

**ПАТОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, ФАРМАКОЛОГИЯ И
ТОКСИКОЛОГИЯ/ANIMAL PATHOLOGY, MORPHOLOGY, PHYSIOLOGY, PHARMACOLOGY AND
TOXICOLOGY**

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.61.9>

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНЕЙ ПЕЧЕНИ ДАНИО (*DANIO RERIO*),
ЯПОНСКОЙ МЕДАКИ (*ORYZIAS LATIPES*) И НОТОБРАНХИУСА ГЮНТЕРА (*NOTHOBRANCHIUS
GUENTHERI*) МЕТОДАМИ ГИСТОМОРФОМЕТРИИ И ГРАФОВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Научная статья

Кочетков Н.И.^{1,*}, Кудрявцев А.А.², Гаффарова В.М.³, Климова А.П.⁴, Никифоров-Никишин Д.Л.⁵

¹ ORCID : 0000-0002-2196-5421;

⁵ ORCID : 0000-0002-1715-057X;

^{1, 3, 4, 5} Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (ПКУ), Москва,
Российская Федерация

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Российская Федерация

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (samatrixs[at]gmail.com)

Аннотация

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ гистоархитектоники печени трех лабораторных видов рыб: данио, японской медаки и нотобранхиуса Гюнтера, являющихся широко используемыми модельными объектами. Для этого был применен комплексный подход, сочетающий классическую гистоморфометрию и графовое моделирование для количественной оценки пространственной организации гепатоцитов. Гистоморфометрический анализ выявил значительные видовые различия в размере и форме ядер гепатоцитов, при этом у нотобранхиуса наблюдались наибольшие значения площади (17,59 мкм²), периметра (17,03 мкм) и диаметра Фере (6,02 мкм). Графовый анализ, основанный на триангуляции Делоне и методе k-ближайших соседей, показал, что ткань печени данио характеризуется разреженной организацией гепатоцитов в виде небольших, удаленных друг от друга кластеров. В отличие от этого, у медаки и нотобранхиуса гепатоциты формировали более плотные и связанные клеточные кластеры. Анализ главных компонент (PCA) успешно разделил три вида на отдельные кластеры, подтвердив, что основной вклад в различия вносят морфометрия ядер и топологические метрики сети (расстояние до соседей, модулярность). Результаты демонстрируют, что интеграция графового моделирования с гистоморфометрией предоставляет мощный инструмент для детальной и количественной характеристики видоспецифических особенностей тканевой архитектуры рыб.

Ключевые слова: цитоархитектоника, топология ткани, анализ изображений, гепатоциты, анализ главных компонент, триангуляция делоне, модельные организмы.

**COMPARATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF LIVER TISSUE OF DANIO (*DANIO RERIO*), JAPANESE
MEDAKA (*ORYZIAS LATIPES*) AND GUNTHER'S NOTOBRANCH (*NOTHOBRANCHIUS GUENTHERI*) USING
HISTOMORPHOMETRY AND GRAPH MODELLING METHODS**

Research article

Kochetkov N.I.^{1,*}, Kudryavtsev A.A.², Gaffarova V.M.³, Klimova A.P.⁴, Nikiforov-Nikishin D.L.⁵

¹ ORCID : 0000-0002-2196-5421;

⁵ ORCID : 0000-0002-1715-057X;

^{1, 3, 4, 5} Moscow State University of Technologies and Management (FCU), Moscow, Russian Federation

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russian Federation

² Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

* Corresponding author (samatrixs[at]gmail.com)

Abstract

This research conducted a comparative analysis of the histoarchitecture of the liver of three laboratory fish species: danio, Japanese medaka, and Gunther's notobranch, which are widely used model organisms. A complex approach was used, combining classical histomorphometry and graph modelling for quantitative evaluation of the spatial organisation of hepatocytes. Histomorphometric analysis showed significant species differences in the size and shape of hepatocyte nuclei, with notobranch having the largest values for area (17.59 μm²), perimeter (17.03 μm), and feret diameter (6.02 μm). Graph analysis based on Delaunay triangulation and the K-Nearest Neighbours method showed that danio liver tissue is characterised by a sparse organisation of hepatocytes in the form of small, distant clusters. In contrast, in medaka and notobranch, hepatocytes formed denser and more connected cell clusters. Principal component analysis (PCA) successfully separated the three species into distinct clusters, confirming that the main difference lies in the morphometry of the nuclei and the topological metrics of the network (distance to neighbours, modularity). The results demonstrate that the integration of graph modelling with histomorphometry provides a powerful tool for detailed and quantitative characterisation of species-specific features of fish tissue architecture.

Keywords: cytoarchitectonics, tissue topology, image analysis, hepatocytes, principal component analysis, Delaunay triangulation, model organisms.

Введение

Гистологический анализ является ключевым методом для фенотипической характеристики организмов на тканевом и клеточном уровнях. Он широко применяется для оценки воздействия экзогенных факторов на организм, а также незаменим в сравнительно-анатомических исследованиях, направленных на выявление уникальных морфологических адаптаций, развивающихся в ходе филогенеза и онтогенеза. Внедрение цифровых технологий значительно повысило качество гистологического анализа, обеспечив извлечение беспрецедентного объема информации из гистологических образцов посредством комплексных методов анализа изображений [1], [2]. К настоящему времени разработан широкий спектр алгоритмов обработки гистологических изображений, позволяющих определять морфологические и колориметрические характеристики клеток и морфофункциональных единиц [3], [4]. Тем не менее многоуровневая сложность биологических образцов, обусловленная видовой и индивидуальной изменчивостью, а также особенностями гистологической проводки и окрашивания, создает существенные препятствия для их широкого внедрения в рутинную исследовательскую и диагностическую практику [5].

Печень рыб является ключевым метаболическим центром организма, ответственным за обмен белков, углеводов и липидов, регуляцию гомеостаза, а также за детоксикационную функцию [6]. По этим причинам морфологическое и функциональное состояние печени широко используется в качестве биомаркеров при оценке физиологического статуса организма и изучении безопасности фармакологических субстанций [7]. Для высших позвоночных существует значительное разнообразие подходов с применением методов цифровой патологии, позволяющих оценивать как общее состояние ткани, так и пространственные и текстурные характеристики изображения [8], [9]. Особый интерес представляет применение теории графов для описания состояния тканей печени, поскольку оно позволяет устанавливать взаимосвязи между структурой и функцией тканей на гистологических срезах, а также более полно классифицировать фенотипы клеток [4], [10], [11]. Кроме того, использование графов для извлечения признаков из гистологических изображений способствует созданию более продвинутых алгоритмов глубокого обучения [2].

