

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.157>

КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ТКАНЕВЫХ СТРУКТУР СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОАРТРОЗЕ У КРЫС

Научная статья

Крылов П.А.^{1,*}, Абдулова А.А.², Новочадов В.В.³

¹ORCID : 0000-0001-9587-5886;

²ORCID : 0000-0002-3444-2291;

³ORCID : 0000-0001-6317-7418;

^{1,2,3}Волгоградский государственный университет, Волгоград, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (krylov.pavel[at]volsu.ru)

Аннотация

Остеоартроз – распространенное дегенеративное заболевание суставов. Использование алгоритмов кластеризации в исследованиях как суставного хряща, так и других тканей, может увеличить точность и объективность результатов экспериментов. В связи с этим целью работы стало проведение пилотного исследования по использованию кластерного анализа для выявления тканевых структур суставного хряща в норме и при экспериментальном остеоартрозе у крыс. В результате пилотных опытов с использованием кластерного анализа хондроцитов суставного хряща были выявлены статистически достоверные изменения клеток в кальцинированной зоне, а также изменения их пространственной организации во всей хрящевой ткани тибиального плато между интактным состоянием и экспериментальным остеоартрозом. Визуализация результатов кластерного анализа также показала, что при экспериментальном остеоартрозе происходит пространственное перераспределение по сравнению с интактным состоянием.

Ключевые слова: остеоартроз, морфология, кластерный анализ, суставной хрящ, крыса.

A CLUSTER ANALYSIS OF ARTICULAR CARTILAGE TISSUE STRUCTURES IN EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS IN RATS

Research article

Krylov P.A.^{1,*}, Abdulova A.A.², Novochadov V.V.³

¹ORCID : 0000-0001-9587-5886;

²ORCID : 0000-0002-3444-2291;

³ORCID : 0000-0001-6317-7418;

^{1,2,3}Volgograd State University, Volgograd, Russian Federation

* Corresponding author (krylov.pavel[at]volsu.ru)

Abstract

Osteoarthritis is a common degenerative joint disease. The use of clustering algorithms in studies of both articular cartilage and other tissues can increase the accuracy and objectivity of experimental results. Therefore, the aim of this work was to conduct a pilot study on the use of cluster analysis to identify tissue structures of articular cartilage in normal and experimental osteoarthritis in rats. Pilot experiments using cluster analysis of articular cartilage chondrocytes identified statistically significant changes in cells in the calcified zone, as well as changes in their spatial organization throughout the cartilage tissue of the tibial plateau between the intact state and experimental osteoarthritis. Visualization of the cluster analysis results also showed that there was a spatial redistribution in experimental osteoarthritis compared to the intact state.

Keywords: osteoarthritis, morphology, cluster analysis, articular cartilage, rat.

Введение

Остеоартроз (ОА) является одним из самых распространённых заболеваний, им страдает свыше 200 миллионов человек в мире и наблюдается неуклонная тенденция к возрастанию частоты ОА [1], [2], [3]. В настоящее время активно разрабатываются методы и способы лечения ОА [4], [5], [6]. Одним из этапов доказательности результатов той или иной технологии является проведение морфологического анализа суставного хряща коленного сустава для оценки эффективности. Традиционно такая оценка производится экспертным методом, что может вносить значительную субъективность и человеческий фактор при интерпретации результатов.

В настоящее время актуальной является разработка алгоритмов применяемых к изображениям гистологических препаратов с целью повышения эффективности их анализа [7]. Одним из таких подходов является компьютерная кластеризация с помощью которой можно унифицировано разделить суставной хрящ на зоны и выделить клеточные элементы. В независимости от метода кластеризации обязательным является правильный подбор параметров, которые могут описывать как сам объект, так и его окружение с учетом специфики ткани. Возможность использования комбинации флуоресцентных красителей и конфокальной микроскопии позволяет получать высококонтрастные изображения, где клеточные элементы и тканевые структуры легко идентифицируются за счет выраженных границ [8]. Это в свою очередь упрощает получение количественных параметров для кластерного анализа и его работы. При этих достоинствах, конфокальная микроскопия является очень дорогостоящей и трудоемкой. В большинстве гистологических лабораторий применяют «стандартные» методы окраски. В связи этим в данной работе акцент сделан

на применении кластерного анализа для изучения тканевых структур на примере хрящевой ткани при окраске гематоксилином и эозином.

