
**ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**

УДК 57.013; 57.042; 617.7

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛАЗНЫХ ПАТОЛОГИЙ НА БИОМОДЕЛИ
ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA***

© 2022 г. Ю. С. Петронюк^{1*}, Н. Н. Трофимова¹, П. П. Зак¹, Е. А. Храмцова¹,
О. М. Андрюхина², А. С. Андрюхина², А. А. Рябцева², Т. С. Гурьева³,
Е. И. Медникова³, С. А. Титов⁴, В. М. Левин¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

³Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук, Москва, Россия

⁴Научно-технологический центр уникального приборостроения Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: jps7@mail.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 11.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Проблема глазных патологий, таких как возрастная макулярная дистрофия и детская миопизация, становится с каждым годом все актуальнее. Влияние спектрального состава искусственного освещения, сопровождающего человека, начиная от самого рождения и до зрелости, становится все более заметным. Для выявления этой закономерности проведены экспериментальные исследования с использованием эффективной животной модели – японского перепела *Coturnix japonica*, одомашненная популяция которого широко используется в качестве лабораторного животного в офтальмологии и биомедицинских дисциплинах. Для выявления различия в развитии тканей глаза при повседневном освещении с разными спектральными характеристиками были исследованы птенцы и взрослые птицы. Методами оптической когерентной томографии наблюдалась структура переднего отдела глаза, а также толщина и строение хориоретинального комплекса. Ультразвуковыми методами получены данные о возрастных изменениях глазного яблока, роговицы, передней камеры, хрусталика, стекловидного тела, хориоретинального комплекса, склеры. Измерено содержание мелатонина в тканях глаза.

Ключевые слова: онтогенез глаза, миопия, японский перепел, акустическая микроскопия, оптическая когерентная томография.

DOI: 10.31857/S0207401X22020078

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов возникновения детской близорукости в настоящий момент имеет приоритетный характер и вызывает значительный интерес ученых. Прогрессирующий рост детской миопии связан прежде всего с массовым использованием дисплейных устройств, требующих напряженной зрительной работы. Глаза детей в возрасте до 7–8 лет, в отличие от взрослых, имеют укороченный размер по центральной оптической оси и являются дальнозоркими (+3D). По мере взросления глазное яблоко постепенно удлиняется, и в подростковом возрасте (10–14 лет) рост глаз останавливается по достижении нормальной сферической формы; в случае дальнейшего удлинения центральной оси глаза развивается близорукость (миопия). Форма глаза повседневно подстраивается под сохранение резкости изображе-

ния на сетчатке. По совокупности литературных данных в последние годы сформирована рабочая гипотеза, согласно которой миопический рост детского глаза по переднезадней оси стимулируется в результате возбуждения красночувствительных и зеленочувствительных колбочек сетчатки, а возбуждение синечувствительных фоторецепторов тормозит этот рост [1, 2]. Предположительными нейромодуляторами скорости роста могут быть мелатонин и допамин, секретируемые в противоположном циркадном ритме клетками сетчатки [3]. Мелатонин выполняет множество функций в организме человека: является сильным антиоксидантом, регулирует экспрессию большого числа генов, обладает противораковой активностью, повышает жизнеспособность клеток сетчатки, снижает внутриглазное давление. Известно, что миопия сопровождается высоким уровнем мелатонина в плазме крови, однако причинно-следственные свя-

зи этой корреляции до конца неясны и оказываются предметом современных исследований [4, 5].