Модельные организмы являются фундаментальным инструментом для получения биологических данных в различных областях, позволяя экстраполировать результаты на иные системы [12]. Благодаря быстрому развитию, высокой плодовитости и простоте содержания некоторые виды рыб служат важными модельными организмами. К наиболее распространенным из них относятся данио рерио (*Danio rerio*) [13], японская медака (*Oryzias latipes*) [14], гуппи (*Poecilia reticulata*) [15], трёхиглая колюшка (*Gasterosteus aculeatus*) [16] и короткоживущие карпозубообразные (*Nothobranchius* spp.) [17], [18]. Данные виды широко применяются в общебиологических, токсикологических, экотоксикологических, и биомедицинских исследованиях.

Несмотря на широкое использование модельных рыб в качестве мощного инструмента в биологических исследованиях, существует риск упрощенной экстраполяции данных, полученных на данных организмах. Распространенная парадигма восприятия рыб как «водных аналогов» грызунов не в полной мере учитывает их уникальную биологию, включая особенности гистоархитектоники тканей, экотермную природу и специфичность метаболизма [12], [19]. Эти различия накладывают существенные ограничения на прямое использование алгоритмов сегментации и извлечение признаков, валидированных на гистологических препаратах млекопитающих. Таким образом, для получения объективных и воспроизводимых результатов требуется создание специализированных подходов к анализу изображений, учитывающих специфику гистологии рыб.

Целью исследования является сравнительный анализ гистоархитектоники печени трех модельных видов рыб: данио (*Danio rerio*), японской медаки (*Oryzias latipes*) и нотобранхиуса Гюнтера (*Nothobranchius guentheri*) с использованием гистоморфометрии и графового моделирования с целью установления видовых особенностей организации ткани.

Методы и принципы исследования

В исследовании были задействованы самцы данио (*Danio rerio* WT, $2,2 \pm 0,2$ см, $0,30 \pm 0,04$ г), японской медаки (*Oryzias latipes* HNI, $2,3 \pm 0,1$ см, $0,27 \pm 0,03$ г) и нотобранхиуса Гюнтера (*Nothobranchius guentheri* Zanzibar TAN 14-02, $3,3 \pm 0,4$ см, $0,73 \pm 0,05$ г) в возрасте 4–5 месяцев. Выбор самцов обусловлен половыми различиями в метаболизме этих видов рыб, оказывающими существенное влияние на гистологическую структуру печени [20].

Данио и медака содержались в 300-литровых аквариумах (200 особей/аквариум) с системами механической и биологической фильтрации и ежедневной 10% заменой воды ($22,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$, pH $7,3 \pm 0,2$). Кормление осуществлялось коммерческим кормом Tetra Min Flakes XL. Особи нотобранхиуса содержались группами (20–25 особей обоего пола) в 50-литровых аквариумах ($21,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, pH $7,4 \pm 0,1$) с постоянной аэрацией и регулярной заменой воды: частичной (каждые 2 дня) и полной (каждые 7 дней). Рыб кормили живым кормом (*Daphnia magna*, личинки *Chironomidae*, *Artemia salina*). Содержание и уход за всеми видами рыб осуществлялись в соответствии с опубликованными рекомендациями [14], [17], [21], [22].

Для получения гистологических срезов рыб отбирались по 12 особей каждого вида, из которых изготавливалось по 3 среза ($n = 12 \times 3$). Рыба седатировалась в растворе MS-222 (10 мг/л), фиксировали 24 ч в растворе Дэвидсона, затем переносили в 70% этанол до дальнейшей обработки. Образцы ткани проводились через ряд последовательно возрастающих концентраций спирта — этанол (1 час, 80% — 1 час, 95% — 1 час и 99% — два раза по 1 часу) (Citadel 2000, Thermo FS, США). После этого образцы просветляли в ксилоле в течение 1,5 часов и выполняли заливку в парафин. Из образцов изготавливали по три микротомных серийных среза (Minux S700A, RWD Life Science, Китай) толщиной 4 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином (H&E) (Biovitrum, Россия). Подготовка и окрашивание гистологических срезов соответствовали общепринятой методике [23]. Полученные препараты просматривали под световым микроскопом Olympus BX53 (Olympus Corp., Япония) с окулярными насадками CarlZeiss ERc 5s (Zeiss, Германия) и ToupCam 16.0 MP (ToupTek Photonics, Китай) и использованием программного обеспечения ZEN lite (Zeiss, Германия) и ToupCam view 16.0 (ToupTek Photonics, Китай). Adobe Photoshop 2024 (Adobe Systems, США) использовался для настройки таких параметров изображений, как яркость, контрастность и баланс освещенности.

После предварительного гистологического скрининга, для дальнейшего исследования были отобраны наиболее качественные гистологические срезы печени рыб. С каждого среза было получено не менее 15 микрофотографий различных участков тканей печени при увеличениях объектива $\times 10$ и $\times 40$.

При получении изображений использовались стандартизированные настройки освещения и конденсора, оптимизированные для достижения максимальной контрастности. Изображения в формате .tiff были нормализованы с использованием программы Fiji ImageJ2 v2.15.0 [24] посредством алгоритма «Выравнивание среднего фона по каналам» и пользовательского скрипта. Общая схема обработки гистологических изображений приведена на рисунке 1.

