

ПОИСК ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДОСТИЖЕНИЯ ЦЕЛИ В СИСТЕМЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

В.В. Новочадов

Волгоградский государственный университет
Россия, 400062, Волгоград, пр. Университетский, 100
E-mail: novovv@rambler.ru

А.А. Широкий

Волгоградский государственный университет
Россия, 400062, Волгоград, пр. Университетский, 100
E-mail: mhwide@hotmail.com

Ключевые слова: математическое моделирование биологических процессов, активные системы, суставной хрящ, остеоартроз

Аннотация: Остеоартроз является важнейшей медико-социальной проблемой. Понимание и моделирование процессов, происходящих в суставном хряще, является важнейшим шагом на пути к формированию новых методик профилактики, диагностики и лечения этого заболевания. В настоящей работе рассматривается процесс ремоделирования суставного хряща с позиций ТАС, выявляются признаки активной системы и ее основных функциональных состояний на основе структурного анализа его тканей по гистологическим изображениям.

1. Введение

Остеоартроз является важнейшей медико-социальной проблемой. В работе [1] приводятся данные о том, что в течение года в среднем выявляется 100 случаев заболевания на каждые 100 000 населения (статистика приводится по лечебным учреждениям США). Согласно работе [2], каждый десятый человек в возрасте старше 55 лет страдает остеоартрозом коленного сустава, и каждый четвертый из них становится инвалидом. Именно поэтому профилактика, своевременная диагностика и лечение остеоартроза является одним из приоритетных направлений в здравоохранении.

Понимание и моделирование процессов, происходящих в суставном хряще, является важнейшим шагом на пути к формированию новых методик профилактики, диагностики и лечения этого заболевания, для чего применяются различные подходы. В литературе можно встретить различные модели хряща как молекулярно-биологической системы. Так, например, в работе [3] представлена математическая модель системы «хондроциты – (про/анти) воспалительные цитокины», адекватно описывающая реакцию клеток суставного хряща на некоторые сигнальные молекулы. Другой сравнительно часто используемый подход можно встретить, к примеру, в работе [4], где предлагается трехмерная диффузионная модель разрушения элементов опорно-двигательного аппарата и, в частности, суставного хряща. Здесь последний рассматривается с точки зрения механики.

В настоящей работе предпринята попытка рассмотреть процессы ремоделирования хряща с позиции теории активных систем и выявить информативные показатели, характеризующие состояние этой системы, при количественном морфологическом анализе.

2. Построение модели суставного хряща

Существует мнение, что суставной хрящ, будучи биологическим объектом, является системой с детерминированными реакциями на управляющие воздействия. Следовательно, задача моделирования такой системы должна сводиться к поиску зависимости, отражающей законы ее функционирования. Однако, при современном уровне понимания происходящих внутри рассматриваемого органа процессов, эта задача является неразрешимой вследствие многообразия влияющих на его развитие факторов. Так, только генов, непосредственно влияющих на развитие остеоартроза, насчитывается более ста, что, в частности, исключает возможность представления суставного хряща в виде черного ящика и построения зависимости на основе экспериментальных данных – число возможных индикаторов состояния системы огромно, а значения наиболее информативных из них невозможно получить неинвазивно.

В связи с этим авторы предлагают представить модель суставного хряща в виде активной системы. Характер реакции управляемых субъектов-клеток на управляющие воздействия уже неплохо изучен, а степень выраженности реакции, которую как раз сложно спрогнозировать, при таком подходе не столь важна.

Далее рассмотрим суставной хрящ и протекающие в нем процессы с целью определения состава, структуры активной системы, допустимого множества ее состояний, а также некоторые показатели, потенциально пригодные для понимания порядка функционирования этой системы.

2.1. Процессы, происходящие в суставном хряще

Суставной хрящ – удивительно сложный биокomпозитный материал, который обладает высокими показателями жесткости, сжатия, прочности, устойчивости и амортизации. Внеклеточный матрикс хряща содержит около 60% коллагена и 25% протеогликанов. Еще 15% составляет широчайший спектр матричных протеинов. Архитектурная сеть коллагена обеспечивает механическую структуру хряща.