Целью данной работы стало проведение пилотного исследования по использованию кластерного анализа для выявления тканевых структур суставного хряща в норме и при экспериментальном ОА у крыс.

Методы и принципы исследования

Образцы суставного хряща были взяты у 12 белых крыс самцов линии Wistar, массой 250–300 г. Все манипуляции проводили в соответствии с этическими нормами, изложенных в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» и директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Выведение животных осуществляли с помощью внутрибрюшинного введения десятикратной дозы препарата «Рометар», Россия (200 мг/кг массы). В работе было сформировано 2 группы по 6 животных: интактная (интакт) и с экспериментальным ОА (ОА3), моделирование которого осуществлялось путем внутрисуставного введения суспензии стерильного медицинского талька («АГАТ-МЕД», Россия) [19]. Животных из эксперимента выводили через 3 недели. Все работы с материалом, включая окраску гематоксилином и эозином, осуществлялись по общепринятому протоколу. Фотопротоколирование микроскопических изменений производили с использованием микроскопа Микмед-5 при увеличении 20х, специализированной камеры TourCam и программного обеспечения TourCamView. Анализ изображений участков суставного хряща шириной 100 мкм осуществляли с использованием программы в свободном доступе Fiji v. 2.14.0 (National Institutes of Health, США) [9]. Для оценки степени развития ОА использовали бальную шкалу OARSI [10].

Для выявления зональной структуры и группировки хондроцитов на кластеры учитывали их площадь, периметр, длину, ширину и положение центра по X и Y осям, с целью определения локализации этих клеток относительно глубины суставного хряща. При подсчете этих параметров суставной хрящ располагался так, чтобы поверхностная зона находилась снизу, а его глубокая зона – сверху. Так, наименьшие значения по оси Y принимали центры тех клеток, которые располагались ближе к поверхности хряща. Для кластеризации был использован метод k-средних. Все клетки, в пределах участка шириной 100 мкм, разделялись на 4 кластера, которые представляли собой 4 зоны суставного хряща: 1 — поверхностная; 2 — промежуточная; 3 — глубокая; 4 — кальцинированная. Кластеризацию проводили по всем измеряемым параметрам. Для начального положения центров кластеров задавали значение k-means++ и проводили 12 итераций. Полученные кластеры каждого участка визуализировали по трем параметрам с помощью библиотеки matplotlib.

Количественные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 12.0 (StatSoftInc., США) с расчетом медианы, 1-ого квартиля и 3-ого квартиля. Для оценки достоверности различий был применен критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Основные результаты и обсуждение

У интактных крыс отсутствовали какие-либо повреждения суставного хряща, а именно суставные поверхности имели гладкий рельеф и четкие границы всех исследуемых зон (оценка по шкале OARSI — 0 баллов). Через три недели после введения медицинского талька выявлялись значительные повреждения суставного хряща коленного сустава. Было зафиксировано частичное или полное разрушение хрящевой ткани, множество гипертрофированных хондроцитов, а также сильное изменение рельефа суставной поверхности, а также образование новых Гаверсовых каналов (оценка по шкале OARSI — 2–3 балла).

В результате анализа изображения суставного хряща в норме и при экспериментальном ОА были получены значения каждого из исследуемых параметров для каждого кластера. Статистический анализ показал достоверные различия у ряда параметров 4 кластера между суставным хрящом интактной группы и экспериментального ОА (рис. 1). В других кластерах статически значимых различий параметров клеточных элементов обнаружено не было ($p > 0,05$).