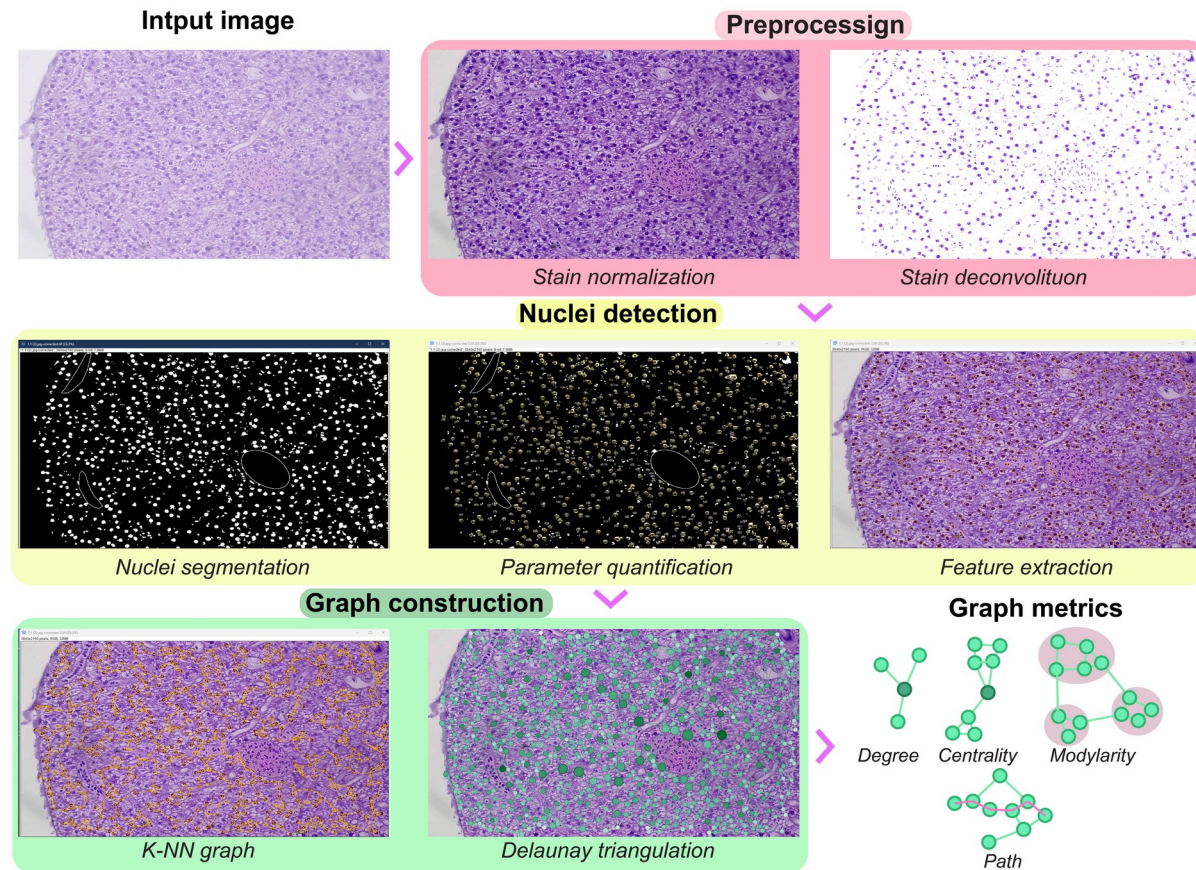


Рисунок 1 - Схема количественного анализа тканевой архитектуры на основе комбинированного морфометрического и топологического подходов с использованием графового моделирования на примере печени дани
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.61.9.1>

Цветовая деконволюция для разделения компонентов гематоксилина и эозина на изображениях печени данио выполнялась с использованием алгоритма, описанного Масенко et al. [25], в программе QuPath v0.6 [26]. Для изображений печени медаки и нотобранхиуса деконволюция выполнялась с применением классификации пикселей в QuPath, обученной на основе аннотированных областей ядер и стромы органа.

Идентификация отдельных ядер гепатоцитов выполнялась с использованием полуавтоматического алгоритма сегментации в программе Fiji ImageJ2. Сначала деконволюированные цветные изображения (канал гематоксилина для ядер) были преобразованы в 8-битный формат оттенков серого. Для снижения уровня шума применялось размытие по Гауссу с радиусом 2,0 пикселей. При дальнейшем анализе на изображениях не учитывались крупные сосуды и желчные протоки. Затем ядра на изображении сегментировались с помощью функции «Analyze Particles» после применения автоматической пороговой обработки. Для каждого сегментированного ядра фиксировались координаты его центроида (X, Y). Помимо пространственных координат, для каждого ядра был рассчитан набор морфометрических параметров, включая: площадь, периметр, большую и малую оси вписанного эллипса, диаметр и угол Фере, округлость, циркулярность и плотность. Данные параметры использовались для характеристики морфологии клеток. С целью минимизации влияния крайних значений (выбросов) из дальнейшего анализа были исключены данные, находящиеся ниже 5-го и выше 95-го персентилей. Для оценки эффективности сегментации на наборе из 36 изображений ($n = 6 \times 6$) был выполнен ручной подсчет ядер. Полученные данные впоследствии сопоставлялись с результатами, полученными алгоритмом.

Пространственная организация гепатоцитов была смоделирована как двумерный неориентированный граф, где центроиды ядер представляли вершины, а связи (рёбра) между вершинами устанавливались методами триангуляции Делоне и k -ближайших соседей ($k = 3$). Определение ближайших соседей и визуализация графа выполнялись на основе алгоритма, описанного Haeri & Haeri [27], с применением модифицированного скрипта Damon Roburko [28]. Граф k -ближайших соседей применялся для определения некрупных кластеров клеток и расчета гистоморфометрических подателей. Для данного типа сетей расчет метрики графа не производился.

Триангуляция Делоне была выбрана ввиду её способности идентифицировать «естественных соседей» в наборе точек на основе их пространственной близости, что позволяет эффективно моделировать цитоархитектуру ткани [29]. Построение графов выполнялось с использованием оригинального скрипта на языке Python с библиотекой SciPy [30]. Полученные данные графов для каждого изображения, включая координаты вершин и списки рёбер, сохранялись для последующего анализа.

Топологические свойства полученных графов были количественно охарактеризованы с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом Gephi 0.10.1 [31]. Для каждого графа был рассчитан комплекс сетевых метрик, характеризующих архитектуру ткани на локальном и глобальном уровнях:

(i) метрики уровня вершин: степень, центральность по посредничеству, коэффициент кластеризации;

(ii) метрики уровня графа: плотность графа, средняя длина пути, модулярность.