За последние пять лет опубликовано около 50 работ по биомоделированию миопии на цыплятах кур [2]. Подобные исследования позволяют оценивать влияние повседневного освещения на развитие детского глаза и исследовать механизмы профилактического действия света. Во многих из этих работ показано, что при искусственной миопии, спровоцированной “дефокусом” изображения с помощью накладных линз, или же при “депривации” изображения матированными стеклами, красное освещение способствует миопическому росту глаза, а синий цвет тормозит миопизацию [1, 4, 6]. В некоторых из этих работ дополнительно исследовано содержание допамина [4, 6]. Домашний японский перепел *Coturnix japonica* относится к отряду курообразных, и этот факт дает возможность проводить аналогичные исследования. В мировой литературе ссылок на работы, посвященные моделированию миопии на цыплятах перепелов, крайне мало [6]. Тем не менее важным преимуществом применения в качестве биомодели японского перепела является наличие высокой светозависимой циркадно-мелатониновой регуляции у этих птиц [6]. Эпифизарная система находится под тормозным контролем синечувствительных меланопсиновых ганглионарных клеток сетчатки, а ретинальная система сосредоточена непосредственно в самих фоторецепторных клетках. Выполнение работ в рамках данной биомодели позволяет исследовать как процессы миопизации, так и анализировать светорегуляторные функции мелатонина в этих процессах.

В данной работе исследовалось постнатальное развитие глаза японского перепела *Coturnix japonica* в норме и при моделировании миопии путем коррекции спектра повседневного освещения. Исследование выполнялось в том числе и в целях развития неинвазивных, прижизненных методик, позволяющих изучать *in vivo* динамику процессов формирования патологических отклонений офтальмологической направленности на лабораторных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы и образцы

Для выполнения экспериментов цыплята японского перепела инкубационно выводились из яиц, приобретенных в ООО “Генофонд” (Сергиев Посад). С момента вылупления из яиц цыплят разделили на две группы с разными условиями повседневного освещения: преимущественно с синим (450 нм) и желтым (500–700 нм) участками спектра. Источники освещения прошли необходимый контроль и спектрометрическую калибровку для обеспечения физиологического уровня

освещенности ≈ 200 лк. Калибровку проводили с помощью спектрометра МК-350 компании Uptech (Taiwan). Суточный режим освещения задавали таймером на 9 ч (ночь) и 15 ч (день). Необходимый обогрев осуществляли инфракрасными обогревателями мощностью 50 Вт. Перед включением света разных длин волн всем птенцам давали провести сутки при стандартном освещении для адаптации к самостоятельному нахождению воды и пищи. Использовался стандартный корм для выращивания птиц ПК 5-41, разработанный специально для птенцов перепела. Содержание птиц и их вывод из эксперимента декапитацией выполнялся согласно “Правилам надлежащей лабораторной практики”, утвержденных Приказом Министерства Здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года N 199н.

Эксперименты по измерению анатомо-топографических структур глазного яблока выполнялись в условиях *in vivo*, *in situ* и *in vitro*. Исследовались глаза японского перепела в возрасте 10, 20, 30 и 65 дней развития. В измерениях *in vivo* применялась мягкая фиксация тела птицы и ее головы в руках экспериментатора. Веки фиксировались вручную и с применением векорасширителя. Для уменьшения чувствительности глаза использовалась инстилляционная анестезия 2%-ным раствором лидокаина. Для обследования переднего и заднего сегментов глаза перепела применялась оптическая когерентная томография (ОКТ) [7, 8]. С помощью аппаратов Topcon DRI OCT Triton и SPECTRALIS Heidelberg Engineering были получены изображения переднего и заднего отделов глаза перепела с микронным разрешением (рис. 1). Поскольку фиксация взгляда птицы затруднительна, проводились многократные записи (более 20) вблизи центральной оптической оси.

Более полное исследование геометрических размеров структурных элементов глаза с точной юстировкой по центральной оси выполнялось с помощью ультразвуковых методов тех же глаз в условиях *in situ* и *in vitro*. Ультразвуковая микроскопия (УЗМ) традиционно используется в биологических [9], эмбриологических [10] и медицинских [11, 12] исследованиях. В данной работе для исследования структуры и геометрических размеров глаза перепела применялся импульсный акустический микроскоп, разработанный в ИБХФ РАН [13]. Микроскоп оснащен акустическим объективом с рабочей частотой 50–100 МГц, малой угловой апертурой 22° и фокусным расстоянием 13.5 мм. Перемещение акустической линзы осуществлялось прецизионными двигателями с шагом в 25 мкм. Основными традиционными режимами визуализации в медицинской практике являются режимы А, В и В/D-сканирование в виде сечений по глубине [1]. Режим динамической фокусировки — В/D-скан использовался для обеспечения высокого уровня контрастности