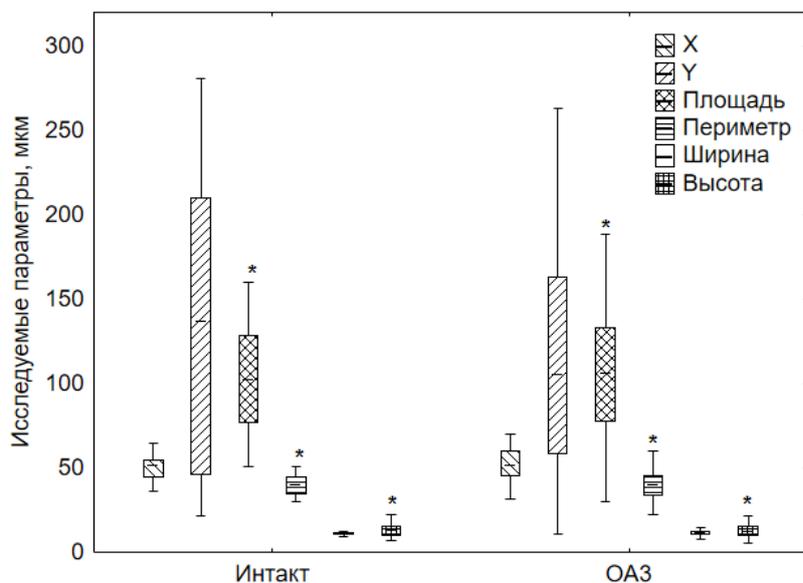


Рисунок 1 - Исследуемые параметры 4 кластера (кальцинированной зоны) суставного хряща в норме и при экспериментальном ОА через 3 недели
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.157.1>

У интактных животных и в группе с экспериментальным ОА в четвертом кластере параметры X и Y не имели статистически значимых различий ($p > 0,05$). У интактных крыс, с учетом неповрежденного хряща с нормальной кальцинированной зоной (кластер 4) и отсутствием повреждений поверхностной зоны (кластер 1), значения площади и периметра хондроцитов, а также их высоты были выше по сравнению с экспериментальным ОА в 1,3 раза соответственно ($p < 0,05$). Это может свидетельствовать о том, что при экспериментальном ОА происходит деградация хрящевой ткани и ее дифференцировка в кальцинированную костную ткань, а также разрушение поверхностной зоны, что приводит к гибели хондроцитов, а клетки, находящиеся на условной границе глубокой зоны промежуточной зоны, имеют меньшие размеры и большое число, что в дальнейшем может привести к патологической кластеризации и потере биомеханических свойств суставного хряща [11].

После проведения кластеризации, выявленные кластеры и клеточные элементы, включенные в них, сравнивали по качеству распределения и соответствия структурным зонам суставного хряща (рис. 2).

У большинства интактных животных распределение на кластеры соответствовало нормальной пространственной организации клеток в зонах суставного хряща. При экспериментальном ОА нарушалась слоистая структура хряща и кластеры распределялись неравномерно, а также наблюдалось их перемешивание. Этому могло способствовать разрушение суставного хряща, его кальцификация и гибель хондроцитов с характерным фенотипом. В результате алгоритм кластеризации распределял оставшиеся клеточные элементы на четыре кластера, в то время как четвертый кластер, соответствующий кальцинированной зоне, имел значительные изменения.