Данные сравнения анализируемых переменных представлены в виде средних $\pm$ SD. Статистическая достоверность определялась с использованием параметрических тестов (t -критерия Уэлча, дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Тьюки) при условии нормальности данных и однородности вариаций (тесты Шапиро-Уилка и Левена). Значение $p < 0,05$ было принято, как статистически достоверное. Для визуализации взаимосвязей между экспериментальными группами и измеренными переменными был проведен анализ главных компонент (PCA) с использованием языка программирования R и пакетов FactoMineR [32] и factoextra [33]. Статистическая обработка и визуализация данных производилась с использованием GraphPad Prism v 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) и в среде RStudio v 3.6.0 (RStudio, PBC, Boston, MA) с использованием языка программирования R v 4.4.3 [34].

Основные результаты

Печеночная ткань трех видов рыб состояла из гепатоцитов, организованных в анастомотические дольки, разделенные синусоидными капиллярами, содержащими небольшое количество эритроцитов. В ткани также присутствовали крупные кровеносные сосуды и желчные протоки (рис. 2а-с). Гепатоциты самцов данио демонстрировали признаки вакуолизации, проявляющиеся наличием в их цитоплазме амфифильных участков с неровными краями (рис. 2а). В отличие от этого, гепатоциты медаки и нотобранхиуса обладали плотной эозинофильной цитоплазмой и крупным ядром с четко выраженными ядерными границами и ядрышком (рис. 2б, с).

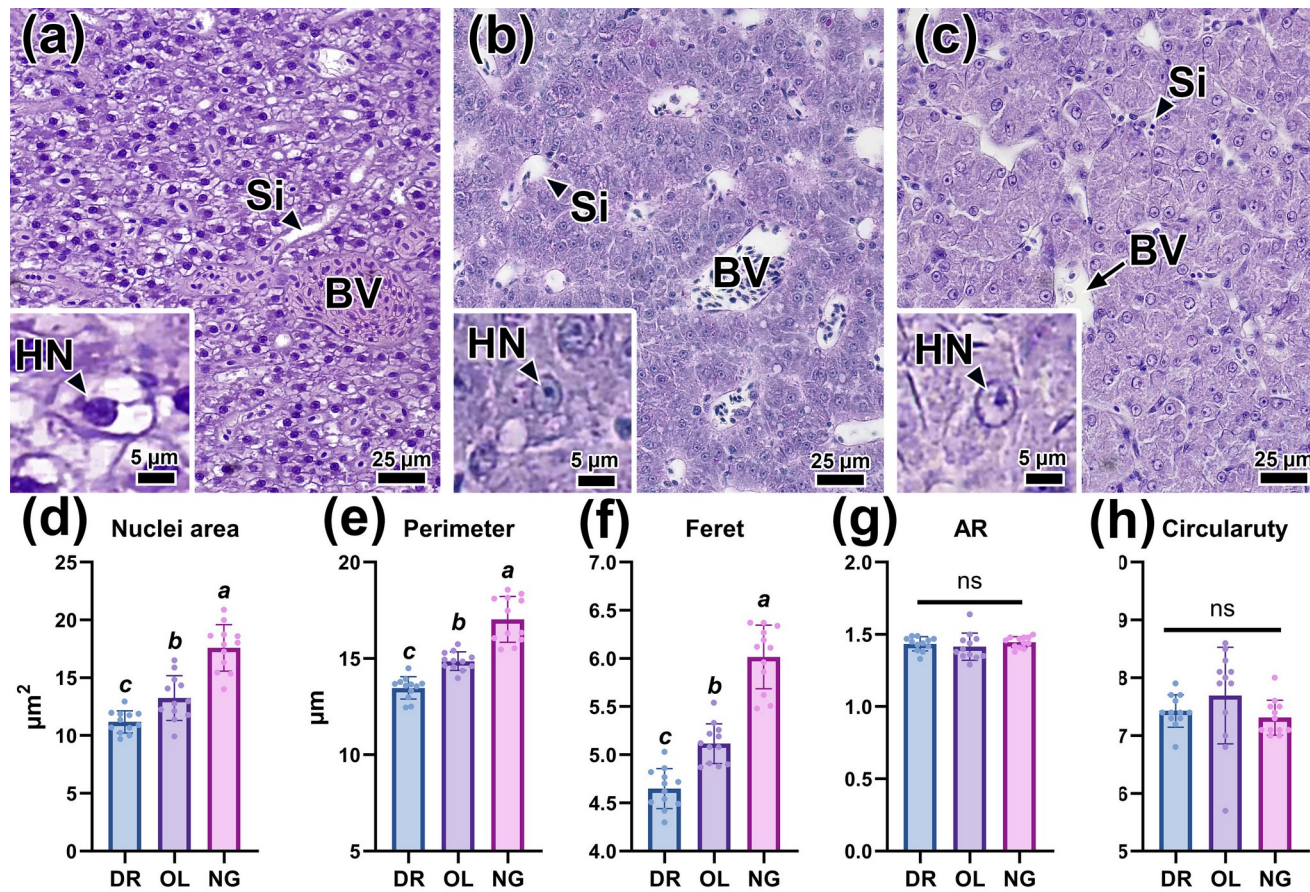


Рисунок 2 - Гистология печени данио (a), японской медаки (b) и нотобранхиуса Гюнтера (c), а также морфометрические показатели ядре гепатоцитов (d-h)

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.61.9.2>

Примечание: сокращения: Si – синусоидный капилляр, BV – кровеносный сосуд, HN – ядро гепатоцита. Окраска H&E, шкала масштаба 5 и 25 мкм. Надстрочные буквы (a, b, c) указывают на статистическую значимость ($p < 0,01, 0,05$) из дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Тьюки

Сегментация гистологических изображений и извлечение признаков (feature extraction) продемонстрировали высокую эффективность. Количество автоматически выделенных ядер гепатоцитов данио составило 98,5% от общего числа ядер, подсчитанных вручную. Для медаки и нотобранхиуса данный показатель находился на уровне 95,6% и 96,3%, соответственно.

