

УДК 534.6

ОЦЕНКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ЭМБРИОНОВ DANIO RERIO С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО УЛЬТРАЗВУКОВОГО СКАНЕРА

© 2024 г. Л. А. Зыкова^{1,*}, А. Б. Бурлаков², С. А. Титов¹, А. Н. Богаченков³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Научно-технологический центр уникального приборостроения Российской академии наук”, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова”, Москва, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение науки “Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля Российской академии наук”, Москва, Россия

*E-mail: lida_zykova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.08.2023

После доработки 15.09.2023

Принята к публикации 29.09.2023

Сердце эмбриона рыбы *Danio rerio* в возрасте 40–48 ч после оплодотворения было исследовано *in vivo* с помощью импульсного сканирующего акустического микроскопа в частотном диапазоне 50–100 МГц. Разработанная методика позволяет оценивать параметры сердечной деятельности в течение нескольких часов и наблюдать аномальное поведение сердца, такое как аритмия.

DOI: 10.31857/S0367676524010289, EDN: RYNBHY

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время рыбы *Danio rerio* на эмбриональной стадии развития все шире используются в качестве модельного объекта для исследования в области биологии развития и медицины. Они применяются для изучения различных сердечно-сосудистых заболеваний человека, включая врожденные пороки развития, такие как аритмия. Оптическая микроскопия [1–4] является широко признанным методом трехмерной визуализации сердца рыб в реальном времени. Она применяется для наблюдения за строением эмбриона рыбы, его ростом, делением клеток и кровотоком. Однако визуализация с помощью электромагнитного излучения имеет некоторые ограничения в наблюдении за органами, расположенными внутри образца из-за низкой контрастности зародышевых элементов и рассеяния света на оптических неоднородностях. Также большинство методов оптической микроскопии основаны на использовании излучения высокой интенсивности и окрашивания объекта, которые оказывают разрушительное воздействие на живой организм и представляют серьезную проблему при длительном исследовании эмбриона *in vivo*. В высшей степени неинвазивными для живых организмов представляются ультразвуковые методы визуализации. Известно применение высоко-частотного ультразвука для исследования сердца

взрослых особей *Danio rerio* [5, 6], и личинок вьюна *Misgurnus fossilis* [7, 8]. Данная работа посвящена разработке методики ультразвуковой визуализации и длительного мониторинга сердца невылупившихся эмбрионов *Danio rerio*, характерный размер которого составляет 100 мкм.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Экспериментальные исследования в работе проводились с помощью сканирующего импульсного акустического микроскопа, в иммерсионную водяную ячейку которого помещался эмбрион (рис. 1). Ультразвуковые сфокусированные волны, излучаемые преобразователем 1, проходили внутрь объекта, последовательно отражаясь от внутренних его структур. Волны, рассеянные образцом, принимались в эхо-импульсном режиме этим же преобразователем и регистрировались управляющей электроникой в зависимости от времени. Формирование ультразвуковых изображений осуществлялось путем механического сканирования преобразователя по координатам x и y . Номинальная частота преобразователя была равна 100 МГц, что при апертурном угле сфокусированного пучка 35° обеспечивало пространственное поперечное разрешение $\delta x \approx 20$ мкм, а использование импульсных сигналов с относительной полосой 70% позволяло

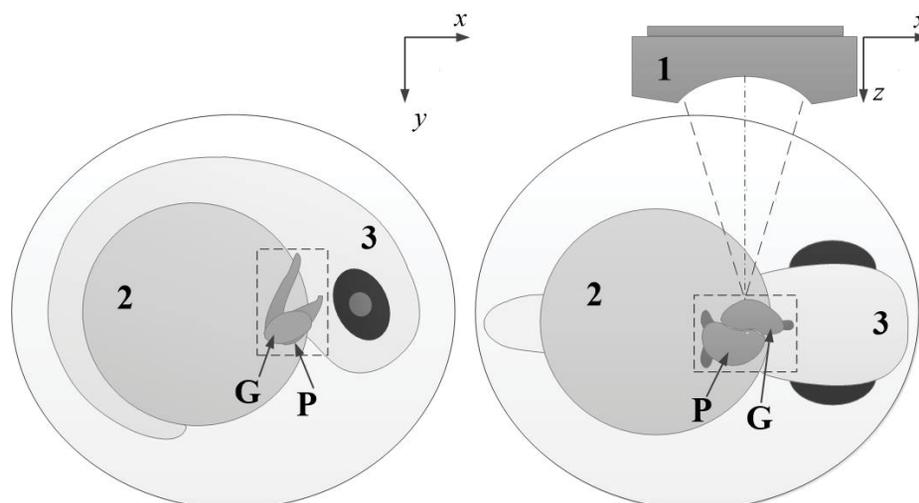


Рис. 1. Схема эксперимента: 1 – ультразвуковой преобразователь; 2 – желток; 3 – голова эмбриона.