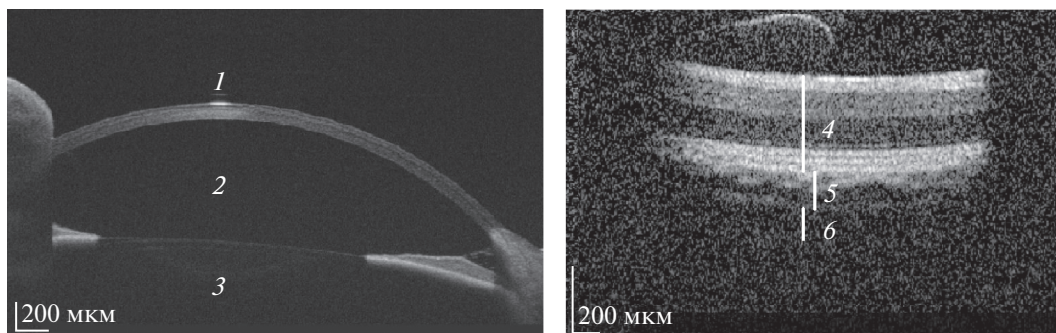


Рис. 1. Оптическая когерентная спектроскопия глаза перепела в возрасте 65 сут: *a* – изображение переднего отдела глаза (Topcon DRI OCT Triton); *б* – изображение заднего отдела (SPECTRALIS Heidelberg Engineering); 1 – роговица, 2 – передняя камера глаза, 3 – хрусталик, 4 – сетчатка с ретиальным пигментным эпителием, 5 – сосудистый слой, 6 – склера.

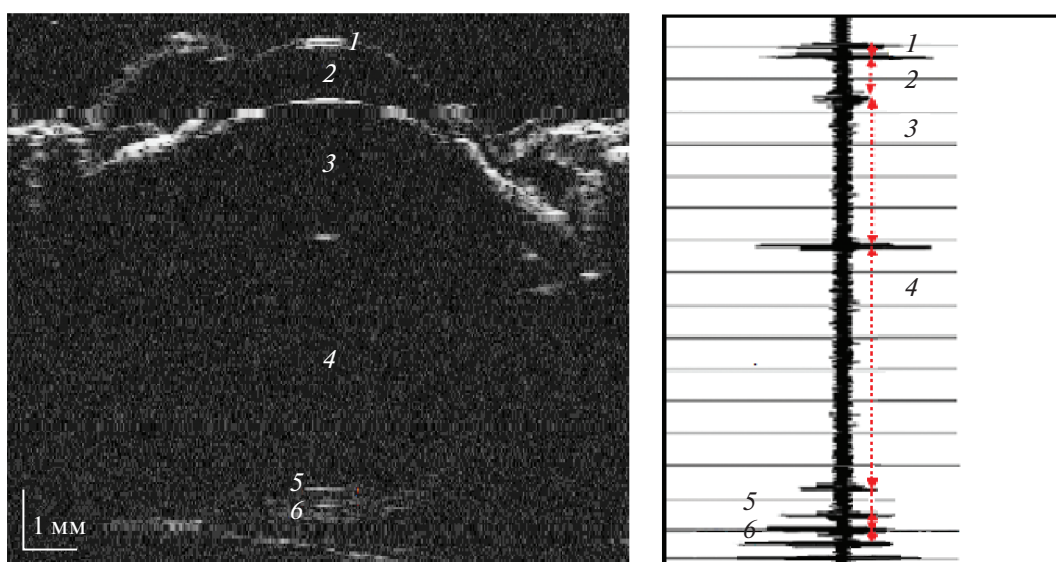


Рис. 2. Акустическая микроскопия глаза перепела в возрасте 65 сут в условиях *in situ*: *a* – В/Д-скан; *б* – эхограмма импульсов, А-скан; 1 – роговица, 2 – передняя камера глаза, 3 – хрусталик, 4 – стекловидное тело, 5 – хориоретинальный комплекс, 6 – склера.