Гистоморфометрический анализ ядер гепатоцитов выявил, что самцы нотобранхиуса демонстрировали достоверно наибольшие значения площади ($17,59 \text{ мкм}^2$), периметра ($17,03 \text{ мкм}$) и диаметра Фере ($6,02 \text{ мкм}$) ($p < 0,01$ на рис. 2d-f). Гепатоциты медаки, в свою очередь, по данным показателям достоверно отличались как от данио, так и от нотобранхиуса ($p < 0,05$). Аналогичные различия были также установлены для параметров большой и малой осей вписанного эллипса ядер гепатоцитов. Однако достоверных различий по показателям соотношения сторон (AR; $1,41-1,45$), округлости ($0,72-0,74$) и циркулярности ($0,73-0,77$) выявлено не было (рис. 2g, h). Показатель плотности (Solidity) также характеризовался относительно гетерогенностью для исследованных видов.

Анализ графа k-ближайших соседей ($k = 3$), построенного на основе извлеченных признаков ядер гепатоцитов, выявил существенные различия между исследуемыми видами. У данио гепатоциты были организованы в небольшие, преимущественно перисинусоидальные кластеры, значительно удаленные друг от друга (рис. 3a, b). Это соответствовало достоверно большему расстоянию ($p < 0,05$) до 3-го ближайшего соседа у данного вида (рис. 3i).

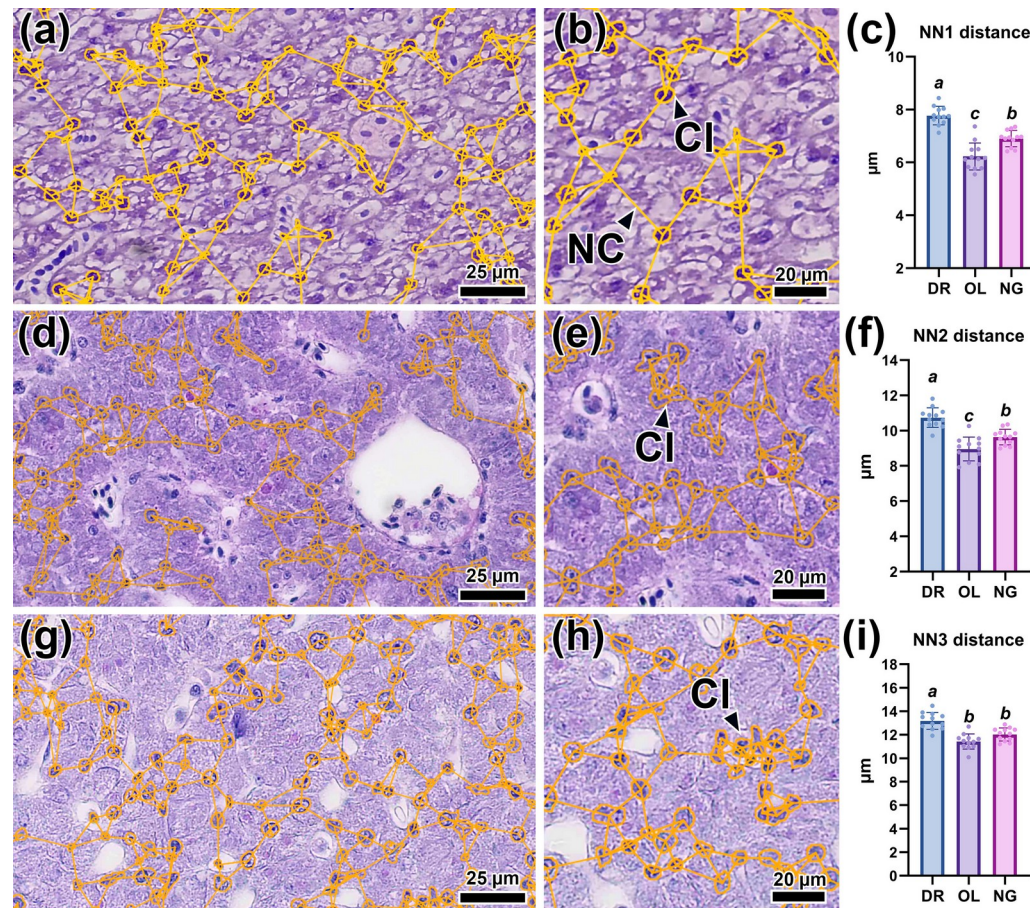


Рисунок 3 - Граф k-ближайших соседей ($k = 3$) для гепатоцитов печени данио (a, b), японской медаки (d, e) и нотобранхиуса Гюнтера (g, h), а также показатели расстояния до трех ближайших соседей (c, f, i)

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.61.9.3>

Примечание: сокращения: Cl – кластер, NC – связь соседства (Neighbourhood connection). Окраска H&E, шкала масштаба 5 и 25 мкм. Надстрочные буквы (a, b, c) указывают на статистическую значимость ($p < 0,01, 0,05$) из дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Тьюки

У медаки и нотобранхиуса гепатоциты были организованы в более плотные кластеры с меньшим межклеточным расстоянием (рис. 3е, h). В частности, гепатоциты медаки демонстрировали достоверно наименьшее расстояние до 1-го (6,23 мкм) и 2-го ближайшего соседа (8,96 мкм) по сравнению с двумя другими видами (рис. 3с, f). Примечательной особенностью являлось расположение наибольшего количества кластеров гепатоцитов вблизи крупных синусоидных капилляров и кровеносных сосудов (рис. 3d, g). Кроме того, вследствие меньшего межклеточного расстояния, граф k-ближайших соседей для медаки и нотобранхиуса характеризовался большей плотностью и связностью, демонстрируя меньшее количество изолированных кластеров по сравнению с данио.

Построение графов методом триангуляции Делоне подтвердило ранее выявленные топологические различия в печеночной ткани трех видов рыб. Было установлено, что гепатоциты с высокой степенью ($\text{degree} > 5$) и высокой центральностью по посредничеству ($\text{Betweenness Centrality} > 10000$) локализовались вблизи крупных кровеносных сосудов (рис. 4е, h). Эта особенность была наиболее выражена в печеночной ткани данио (рис. 4а, b). Такие узлы идентифицируются как «клетки-мосты», что подчеркивает их структурную значимость. При этом по показателю средней степени вершин пространственные графы данио демонстрировали значительно более низкие значения по сравнению с двумя другими видами (рис. 5а). Вершины, характеризующиеся низкой степенью и низкой центральностью по посредничеству, образовывали плотные скопления по периферии компактных клеточных кластеров, что в совокупности указывает на их ограниченную структурную значимость для сети.