Физиологическое регулирование и биологическую целостность биомолекул хрящевой ткани поддерживают хондроциты, хотя их число и плотность невелика. Благодаря своему расположению на поверхности сустава, суставной хрящ испытывает широкий спектр сил, которые включают сдвиг, сжатие и растяжение. Эти механические нагрузки распределяются по всей матрице хряща и поглощаются биомолекулами хряща. На наноуровне, механическое раздражение рассеивается и передается в хондроциты, которые затем преобразуют эти механические сигналы в биохимические сигнальные молекулы, запускающие в свою очередь анаболические и катаболические пути. Таким образом, активными элементами системы следует признать именно хондроциты.

Остеоартроз является хроническим воспалительным заболеванием сустава, при котором провоцирующие факторы (факторы распада) приводят к однотипным структурным изменениям. Клетки тканей суставного хряща имеют независимые возможности для инициирования и поддержания ответа на повреждение, приводящее к разрушению хряща. Весь период течения остеоартроза характеризуется двумя последовательными фазами:

- 1) Стадия, когда хондроцит пытается восстановить поврежденный внеклеточный матрикс.
- 2) Стадия, когда матрикс разрушается ферментами, продуцируемыми хондроцитами, ингибируется синтез матрикса и, в конечном итоге, возникает эрозия хряща.

Изложенные выше соображения позволяют построить множество допустимых состояний системы $A = \{a_h, a_r, a_d\}$, где a_h обозначает равновесное состояние, характерное для здорового хряща, a_r – состояние ремоделирования хрящевой ткани с преобладанием процессов синтеза, a_d – состояние постепенной деградации.

Существует строгая регуляция скорости обновления матрикса – тонкий баланс между синтезом и разрушением. При остеоартрозе этот баланс нарушается в сторону кatabолических процессов. В нормальных и патологических условиях, гомеостаз матрикса суставного хряща зависит от аутокринных и паракринных регуляторных механизмов. Эти механизмы регулируют анаболические и кatabолические пути контроля количества хондроцитов и внеклеточного матрикса.

Хондроциты производят структурные молекулы суставного хряща, такие как коллаген и протеогликаны, которые помогают формировать ткань хряща. Одновременно клетки вырабатывают различные металлопротеиназы, которые регулируют состав ткани хряща. На молекулярном уровне регулирование основано на факторах роста, таких как трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), и остеогенный белок-1 (OP-1), которые стимулируют хондроциты к синтезу структурных макромолекул (анаболические пути), в то время как цитокины – интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α) стимулируют секрецию хондроцитами протеиназ и вызывают деградацию внеклеточного матрикса (кatabолические пути).

Весь процесс можно разделить на два этапа. На первом этапе в результате триггерных воздействий на суставной хрящ, происходит активация Т-лимфоцитов и синовиальных макрофагов, которые используя рецептор IL1R1 на хондроцитах, посредством выделения IL-1 β активируют на втором этапе факторы транскрипции NF- κ B и AP-1 соответствующих генов.

На молекулярно-генетическом уровне это можно представить как результат экспрессии и супрессии отдельных генов внутри их ограниченного множества, элементы которого отвечают за клеточный цикл, метаболизм и межклеточную сигнализацию в хрящевой ткани. Таким образом, во множество управляющих воздействий U целесообразно включить некоторый набор воздействий $u_1^+, u_2^+, u_3^+, \dots$, стимулирующих хондроцит к синтезу и секреции факторов роста (TGF- β , IGF-1, OP1, механические нагрузки [7]), а также набор $u_1^-, u_2^-, u_3^-, \dots$ – воздействий, вызывающих деградацию матрикса (воздействие на хондроциты с помощью цитокинов IL-1, IL-6, TNF- α и пр.).

Далее следует построить функционал $\Phi(\eta, y)$, где $\eta \in U, y \in A$, что предполагает наличие возможности оценить эффективность управления. С точки зрения физиологии идеальным индикатором будут являться сигналы механорецепторов сустава, передающиеся в мозг. Если шаблон сигнала не совпадает с заданным, то организм ощущает боль – это является клиническим признаком остеоартроза. К сожалению, именно эти индикаторы использовать невозможно из-за отсутствия методик неинвазивной диагностики рассматриваемого заболевания. Поэтому очень важно найти показатели, пригодные к применению в выстраиваемой модели.