акустических изображений по всей глубине продольного сечения. Эхо-импульсным методом измеряли продольные размеры структур глаза с погрешностью ± 15 мкм. Измерения проводили со стороны роговицы при их естественном положении в глазных орбитах. В качестве иммерсии использовали ультразвуковой гель низкой вязкости и многокомпонентный физиологический раствор (Рингер-СОЛОФАРМ). Исследования проводили при комнатной температуре (23 ± 2) °С. Время проведения одного эксперимента составляло около 20 мин. С помощью сканирующей системы микроскопа были получены эхограммы сигналов (А-скан) вдоль оптической оси глаза (рис. 2*a*). В процессе эксперимента измеряли время задержки эхо-импульсов t , отраженных от границ структурных элементов, а затем рассчитывали значе-

ния толщин (d) этих элементов: $d = 0.5vt$, где v – скорость звука в образце. Необходимо отметить, что ткани глаза являются сильно обводненными и величина скорости звука в них приближается к значению, характерному для воды – 1490 м/с. Однако значения скорости звука для роговицы, хрусталика и склеры несколько различаются, поскольку эти ткани имеют более плотную структуру [14]. В табл. 1 приведены значения скорости звука в этих тканях, использованные для определения толщины структурных элементов глаза в наших экспериментах.

Для получения большей достоверности при сравнительном анализе ультразвуковых данных птенцы перепела взвешивались и калибровались

Таблица 1. Скорость звука (м/с) в тканях глаза

Ткань глаза	Скорость звука
Роговица	1563
Хрусталик	1629
Склера	1639
Стекловидное тело	1520

по весу ± 10 г с точностью 1 г. Исследовались левый и правый глаз у трех птиц каждого возраста.

Измерения содержания мелатонина в тканях глаза выполняли на tandemном хромато-масс-спектрометре AB SCIEX QTRAP 5500 с использованием хроматографических колонок ACQUITY UPLC CSH C18 VanGuard Precolumn. Определение органических веществ в биологических системах с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения имеет широкое применение в научной и клинической практике [15–18]. Прибор позволяет определять содержание мелатонина в одном-двух глазах перепела. Выделение образцов тканей глаза выполняли в определенное время суток – 13 ч 30 мин. Измеряли параметры четырех видов образцов: стекловидное тело, хориоретинальный комплекс, цилиарное тело вместе с радужкой, артериальная кровь. При получении образцов энуклеированные глаза разрезали по экватору, из задней камеры пинцетом вынимали стекловидное тело и далее – хориоретинальный комплекс; из сегмента глазного яблока вынимали цилиарное тело вместе с радужкой и хрусталиком. Пробоподготовка велась без доступа посторонней жидкости на сухой пластиковой чашке Петри и с удалением избытка влаги путем протаскивания образца по сухой пластиковой поверхности. Образцы весом от 15 мг помещали в заранее взвешенные микроцентрифужные пробирки Эппендорфа, взвешивали повторно и переносили в глубокую заморозку при температуре -80°C . Время всей процедуры от момента декапитации птицы до замораживания образца составляло 5–7 мин. Непосредственно перед измерениями образцы размораживали, заливали фосфатным буфером, гомогенизировали в той же пробирке тefлоновым пестиком и центрифугировали.

Извлечение мелатонина проводили методом жидкостной экстракции. Для этого к 200 мкл супернатанта добавляли смесь из 10 мкл внутреннего стандарта, 200 мкл ацетона и 2000 мкл метил-трет-бутилового эфира. Смесь встряхивали в течение 2 мин, после чего замораживали 10 мин при -40°C . Органический слой перемещали в стеклянную центрифужную пробирку и упаривали в токе азота досуха при 40°C , а затем растворяли в

200 мкл метанол-водной смеси (1 : 1). Далее 10 мкл полученного раствора наносили на хроматографическую колонку. В эксперименте использовалась калибровочная рабочая кривая в пределах 25–5000 пг/мл. Конечные результаты выражались в пг/мг сырой массы ткани и пг/мл плазмы крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью оптической когерентной томографии определены значения толщины роговицы и размера передней камеры глаза перепела, характерные для особи в возрасте 65 сут развития при нормальном повседневном освещении (рис. 1). В переднем сегменте глазного яблока хорошо просматриваются размеры, форма и толщина роговицы, размеры передней камеры, радужка и передние отделы хрусталика; в заднем сегменте определяется сетчатка, сосудистая оболочка глаза и склера. Толщина роговицы составила 170 мкм, глубина передней камеры – 1250 мкм, толщина сетчатки – 300 мкм, сосудистой оболочки – 130 мкм. Данные цифры получены в условиях *in vivo*.