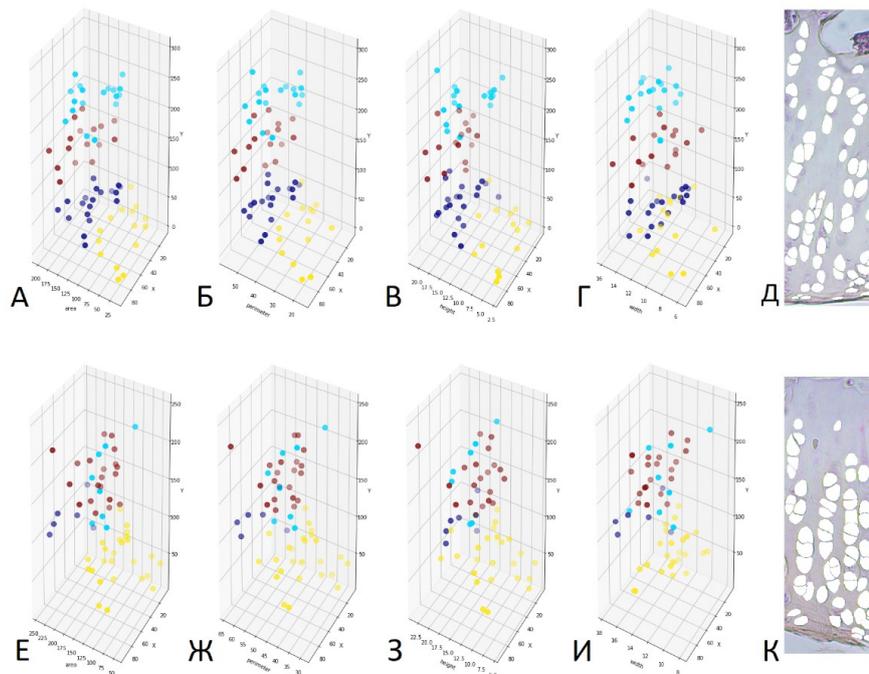


Рисунок 2 - Кластеризация хондроцитов суставного хряща тибиального плато крыс интактной группы (А-Д) и группы с ОА (Е-К) на 4 структурные зоны по параметрам X и Y положения центра клеток, площади, периметра, высоты и ширины клеток с визуализацией в трех плоскостях
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.157.2>

Примечание: А и Е - ось X – это площадь клеток, ось Y – положение клеток по оси Y в суставном хряще, а ось Z – положение клеток по оси X в суставном хряще; Б и Ж - ось X – это периметр клеток, ось Y – положение клеток по оси Y в суставном хряще, а ось Z – положение клеток по оси X в суставном хряще; В и З - ось X – это высота клеток, ось Y – положение клеток по оси Y в суставном хряще, а ось Z – положение клеток по оси X в суставном хряще; Г и И - ось X – это ширина клеток, ось Y – положение клеток по оси Y в суставном хряще, а ось Z – положение клеток по оси X в суставном хряще; Д – участок суставного хряща тибиального плато интактной группы в увеличении 20х, с которого были получены и представлены данные по указанным параметрам (А-Г); К – участок суставного хряща тибиального плато при ОА в увеличении 20х, с которого были получены и представлены данные по указанным параметрам (Е-И). Голубым цветом обозначены кластеры кальцинированной зоны; красным – глубокой; синим – промежуточной; желтым – поверхностной

На качество распределения кластеров оказывал сильное влияние правильный подбор параметров, от комбинации которых зависело в какую группу будет определена каждая клетка. Сложность выполнения качественного распределения на зоны суставного хряща заключалась в том, что некоторые хондроциты имели схожие значения параметров, при этом обладая различным фенотипом.

Принципиальный вклад в распределение на кластеры вносили те параметры, значения которых значительно отличались друг от друга среди объектов. Так, если из большого количества объектов только несколько имели высокое значение площади, они выносились в отдельный кластер, поэтому включение такого параметра могло привести к отрицательным результатам.

Заключение

Таким образом, в ходе исследования проведены пилотные опыты по использованию кластерного анализа для выявления структурных изменений суставного хряща тибиального плато в норме и при экспериментальном остеоартрозе. В результате были выявлены изменения параметров хондроцитов четвертого кластера, соответствующего кальцинированной зоне суставного хряща. Визуализация результатов кластерного анализа показала, что при экспериментальном остеоартрозе через 3 недели происходит изменение кластеров и их пространственного распределения по сравнению с интактным состоянием.

Результаты пилотного исследования применения кластерного анализа могут быть использованы для дальнейшего изучения суставного хряща и других тканей, с учетом применения или оптимизации уже существующих алгоритмов в зависимости от целей и задач исследования.