оценить продольное разрешение на том же уровне $\delta z \approx 20$ мкм. В дополнение к ультразвуковому блоку для контроля положения эмбриона использовался инвертированный оптический микроскоп (не показан на рис. 1). Более подробное описание установки можно найти в работах [7–9].

В данной работе эксперимент был проведен на эмбрионе *Danio rerio* в возрасте 40–48 часов после оплодотворения. На этой стадии развития зародыш хорошо сформирован, а его тело охватывает округлый желток 2, как показано на рис. 1. Сердце эмбриона, в котором можно различить желудочек G и предсердие P, располагалось в области головы 3 близко к границе с желтком. Плоскость симметрии эмбриона располагали приблизительно параллельно фокальной плоскости ультразвукового преобразователя. При такой ориентации обеспечивался боковой доступ к сердцу, причем желудочек G располагался ближе к преобразователю 1. Для обеспечения относительной неподвижности эмбриона во время измерений его сначала анестезировали, помещая в 0.2% раствор лидокаина на 1 минуту перед загрузкой в иммерсионную ячейку микроскопа. Заметных отклонений в развитии организма в последующие дни после эксперимента выявлено не было.

В ходе эксперимента был получен набор пространственно-временных сигналов в области сердца, мониторинг которого проводился на протяжении 2 ч. Ультразвуковые данные регистрировались в формате $s(t, T, x)$, $s(t, T, y)$, где t – время распространения ультразвуковых волн вглубь образца, а T – “медленное” время. Кадры $s(t, T)$ (М-сканы) записывались в зависимости от времени T в течение 3 с в 60 положениях ультразвукового преобразователя с шагом 4 мкм. Таким образом, поперечный размер сечения объекта, который

соответствовал набору данных $s(t, T, x)$, составлял 240 мкм, а время записи – примерно 200 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлен типичный М-скан $s(t, T)$, измеренный приблизительно в центре сердца в точке $x = 112$ мкм в момент времени с начала эксперимента $T_e = 71$ мин. Значения полученных сигналов представлены градациями серого цвета. На полученных изображениях можно распознать характерное поведение ультразвукового сигнала, которое демонстрирует периодичность биений сердца с периодом $T_0 = 0.78$ с.

Ближайшие к ультразвуковому преобразователю импульсы E образуются за счет отражения волн от внешнего слоя эмбриона, форма и положение которых почти не меняются со временем T . Периодические отклики W формируются за счет отражений от стенок и внутренних мышечных элементов сердца. Генерация шумоподобных сигналов F может объясняться рассеянием волн на движущихся элементах крови, детальная структура которых не является периодической.

Характер движения регистрируемых ультразвуковых откликов зависит от фазы сердечного цикла, что позволяет различать периоды систолы S и диастолы D. В фазе диастолы D отклики стенок W движутся в противоположных направлениях, обеспечивая наполнение кровью желудочка G. В фазе систолы S они движутся навстречу друг другу, выбрасывая кровь наружу из желудочка по сосуду. Движение откликов крови F в фазе диастолы D направлено вверх, в сторону преобразователя, что соответствует процессу перемещения крови из предсердия, которое расположено в данном эксперименте глубже желудочка. В фазе систолы S вертикальная компонента скорости крови меняет

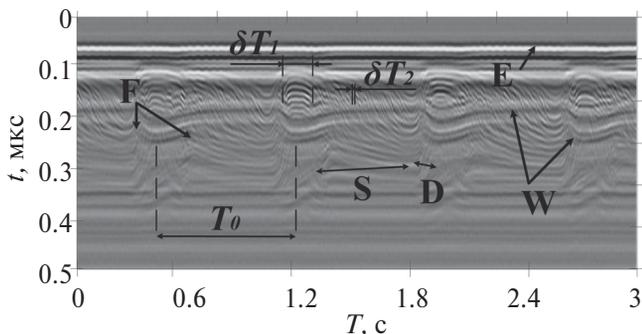


Рис. 2. М-скан $s(t, T)$, записанный в точке $x = 112$ мкм.

направление движения, а в короткий промежуток времени между диастолой и систолой наблюдается период относительного покоя.