2.2. Поиск информативных показателей

В клинической практике диагностика состояния суставного хряща проводится методом экспертных оценок на основе результатов гистологического исследования, что

не позволяет получить какие-либо численные значения. Поэтому авторы предлагают следующий подход.

Среди исходных данных, позволяющих судить о состоянии ремоделирования конкретного хряща, весьма перспективными представляются показатели плотности внеклеточного матрикса в различных его участках. Значение плотности в той или иной области хряща можно определить после окрашивания препарата (срез суставного хряща толщиной 5-7 мкм) с применением красителей, в достаточной мере специфично окрашивающих экстрацеллюлярный матрикс пропорционально плотности в нем ключевых структурных полимеров (гликозаминогликанов). В качестве такого красителя в работе был использован толуидиновый синий. В таком случае яркость в каждой выбранной точке оцифрованного изображения будет обратно пропорциональна реальной плотности хрящевого матрикса в соответствующем участке хряща. Для устранения флуктуаций, вызванных естественной неоднородностью распределения матрикса, не влияющей на свойства его как системы, значения яркости определяли в прямоугольных областях изображения, соответствующих размеру 50×80 мкм на препарате.

Графики одномерного распределения плотности $D(\tau)$ внеклеточного матрикса в срезе здорового (сплошная линия) и больного (пунктирная линия) хряща изображен на рис. 1.

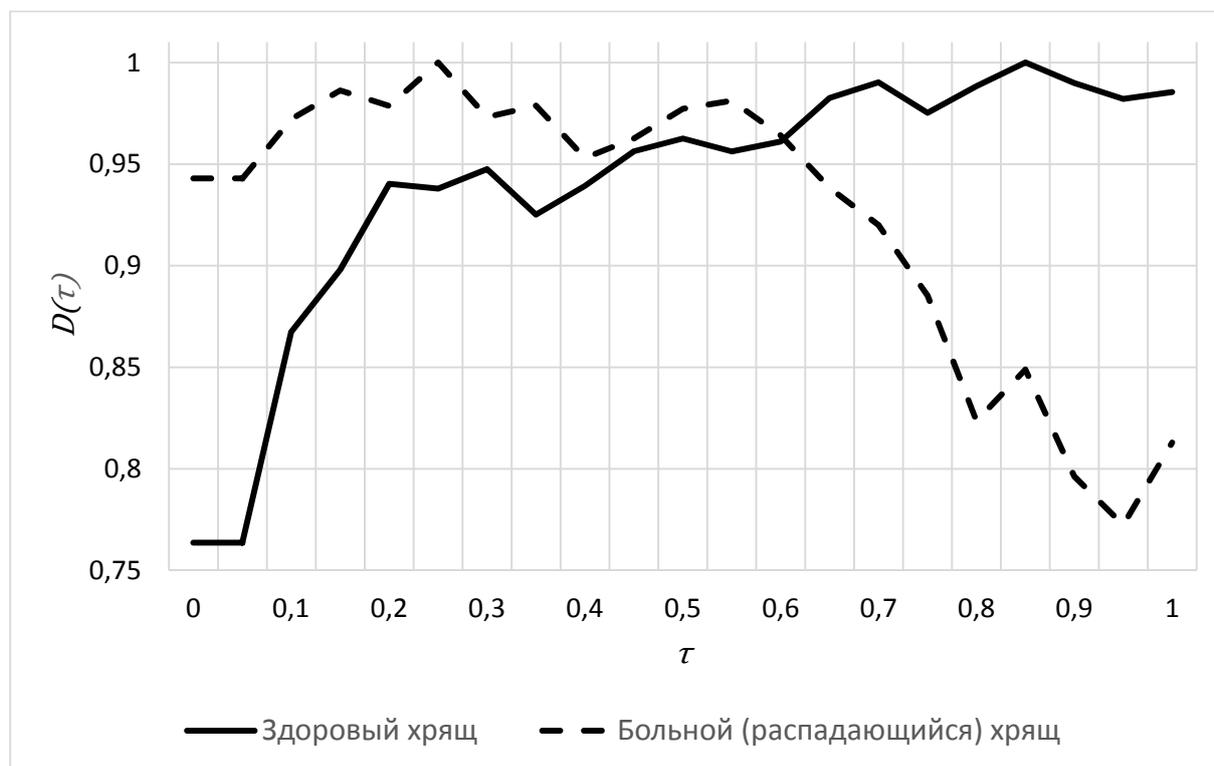


Рис. 1. Характерное распределение плотности внеклеточного матрикса суставного хряща.