Финансирование

Работа была выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых-кандидатов наук МК-199.2022.1.4.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

The work was carried out with the support of a grant from the President of the Russian Federation for young scientists-candidates of science МК-199.2022.1.4.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Boer C.G. Deciphering Osteoarthritis Genetics across 826,690 Individuals from 9 Populations / C.G. Boer, K. Hatzikotoulas, L. Southam [et al.] // *Cell*. — 2021. — 184(18). — p. 4784–4818. — DOI: 10.1016/j.cell.2021.07.038
2. Новаков В.Б. Факторы риска и молекулярные основы этиопатогенеза остеоартроза коленного сустава (обзор литературы) / В.Б. Новаков, О.Н. Новакова, М.И. Чурносков // *Гений ортопедии*. — 2021. — 27(1). — с. 112-120. DOI: 10.18019/1028-4427-2021-27-1-112-120.
3. Abujaber S. Impact of End-stage Knee Osteoarthritis on Perceived Physical Function and Quality of Life: A descriptive study from Jordan / S. Abujaber, I. Altubasi, M. Hamdan, R. Al-Zaben // *PloS one*. — 2023. — 18(6). — p. e0286962. DOI: 10.1371/journal.pone.0286962.
4. Горбатенко А.И. Применение ортобиологических продуктов в лечении остеоартроза коленных суставов / А.И. Горбатенко, Н.О. Костяная, Д.А. Маланин, В.Д. Сикилинда, М.В. Демещенко, И.А. Сучилин, В.В. Кондрашенко // *Саратовский научно-медицинский журнал*. — 2022. — 18(3). — с. 327-334.
5. Ответчикова Д.И. Критерии выбора препарата гиалуроновой кислоты для внутрисуставного введения пациентам разного возраста при остеоартрозе коленного сустава / Д.И. Ответчикова, Е.Н. Рябков // *Лечащий врач*. — 2022. — 25(7-8). — с. 47-51. DOI: 10.51793/OS.2022.25.8.007.
6. Li Y. Protective Effect of Selenium Nanoparticles in Osteoarthritis: In vitro and in vivo Studies / Y. Li, S. Zhu, J. Luo, Y. Tong, Y. Zheng, L. Ji, Z. He, Q. Jing, J. Huang, Y. Zhang, Q. Bi // *Drug Design, Development and Therapy*. — 2023. — 17. — p. 1515–1529. DOI: 10.2147/DDDT.S407122.
7. Тележникова И.М. Оценка индекса Ki67 при раке молочной железы с применением визуальной методики global / И.М. Тележникова, Л.Г. Жукова, В.В. Кометова, С.Г. Хомерики, Н.С. Карнаухов, Е.И. Хатькова, Г.Р. Сетдикова // *Клин. эксп. морфология*. — 2023. — 12(2). — с. 36–43. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43.
8. Karim A. The Clustering and Morphology of Chondrocytes in Normal and Mildly Degenerate Human Femoral Head Cartilage Studied by Confocal Laser Scanning Microscopy / A. Karim, A.K. Amin, A.C. Hall // *Journal of Anatomy*. — 2018. — 232(4). — p. 686-698. DOI: 10.1111/joa.12768.
9. Schindelin J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona // *Nature Methods*. — 2012. — 9(7). — p. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
10. Pritzker K.P. Osteoarthritis Cartilage Histopathology: Grading and Staging / K.P. Pritzker, S. Gay, S.A. Jimenez, K. Ostergaard, J.P. Pelletier, P.A. Revell, D. Salter, W.B. van den Berg // *Osteoarthritis and Cartilage*. — 2006. — 14(1). — p. 13-29. DOI: 10.1016/j.joca.2005.07.014.
11. Крылов П.А. Морфология суставного хряща при экспериментальном остеоартрозе при коррекции состава синовиальной жидкости сурфактант-ассоциированными белками / П.А. Крылов, К.В. Байдова, Н.В. Емельянов, В.В. Новочадов // *Клин. эксп. морфология*. — 2017. — 3(23). — с. 50-55.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Boer C.G. Deciphering Osteoarthritis Genetics across 826,690 Individuals from 9 Populations / C.G. Boer, K. Hatzikotoulas, L. Southam [et al.] // *Cell*. — 2021. — 184(18). — p. 4784–4818. — DOI: 10.1016/j.cell.2021.07.038
2. Novakov V.B. Faktory riska i molekulyarnye osnovy etiopatogeneza osteoartroza kolennogo sustava (obzor literatury) [Risk Factors and Molecular Entities of the Etiopathogenesis of the Knee Osteoarthritis (literature review)] / V.B. Novakov, O.N. Novakova, M.I. Churnosov // *Orthopaedic Genius*. — 2021. — 27(1). — p. 112-120. DOI: 10.18019/1028-4427-2021-27-1-112-120. [in Russian]
3. Abujaber S. Impact of End-stage Knee Osteoarthritis on Perceived Physical Function and Quality of Life: A descriptive study from Jordan / S. Abujaber, I. Altubasi, M. Hamdan, R. Al-Zaben // *PloS one*. — 2023. — 18(6). — p. e0286962. DOI: 10.1371/journal.pone.0286962.
4. Gorbatenko A.I. Primenenie ortobiologicheskikh produktov v lechenii osteoartroza kolennykh sustavov [Application of Orthobiological Products in the Treatment of Osteoarthritis of Knee Joints] / A.I. Gorbatenko, N.O. Kostjanaja, D.A. Malanin, V.D. Sikilinda, M.V. Demeschenco, I.A. Suchilin, V.V. Kondrashenko // *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. — 2022. — 18(3). — p. 327-334. [in Russian]
5. Otvetchikova D.I. Kriterii vybora preparata gialuronovoy kisloty dlja vnutrisustavnogo vvedenija patsientam raznogo vozrasta pri osteoartroze kolennogo sustava [Criteria for Choosing a Hyaluronic Acid Preparation for Intra-articular Administration in Patients of Different Ages with Osteoarthritis of the Knee Joint] / D.I. Otvetchikova, E.N. Rjabkov // *Attending Physician*. — 2022. — 25(7-8). — p. 47-51. DOI: 10.51793/OS.2022.25.8.007. [in Russian]