Следует отметить, что объем элемента пространственного разрешения системы визуализации, определяемый ее продольной и поперечной разрешающими способностями, может быть оценен как $(\delta x)^2 \delta z \approx 10^4$ мкм³. Учитывая, что характерный размер эритроцитов эмбриона рыбы, как и у человека, составляют примерно 7 мкм, в объеме элемента разрешения системы содержатся порядка 10 отражателей. Таким образом, отклик F образуется в результате интерференции волн, отраженных от отдельных клеток крови, и имеет спекл-структуру. Характерное время стабильности этого отклика зависит от фазы и может изменяться от $\delta T_1 \approx 0.1$ с в паузе между диастолой и систолой до $\delta T_2 \approx 0.01$ с в фазе систолы (рис. 2). Можно предположить, что времена δT ограничиваются следующими причинами. Так турбулентность течения крови может приводить к изменению относительного положения эритроцитов и, следовательно, к изменению результирующего сигнала. Также следует принять во внимание, что у частиц есть также горизонтальная компонента скорости V_x . Учитывая, что поперечный размер ультразвукового пучка равен δx , можно получить верхнюю оценку горизонтальной

скорости кровотока: $V_x < \delta x / \delta T$. Так для $\delta T_2 \approx 0.01$ с скорость не может превышать значения 2 мм/с.

Для разделения откликов от элементов крови и мышечных тканей обычно используют фильтрацию пространственно-временного сигнала по времени T [7, 10]:

$$s_{LF(HF)}(t, T, x) = s(t, T, x) * h_{LF(HF)}(T), \quad (1)$$

где символ $*$ обозначает операцию свертки, а $h_{LF}(T)$, $h_{HF}(T)$ являются импульсными откликами цифровых фильтров низких и высоких частот, соответственно, а результирующие сигналы s_{LF} , s_{HF} отображают медленно и быстро движущиеся элементы, соответственно. В данной работе использовались фильтры с конечной импульсной характеристикой длиной 50 отсчетов с частотами среза $f_d = 25$ Гц. Учитывая связь величины доплеровского частотного сдвига со скоростью движения [10], фильтр высоких частот с такой частотой среза пропускает сигналы от отражателей, вертикальная компонента скорости которых превышает значение:

$$V_d \approx \frac{f_d C_0}{2f_0}. \quad (2)$$

Считая, что в данном эксперименте $f_0 \approx 75$ МГц и скорость звука в среде близка к скорости звука в воде $C_0 \approx 1500$ м/с, оценка составляет $V_d \approx 0.25$ мм/с.

Расчет вертикальной компоненты скорости кровотока может производиться по формуле [10]:

$$V_z = \frac{\Delta z}{\Delta T}, \quad (3)$$

где Δz – вертикальное смещение отклика за промежуток “медленного” времени ΔT , в пределах которого траектория движения частицы является линейной. Максимальная скорость движения $V_z = 2.8$ мм/с достигается в фазе диастолы. Во время систолы скорость несколько меньше, достигая примерно 2 мм/с, и направлена в противоположную

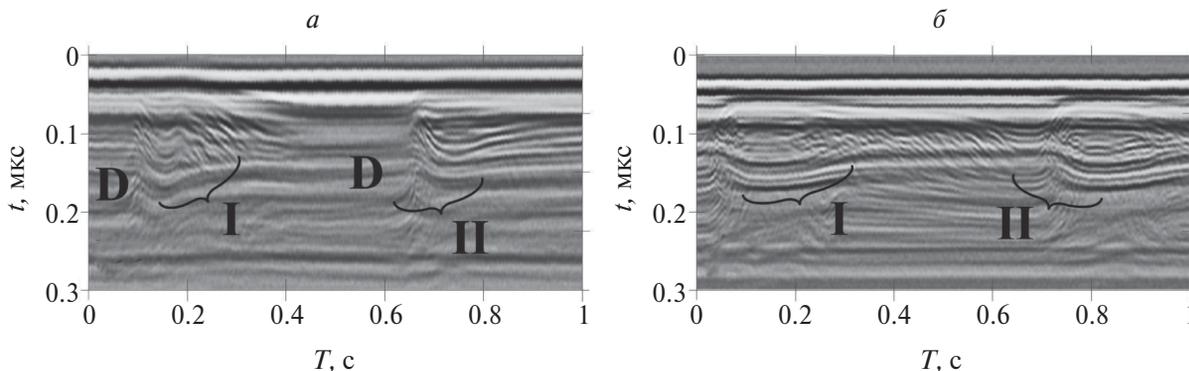


Рис. 3. Фрагменты М-сканов, измеренные в моменты $T_c = 41$ мин (а) и $T_c = 71$ мин (б).

сторону. Кроме того, она заметно зависит от времени и положения точки анализа.