Отличительной особенностью пространственной организации гепатоцитов медаки и нотобранхиуса являлось наличие узлов, характеризующихся низкой степенью, но высокой центральностью (рис. 4f, i). Эти узлы можно интерпретировать как локальные участки высокой клеточной плотности. Кроме того, сеть гепатоцитов печени медаки демонстрировала наибольшие значения средней длины пути, диаметра сети и модулярности (рис. 5d-f) по сравнению с данио ($p < 0,01$) и нотобранхиусом ($p < 0,05$). Печень нотобранхиуса также характеризовалась большей фрагментарностью сети и меньшим количеством хабов (рис. 4g). Однако средний коэффициент кластеризации (0,437–0,444) и плотность сети (0,009–0,011) не имели статистически значимых различий между исследуемыми видами (рис. 5е).

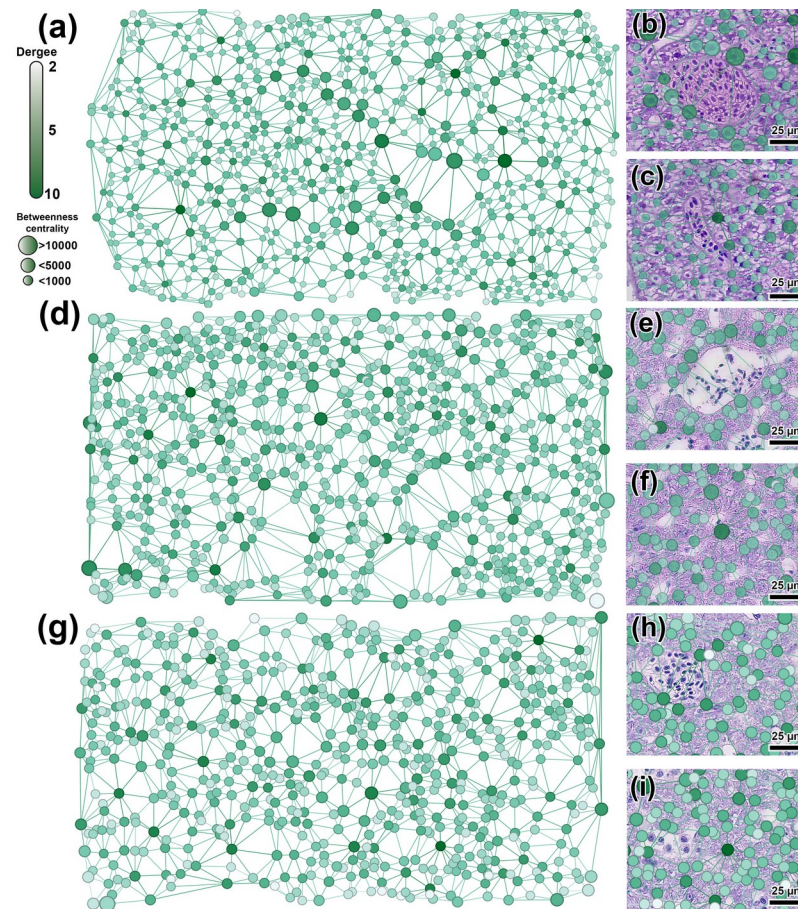


Рисунок 4 - Топологический анализ организации ядер гепатоцитов на основе пространственных графов и репрезентативные гистологические изображения с наложенными на них соответствующими сегментами графа данио (*a-c*), японской медаки (*d-f*) и нотобранхиуса Гюнтера (*g-i*)

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.61.9.4>

Примечание: примечание: цвет вершин графа отражает их степень (количество соседей), а размер пропорционален центральности по посредничеству. Окраска H&E, шкала масштаба 25 мкм

Для всех анализируемых графов было характерно наличие узлов с высокой центральностью, расположенных по краям изображений. Эта особенность обусловлена принципом работы триангуляции Делоне, которая приводит к формированию узлов с «краевым эффектом», поскольку они выступают в качестве ключевых звеньев для кратчайших путей, соединяющих противоположные стороны графа. Следовательно, хотя метрики центральности информативны для центральной части графа, значения для периферических вершин требуют осторожной интерпретации.

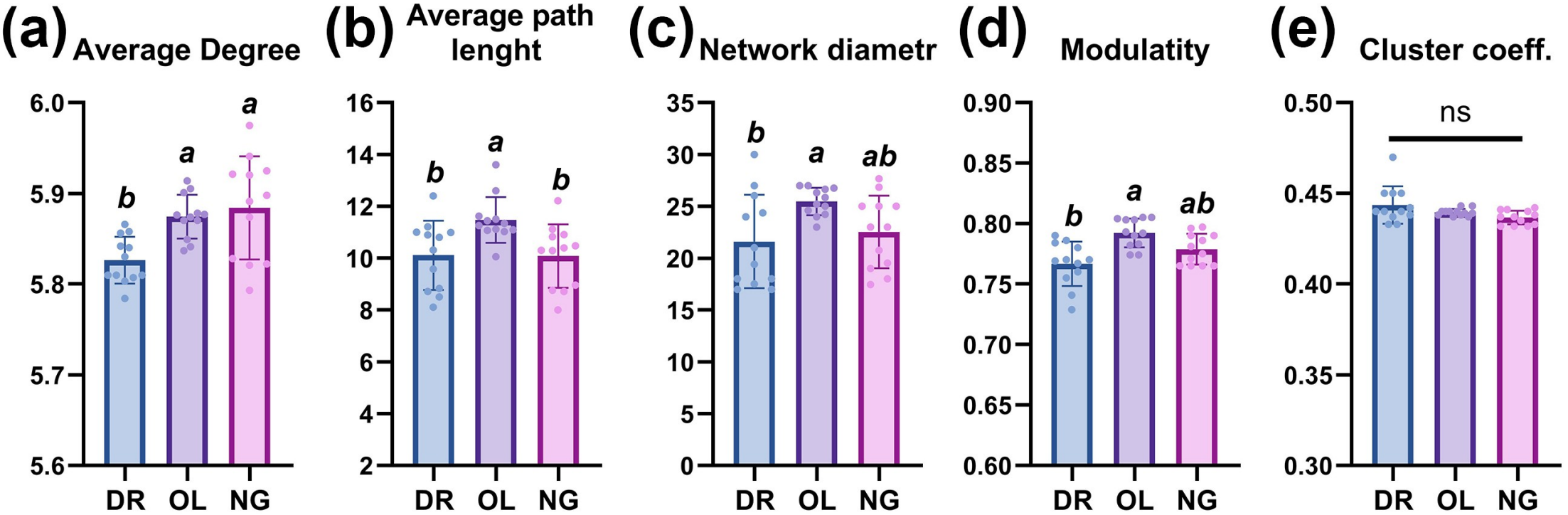


Рисунок 5 - Основные метрики графов ядер гепатоцитов трех видов рыб
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.61.9.5>