6. Li Y. Protective Effect of Selenium Nanoparticles in Osteoarthritis: In vitro and in vivo Studies / Y. Li, S. Zhu, J. Luo, Y. Tong, Y. Zheng, L. Ji, Z. He, Q. Jing, J. Huang, Y. Zhang, Q. Bi // *Drug Design, Development and Therapy*. — 2023. — 17. — p. 1515–1529. DOI: 10.2147/DDDT.S407122.
7. Telezhnikova I.M. Otsenka indeksa Ki67 pri rake molochnoj zhelezy s primeneniem vizual'noj metodiki global [Visual Assessment of the Ki67 Index in Breast Cancer Using the Global Scoring] / I.M. Telezhnikova, L.G. Zhukova, V.V. Kometova, S.G. Homeriki, N.S. Karnauhov, E.I. Hat'kova, G.R. Setdikova // *Clin. Exp. Morphology*. — 2023. — 12(2). — p. 36–43. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43. [in Russian]
8. Karim A. The Clustering and Morphology of Chondrocytes in Normal and Mildly Degenerate Human Femoral Head Cartilage Studied by Confocal Laser Scanning Microscopy / A. Karim, A.K. Amin, A.C. Hall // *Journal of Anatomy*. — 2018. — 232(4). — p. 686-698. DOI: 10.1111/joa.12768.
9. Schindelin J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona // *Nature Methods*. — 2012. — 9(7). — p. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
10. Pritzker K.P. Osteoarthritis Cartilage Histopathology: Grading and Staging / K.P. Pritzker, S. Gay, S.A. Jimenez, K. Ostergaard, J.P. Pelletier, P.A. Revell, D. Salter, W.B. van den Berg // *Osteoarthritis and Cartilage*. — 2006. — 14(1). — p. 13-29. DOI: 10.1016/j.joca.2005.07.014.
11. Krylov P.A. Morfologija sustavnogo hrjascha pri eksperimental'nom osteoartroze pri korrektsii sostava sinovial'noj zhidkosti surfaktant-assotsirovannymi belkami [Articular Cartilage Morphology in Experimental Osteoarthritis with and without Modification of Synovial Fluid by Surfactant-associated Proteins] / P.A. Krylov, K.V. Bajdova, N.V. Emel'janov, V.V. Novochadov // *Clin. exp. Morphology*. — 2017. — 3(23). — p. 50-55. [in Russian]