Аналогичным образом может быть оценена скорость движения стенок желудочка. Можно сказать, что она достигает максимального значения 0.4 мм/с также в фазу диастолы. Таким образом, в эмбрионе скорости движения стенок могут достигать значительных величин, и полное разделение путем фильтрации (1) ультразвуковых откликов от крови и от стенок сердца во всем диапазоне их скоростей является затруднительным.

Высокая степень неинвазивности ультразвука позволила проводить непрерывные наблюдения эмбриона в течение нескольких часов. Было установлено, что период сердцебиения T_0 зависит от момента измерения T_e . В начале эксперимента период равен $T_0 \approx 0.62$ с, затем монотонно увеличивается, достигая через 2 часа значения $T_0 \approx 0.85$ с. Поскольку условия окружающей среды, в том числе температура, в ходе эксперимента поддерживались постоянными, можно предположить, что этот эффект обусловлен воздействием анестезии на сердечную деятельность.

Помимо изменения периода, профили сердечных сокращений не являются стабильными в течение эксперимента. Можно обнаружить два типа поведения, обозначенные I и II на рис. 3а. Наиболее сильное различие между этими профилями имеет место в начале эксперимента. Со временем эта разница становится менее выраженной.

При сравнении профилей I и II диастола D выглядит более стабильной, чем систола S. В фазе систолы профиль II демонстрирует слабый кровоток. Эту ненормальную работу сердца можно интерпретировать как сердечную периодическую аритмию, вызванную, скорее всего, наркозом. Через 30 мин (рис. 3б) аperiodичность практически исчезает, объемный кровоток увеличивается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные результаты, полученные в данной работе, показывают, что разработанная высокочастотная ультразвуковая установка имеет

пространственное разрешение, достаточное для визуализации и мониторинга сердечно-сосудистой деятельности эмбрионов *Danio rerio*. Цифровая обработка ультразвуковых пространственно-временных сигналов может быть использована для визуализации сердца эмбриона, обнаружения движения крови, измерения скорости кровотока. С помощью разработанной методики исследования можно отслеживать период сердечных сокращений в течение нескольких часов, а также наблюдать аномальное поведение сердца, такое как аритмия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта RSF-MOST 22-49-08012.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schlaeppli A., Graves A., Weber M., Huiskens J.* // J. Vis. Exp. 2021. V. 174. Art. No. e62741.
2. *Salehin N., Villarreal C., Teranikar T. et al.* // Ann. Biomed Eng. 2021. V. 49. No. 9. P. 2080.
3. *Kurnia K.A., Saputra F., Roldan M.J.M. et al.* // Inventions. 2021. V. 6. No. 1. P. 8.
4. *Ulhaq Z.S.* // Int. J. Vet. Sci. Med. 2019. V. 7. No. 1. P. 31.
5. *Chang C.C., Chen P.Y., Huang H., Huang C.C.* // IEEE Trans. Biomed. Eng. 2019. V. 66. No. 6. P. 1742.
6. *Ho-Chiang C., Huang H., Huang C.C.* // Quant. Imaging Med. Surg. 2019. V. 10. No. 1. P. 66.
7. *Титов С.А., Бурлаков А.Б., Богаченков А.Н.* // Акуст. журн. 2021. Т. 67. № 5. С. 571; *Titov S.A., Burlakov A.B., Bogachenkov A.N.* // Acoust. Phys. 2021. V. 67. No. 5. P. 562.
8. *Machikhin A.S., Zykova L.A., Burlakov A.B. et al.* // J. Phys. Conf. Ser. 2021. V. 2127. Art. No. 012061.
9. *Burlakov A.B., Titov S.A., Bogachenkov A.N.* // J. Commun. Technol. Electron. 2022. V. 67. No. 4. P. 456.
10. *Hill C.R., Bamber J.C., Haar G.R.* Physical principles of medical ultrasonics. Chichester: John Wiley and Sons, 2004. 528 p.

Estimation of the cardiovascular system of *Danio rerio* embryos using high-frequency ultrasound scanner

L. A. Zyкова^{a, *}, A. B. Burlakov^b, S. A. Titov^a, A. N. Bogachenkov^c

^aScientific and Technological Center of Unique Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117342 Russia

^bLomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^cInstitute of Biochemical Physics of Russian Academy of Science, Moscow, 119334 Russia

**e-mail: lida_zykova@mail.ru*

The heart of a *Danio rerio* fish embryo at the age of 40—48 hours after fertilization was studied in vivo using a pulsed scanning acoustic microscope in the frequency range of 50—100 MHz. The developed technique allows us to evaluate the parameters of cardiac activity for several hours, and to observe abnormal behavior of the heart, such as arrhythmia.