На оси абсцисс расположены значения параметра $\tau \in [0,1]$, задающего относительное расположение данной точки относительно костного мозга ($\tau = 0$) и синовиальной жидкости ($\tau = 1$). По оси ординат откладывается значение плотности в данной точке.

На графике видно, что здоровый хрящ имеет постоянную и довольно высокую плотность внеклеточного матрикса по всей своей толщине. Несколько сниженное значение этого показателя в левой части графика объясняется большим количеством хонд-

роцитов в области хряща, прилегающей к субхондральным структурам. Деградирующий же хрящ, вследствие сокращенного времени жизни хондроцитов и под действием механических нагрузок истончается; в области хряща, примыкающей к синовиальной жидкости, наблюдается его эрозия и снижение плотности внеклеточного матрикса.

Представленные графики отражают распределение плотности у хряща полностью здорового и у органа с ярко выраженной патологией. На самом же деле задача дифференциации хрящей на основании тех или иных признаков является отдельной проблемой. Авторами были обработаны фотоснимки микроскопических препаратов, полученных из хрящей шести различных собак, общим количеством 30 шт. По каждому препарату было получено заключение эксперта о состоянии изображенного на нем органа. Далее с помощью специализированного программного обеспечения были произведены замеры оптической плотности в различных областях препарата, в результате чего были получены данные 74 различных распределений плотности.

Для полученных наборов были вычислены значения восьми различных показателей (таблица 1).

Таблица 1. Рассмотренные показатели, характеризующие процессы в суставном хряще.

Наименование показателя	Расчетная формула	Отражаемый процесс или явление (предположительно)
Среднее значение плотности матрикса	$\bar{D} = \sum_1^{20} D\left(\frac{i\tau}{20}\right) / 20$	Текущий баланс между синтезом и распадом матрикса хряща
Объем матрикса	$\int_0^1 D(\tau) d\tau$	Величины преобладающих нагрузок на хрящ
Дисперсия измеренных значений плотности	$\frac{1}{20} \sum_1^{20} (D(\tau) - \bar{D})^2$	Изменения скоростей синтеза и распада матрикса во времени
Максимальное отклонение от 1	$\max_{\tau} (1 - D(\tau))$	Максимальная интенсивность распада матрикса
Положение точки максимума	$\tau_{\max} = \max \tau : D(\tau) = 1$	Баланс между синтезом и распадом матрикса хряща во времени
Положение точки начала падения плотности	$\tau_f : \forall \tau > \tau_f D(\tau) < D(\tau_f)$	Место равновесия диффузионных потоков из субхондральных структур и синовиальной жидкости
Положение точки равенства объемов матрикса	$\tau_0 : \int_0^{\tau_0} D(\tau) d\tau = \int_{\tau_0}^1 D(\tau) d\tau$	Динамическое равновесие процессов синтеза и распада матрикса
Разность координат точек начала падения плотности и равенства объемов	$\tau_f - \tau_0$	Ускорение или замедление ремоделирования матрикса во времени

В дальнейшем, используя эти показатели планируется произвести поиск высокоинформативных признаков, позволяющих дифференцировать препарат и отнести его к одной из групп, являющихся элементами множества A . При этом высокоинформативные признаки стоит искать на основе показателей, значения которых для различных групп статистически различаются. Поэтому для препаратов каждой из трех выделенных групп были вычислены значения этих показателей, после чего полученные наборы значений были попарно протестированы на сходство/различие с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Результаты сведены в таблице 2.

Видно, что по большинству показателей выборки не слишком отличаются. Тем не менее, положение точки максимума плотности различались для здорового и регенери-

рующего хряща ($p = 0,1311$), а по положению точки равенства объемов матрикса – различия оказывались статистически достоверными ($p = 0,0194$). Это явилось лучшим результатом среди всех тестов.

Таблица 2. Вероятность совпадения выборок в группах хрящей, находящихся в различном состоянии ремоделирования, для различных индикаторных показателей.