Примечание: надстрочные буквы (a, b, c) указывают на статистическую значимость ($p < 0,01, 0,05$) из дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Тьюки

Анализ главных компонент (РСА) гистоморфометрических данных и метрик графов ядер гепатоцитов трех видов рыб выявил, что две главные компоненты (PC1 = 34,5%, PC2 = 18,6%) советовали 53,1% общей дисперсии данных (рис. 5). Данные характеризовались четким разделением на три непересекающихся кластера, соответствующих исследуемым видам (рис. 5а).

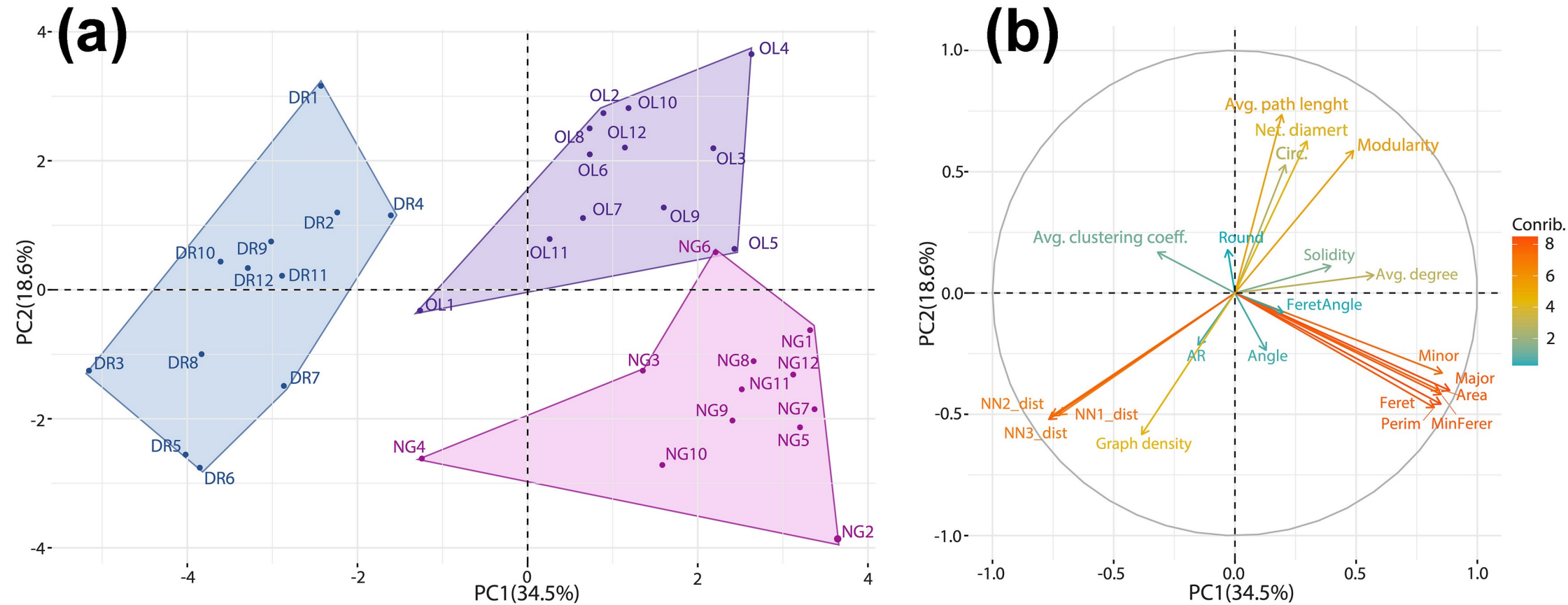


Рисунок 6 - Результаты анализа главных компонент (PCA) на основе гистоморфометрических и метрики графов ядер гепатоцитов трех видов рыб: Диаграмма счетов (scores plot) (a) и диаграмма нагрузок (loadings plot)
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.61.9.6>

Примечание: цвет и длина векторов отражают величину вклада (Contrib.) каждой переменной

Разделение группы данио (DR) вдоль отрицательной оси PC1 коррелировало с более высокими значениями среднего коэффициента кластеризации и расстояний до ближайших соседей (NN1-3 distance). Кластеры медаки (OL) и нотобранхиуса (NG), в свою очередь, разделялись вдоль оси PC2: группа NG характеризовалась более высокими значениями параметров размера и формы клеток (Area, Major, Feret), тогда как группа OL ассоциировалась с повышенными показателями модулярности и длины пути в сети (рис. 5b). Наибольший вклад в дисперсию данных среди исследуемых показателей внесли параметры размера и формы клеток, а также расстояния до ближайших соседей (contrib.> 6).

Обсуждение

Пищеварительная система рыб демонстрирует значительное морфологическое разнообразие, что является адаптацией к различным условиям среды и питания. Морфологические особенности тканей, выявленные в настоящем исследовании, согласуются с ранее опубликованными данными. В частности, выраженная вакуолизация гепатоцитов здоровых особей данио ранее описывалась [13], [35] и может быть обусловлена спецификой углеводного метаболизма и депонирования [20].

Более плотная структура гепатоцитов медаки и нотобранхиуса, вероятно, объясняется как видовыми особенностями метаболизма, так и лабораторными условиями питания. В частности, поскольку нотобранхиус неохотно потребляет искусственные корма, их рацион преимущественно состоит из живых кормов [17]. В свою очередь, больший размер гепатоцитов (по площади, периметру и другим морфометрическим показателям) у нотобранхиуса коррелирует с тем, что в возрасте 4 месяцев самцы этого вида достигают значительно больших размеров (2,9–3,2 см) по сравнению с данио и медакой (2,0–2,4 см), как это было показано ранее [36].

