-скан, глубина 3150 мкм, толщина 248 мкм): 1 – передняя конечность; 2 – задняя конечность; 3 – перьевой покров.