Наименование показателя	p-значение критерия Вилкоксона для выборок, соответствующих группам хрящей, находящихся соответственно в состояниях		
	регенерации и гомеостаза	гомеостаза и деградации	регенерации и деградации
Среднее значение плотности матрикса	0,6265	0,3778	0,6265
Объем матрикса	0,7843	0,5430	0,8314
Дисперсия измеренных значений плотности	0,7843	0,5034	0,2478
Максимальное отклонение от 1	0,8552	0,6926	0,5430
Положение точки максимума	0,1311	0,2736	0,5090
Положение точки начала падения плотности	0,7578	0,8484	0,4042
Положение точки равенства объемов матрикса	0,0194	0,2871	0,4202
Разность координат точек начала падения плотности и равенства объемов	0,9394	0,5430	0,6926

Положение точки максимума ($p = 0,2736$) наряду с положением точки равенства объемов матрикса ($p = 0,2871$) позволяет различить деградирующий и здоровый хрящ, а значения показателя дисперсии измеренных значений плотности ($p = 0,24777$) заметно отличаются для регенерирующего и распадающегося хряща.

Приведенные выше результаты свидетельствуют о возможности выделения отдельных состояний регенерации (стационарное обновление хрящевого матрикса, преобладание синтеза и прирост матрикса, преобладание распада и убыль матрикса) при помощи анализа пространственного распределения ряда количественных морфологических показателей в ткани хряща.

3. Заключение

В данной работе представлен первый шаг на пути к построению модели суставного хряща. Основным препятствием к её завершению является нерешённая задача дифференцировки препаратов хряща по признакам, основанным на количественных морфометрических показателях. Тем не менее, у авторов имеются основания полагать, что эту задачу удастся решить, выявляя новые, более информативные показатели ремоделирования хрящевой ткани – пока исследована лишь малая их часть.

Безусловно, поиск таких показателей как результата деятельности активной системы по поддержанию адекватных свойств суставного хряща необходимо вести в дизайне молекулярных, молекулярно-генетических исследований и метаболомики. Именно эти маркеры могут привести к созданию протоколов исследования, информативных в плане не только текущего состояния, но и прогноза ремоделирования суставного хряща.

Список литературы

1. Litwic A., Edwards M. H., Dennison E. M., Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis // *Br. Med. Bull.* 2013, No. 105. P. 185-199.
2. Ли́ла А. М. Остеоартроз коленных суставов: лечение с позиций доказательной медицины // *Новые Санкт-Петербургские врачебные ведомости.* 2006. № 1 (35). С. 38-44.
3. Graham J.M., Ayati B.P., Ding L., Ramakrishnan P.S., Martin J.A. Reaction-diffusion-delay model for EPO/TNF- α interaction in articular cartilage lesion abatement // *Biol. Direct.* 2012. Vol. 7, No. 9. P. 7-9.
4. Чигарев А.В., Борисов А.В. Диффузионная модель разрушения элементов опорно-двигательного аппарата человека // *Российский журнал биомеханики.* 2012. Т. 16, № 1 (55). С. 22-37.
5. Новиков Д.А., Петраков С.Н. Курс теории активных систем. М.: СИНТЕГ, 1999. 108 с.
6. Маланин Д. А., Писарев В. Б., Новочадов В. В. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе: экспериментальные и клинические аспекты. Волгоград: Волгоградское научное издательство, 2010. 454 с.
7. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. М.: Медицина, 2002. 240 с.
8. Hubmacher D., Apte S. S. The biology of the extracellular matrix: novel in-sights // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2013. Vol. 25, No. 1. P. 65-70.
9. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Ed. by Y. H. An and K. L. Martin. New York: Humana Press, 2003. 587 p.
10. Goldring M. B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis // *Ther. Adv. Musculoskelet Dis.* 2012. No. 4 (4). P. 269-285.
11. Meszaros E., Malesud C. J. Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity // *Ther. Adv. Chronic Dis.* 2012. No. 3. P. 219-229.
12. Wang Y., de Li L., Zhang X. B., et al. Increase of TNF- α -stimulated osteoarthritic chondrocytes apoptosis and decrease of matrix metalloproteinases-9 by NF- κ B inhibition // *Biomed. Environ. Sci.* 2013. No. 26. P. 277-283.