В табл. 2 приведены медианные экспериментальные значения для длины передне-задней оси, горизонтального диаметра глазного яблока, толщины роговицы, склеры и хрусталика, глубины передней камеры и передне-задний размер стекловидного тела для трех пар глаз перепелов различного возраста – 10, 20, 30 и 65 сут, измеренные *in situ*. Коэффициент сферичности определяли из отношения диаметра экватора глаза к осевой длине (передне-задняя ось). В табл. 2 также указаны значения (со звездочкой) для перепелов, развитие которых происходило при синем освещении. Ультразвуковые измерения показывают, что осевая длина (переднезадняя ось), размеры передней камеры, хрусталика и стекловидного тела, а также коэффициент сферичности несколько выше по сравнению со значениями для глаза при естественном освещении.

Сравнительный анализ экспериментальных значений, полученных в условиях *in situ* ультразвуковым методом (рис. 2б) и *in vivo* с помощью ОКТ (рис. 1) на одной и той же птице в возрасте 65 сут, выявил некоторые различия. Существенно различаются данные по размеру передней камеры: ОКТ – 1250 мкм, УЗМ – 900 мкм, что может быть обусловлено частичным обезвоживанием передней камеры в результате выведения перепела из эксперимента.

На рис. 3 представлено акустическое изображение (В/D-скан) глаза цыпленка перепела в возрасте 10 сут. В отличие от полученного *in situ* акустического изображения на рис. 2б, данное изображение получено *in vitro* (рис. 3а). На изображениях визуализируется роговица, передняя камера, хрусталик,

Таблица 2. Результаты ультразвуковых биометрических измерений глаза японского перепела *Coturnix japonica* в условиях *in situ*. Величина среднеквадратичного отклонения варьируется внутри погрешности измерения (± 15 мкм)

Возраст, сут	Вес, г	Осевая длина, мм	Коэффициент сферичности	Передняя камера, мм	Роговица, мм	Хрусталик, мм	Стекловидное тело, мм	Хориореинальный комплекс, мм	Склера, мм
10	—	5.85	0.71	0.60	0.14	1.85	3.05	0.30	0.14
20	75	6.45	0.74	0.58	0.14	2.01	3.55	0.33	0.13
20*	69	7.50	0.75	0.63	0.14	2.15	4.32	0.35	0.125
30	127	7.20	0.73	0.61	0.16	2.05	3.97	0.34	0.14
65	181	8.15	0.78	0.85	0.15	2.52	4.37	0.44	0.16

* Развитие при синем освещении.

стекловидное тело, ретинальный пигментный эпителий (РПЭ), сосудистая оболочка, склера. Для более ясной интерпретации акустического изображения на рис. 3б приведено полученное нами в более ранней работе [19] гистологическое изображение строения заднего сегмента глаза.

Уровень выработки мелатонина в организме перепела в 10 раз выше, чем у человека. В практике клинических лабораторий, специализирующихся на определении содержания мелатонина в крови, существует некая норма. В нашем случае лаборатория “АРХИМЕД”, в которой были выполнены исследования на лабораторных живот-

ных, использует следующие референсные значения для человека: 15.0–30.0 пг/мл утром, менее 4.9 пг/мл днем, 8.0–40.0 пг/мл вечером (с 22 до 24), 52.3–149.4 пг/мл ночью. У детей в возрасте 1–5 лет норма в 3–4 раза выше, у лиц пожилого возраста — ниже на 20% [20]. По нашим измерениям в глазах перепела более 85% мелатонина сконцентрировано непосредственно в сетчатке, причем у цыплят оно оказывается в 20 раз выше, чем у взрослых птиц. Результаты, полученные в ходе эксперимента, представлены в табл. 3.

Ретинальный мелатонин в детском глазу отвечает за развитие миопии. Известно, что у близо-

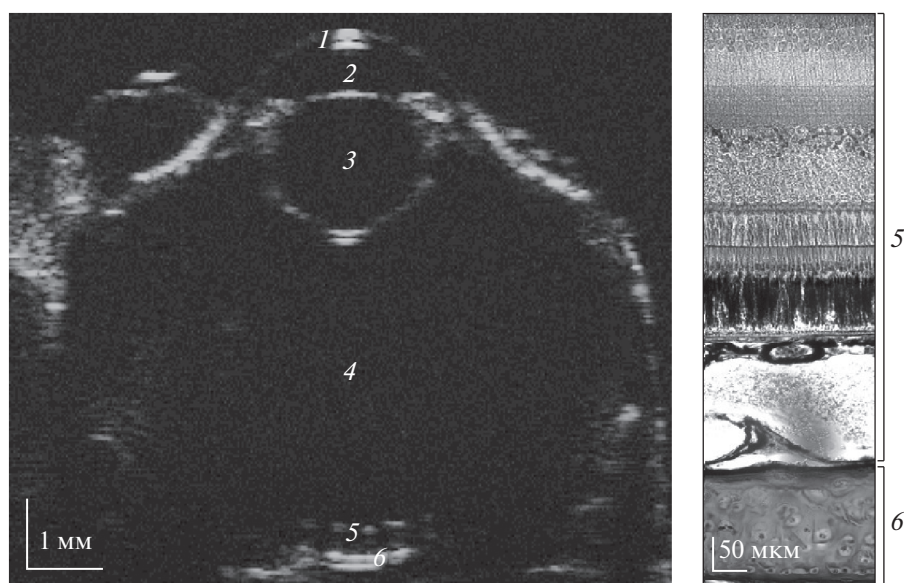


Рис. 3. Акустическая микроскопия глаза перепела в возрасте 10 сут в условиях *in vitro*: а — В/Д-скан, б — гистологическое изображение; обозначения те же, что и на рис. 2.

Таблица 3. Результаты измерения содержания мелатонина в тканях глаза и сыворотке крови японского перепела *Coturnix japonica* для двух возрастов в зависимости от освещения. Относительная ошибка измерения — не более 20%

Образец	Содержание мелатонина, пг/мл	
	“желтый” свет	“синий” свет
Сетчатка	30 сут развития	
	31447	24780
Сетчатка РПЭ + сосудистая оболочка Стекловидное тело Всего в тканях глаза Сыворотка крови	8 мес развития	
	1797.3 (86%)	1560.5 (88%)
	214.9 (11%)	191.9 (11%)
	69.1 (3%)	19.6 (1%)
	2081.3 (100%)	1762 (100%)
Сыворотка крови	774.6	722.8

руких людей содержание мелатонина существенно выше, чем у людей с нормальными пропорциями глаз [3]. По результатам наших исследований условия “синего” повседневного освещения на начальном этапе развития незначительно снижают уровень мелатонина как в тканях глаза, так и в сыворотке крови на 7–15%, что, строго говоря, лежит в пределах погрешности измерений и свидетельствует лишь о тенденции.

Еще одним дополнительным звеном, определяющим светозависимое формирование оптической системы глаза, является толщина кровеносной сосудистой оболочки, подстилающей сетчатку и РПЭ и осуществляющей питание глаза. Толщина этой оболочки влияет на аккомодацию глаза и настройку резкости изображения. По нашим данным, полученным при помощи акустической микроскопии, толщина этого слоя увеличивается с возрастом в среднем со 150 (10-е сутки) до 200 мкм (65-е сутки). Кроме того, полученные данные говорят о некотором незначительном утолщении сосудистой оболочки в процессе роста птиц при “синем” освещении (7%). Это подтверждается ранее полученными нами данными гистологического исследования, где было показано, что у старых содержащихся на коротковолновом (“синем”) освещении птиц (52 недели) общая толщина сосудистой оболочки оказывается больше на 30% по сравнению с нормой [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что методы акустической микроскопии (ультразвуковой биометрии) и оптической когерентной томографии могут использоваться для исследований *in vivo*, *in situ* и *in vitro* глаза на лабораторной животной модели перепела. Измерения *in vivo* являются наиболее актуальными и позволяют выполнять многократное наблюдение в течение всего онтогенеза птицы и наблюдать из-

менения структуры глаза с возрастом и при смене спектрального состава повседневного освещения.

Экспериментальные исследования, выполненные в рамках настоящей работы, показывают, что при нормальном развитии в первой трети жизни глаза перепелов растут пропорционально (коэффициент сферичности) и линейно. Полученные нами данные о соотношении размеров основных оптических структур глаза перепела могут использоваться в качестве сравнительной шкалы при дальнейших исследованиях с помощью этой животной модели, в частности при экспериментальном воспроизведении миопических рефракционных нарушений. В дальнейшем предполагается исследовать влияние спектрального состава повседневного освещения на формирование глаза в раннем постнатальном периоде в рамках задач по моделированию детской миопии.

Коллектив выражает благодарность сотрудникам аналитической лаборатории “АРХИМЕД” (зав. лаб. А.Н. Нижник) за помощь в определении концентрации мелатонина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rucker F. // Exp. Eye Res. 2019. V. 184. P. 172.
2. Nickla D.L. // Exp. Eye Res. 2013. V. 114. P. 25.
3. Foulds W., Bharathi V., Luu D. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. V. 54. P. 8004.
4. Ostrin L.A. // Clin. Exp. Optom. 2019. V. 102. Issue 2. P. 99.
5. Kearney S., O'Donoghue L., Pourshahidi L.K. et al. // Ophthalm. Physiol. Opt. 2017. V. 37. Issue 5. P. 557.
6. Tosini G., Iuvone P. The Retina and Circadian Rhythms. Springer, 2014.
7. Авемусов С.Э., Кац М.В. // Universum: медицина и фармакология. 2017. № 4(38). С. 15.
8. Pecora R.A., Watanabe S.S., Brito G.M. et al. // Vet Ophthalmol. 2020. V. 23. № 2. P. 358.
9. Lemons R.A., Quate C.F. // Science. 1975. V. 188. P. 905.

10. *Foster F.S., Zhang M.Y., Duckett A.S. et al.* // *Investig. Ophthalm. Visual Science*. 2003. V. 44. P. 2361.
11. *Nakamura Y., Kusano K.F., Nakamura K. et al.* // *World J. Cardiovascular Diseases*. 2013. V. 3. Issue 1. P. 22.
12. *Pavlin C.J., Easterbrook M., Hurwitz J.J. et al.* // *Amer. J. Ophthalmol.* 1993. V. 116. P. 854.
13. *Закутайлов К.В., Левин В.М., Петронюк Ю.С.* // *За- водская лаборатория. Диагностика материалов*. 2009. Т. 75. № 8. С. 28.
14. *Хилл К., Тер Хаар Г., Бэмбер Дж.* *Ультразвук в меди- цине* / Под ред. Сапожникова О.А. и др. М.: Физ- малит, 2008.
15. *Яковлева М.А., Радченко А.Ш., Костюков А.А. и др.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 18.
16. *Васильева А.Д., Юрина Л.В., Леонова В.Б. и др.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 24.
17. *Кононихин А.С., Захарова Н.В., Юсупов А.Э. и др.* // *Хим. физика*. 2019. Т. 38. № 12. С. 59.
18. *Иванов Д.Г., Пеков С.И., Бочаров К.В. и др.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 41.
19. *Сигаева А.О., Сережникова Н.Б., Погодина Л.С. и др.* // *Сенсорные системы*. 2015. Т. 29. № 4. С. 354.
20. *Анисимов В.Н.* *Мелатонин как геропротектор и ан- тиканцероген*. СПб.: ЭлПринт, 2014.