Представленный в настоящем исследовании метод сегментации и извлечения признаков гистологических изображений печени рыб доказал свою эффективность, обеспечив характеристику как гистоморфометрических особенностей, так и топологических различий трех модельных видов. Ранее описанные алгоритмы анализа гистологических изображений печени, разработанные для высших позвоночных [4], [37], неприменимы к тканям печени рыб из-за их специфических особенностей, выявленных в настоящей работе: выраженной вакуолизации, неравномерной окраски ядер, своеобразия организации сосудистой сети и вариативности морфометрических параметров.

Тем не менее предложенный алгоритм имеет ряд ограничений, которые следует учитывать при его применении:

- (i) необходимость нормализации окраски для эффективной деконволюции;
- (ii) требование ручного исключения областей, содержащих сосуды и желчные протоки;
- (iii) критичность использования достаточного числа биологических повторностей ($n > 6$) и тщательного анализа данных для обеспечения достоверности результатов. Эти ограничения подчеркивают необходимость развития более совершенных алгоритмов глубокого обучения для повышения эффективности сегментации и извлечения признаков. Дополнительно, выполнения построения графов на основе отдельных полей зрения гистологических препаратов, ограничивает полноту анализа и приводит к появлению артефактов (краевой эффект). В рамках дальнейших исследований планируется усовершенствовать алгоритм сегментации, а также выполнить графовое моделирование на основе полнослайдового сканирования гистологических препаратов рыб.

Традиционный анализ гистологических изображений включает визуальную оценку морфологических изменений, особенностей организации и топологии тканей, проводимую специалистами-гистологами [10]. Применение теории графов в гистологических исследованиях позволяет преобразовать качественные признаки в количественные характеристики, поддающиеся статистическому сравнению и анализу. В настоящем исследовании применение триангуляции Делоне и метода k-ближайших соседей для описания топологии печени трех модельных видов рыб позволило выявить как выраженные сходства (в частности, локализацию высокосвязанных гепатоцитов с высокой центральностью посредничества вблизи крупных кровеносных сосудов и синусоидов), так и видовые различия в организации ткани печени (например, степень разреженности и кластеризации гепатоцитов).

Выявленные различия, вероятно, обусловлены уникальной экологией каждого вида рыб. Данио (*Cypriniformes*) и медака (*Beloniformes*) — типичные всеядные виды, обитающие в мелководных прудах и медленно текущих реках [13], [14]. Печень этих рыб демонстрирует типичную шнуровидную организацию гепатоцито-синусоидальных структур [38], характеризующуюся высокой пластичностью и регенеративной способностью. Для медаки были установлены значительно более высокие показатели средней степени и длины пути, что может свидетельствовать о большей компактности органа.

Напротив, нотобранхиус (*Cyprinodontiformes*) обитает в пересыхающих водоемах и имеет преимущественно плотоядный тип питания [39]. Это отразилось на организации ткани печени, которая, относясь к шнуровидной форме, тем не менее характеризуется более высокой плотностью ткани (высокие значения средней степени) при относительно невысокой компактности (сравнимые с данио значения длины пути и диаметра сети). Эти особенности могут быть объяснены высокой функциональной нагрузкой на печень, обеспечивающей высокую скорость метаболизма, необходимую для успешного развития и размножения в экстремальных условиях [40].

Комплексный анализ полученных результатов показал, что наиболее вариативными признаками, отражающими межвидовые различия, являются как гистоморфометрические показатели ядер гепатоцитов (площадь, периметр и др.), так и топологические характеристики (модулярность, длина пути, расстояние между соседями). Ранее было многократно продемонстрировано, что использование морфометрии позволяет выявлять специфические различия, неочевидные при стандартном гистологическом анализе [41], [42], [43]. В данном контексте, совмещение классических

морфометрических методов исследования с методами графового моделирования обеспечивает получение более точных данных о тканевой архитектуре печени. Это может быть использовано как в сравнительно-анатомических исследованиях, так и для оценки воздействия экзогенных факторов на организм

Закключение

1. Гепатоциты самцов нотобранхиуса Гюнтера обладают достоверно наибольшими морфометрическими параметрами ядер, включая площадь (17,59 мкм²), периметр (17,03 мкм) и диаметр Фере (6,02 мкм), по сравнению с данио и медакой.

2. Пространственная организация гепатоцитов у данио характеризуется формированием небольших, преимущественно перисинусоидальных кластеров, значительно удаленных друг от друга, в то время как у медаки и нотобранхиуса гепатоциты организованы в более плотные и крупные кластеры с меньшим межклеточным расстоянием.

3. Граф гепатоцитов печени медаки демонстрирует наибольшие значения средней длины пути, диаметра сети и модулярности по сравнению с данио и нотобранхиусом, что указывает на более сложную и сегментированную топологическую структуру ткани.

4. Анализ главных компонент (РСА) позволил эффективно разделить три вида рыб на непересекающиеся кластеры, объяснив 53,1% общей дисперсии данных. Разделение было обусловлено вкладом параметров размера ядер (для нотобранхиуса), сетевых метрик (модулярность и длина пути для медаки) и показателей расстояний между клетками (для данио).

5. Сочетание гистоморфометрии с графовым моделированием является мощным инструментом для количественной оценки тканевой архитектуры, позволяя выявлять невыраженные видоспецифические различия в организации печени, которые не очевидны при стандартном гистологическом анализе.

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.

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 на английском языке / References in English

1. Bankhead P. Developing image analysis methods for digital pathology / P. Bankhead // The Journal of Pathology. — 2022. — Vol. 257, № 4. — P. 391–402. — DOI: 10.1002/path.5921.
2. Gurcan M.N. Histopathological image analysis: A review / M.N. Gurcan, L.E. Boucheron, A. Can [et al.] // IEEE Reviews in Biomedical Engineering. — 2009. — Vol. 2. — P. 147–171. — DOI: 10.1109/RBME.2009.2034865.
3. Acs B. An open source automated tumor infiltrating lymphocyte algorithm for prognosis in melanoma / B. Acs, F.S. Ahmed, S. Gupta [et al.] // Nature Communications. — 2019. — Vol. 10, № 1. — P. 5440. — DOI: 10.1038/s41467-019-13043-2.
4. Mahadevan S. cytoNet: Spatiotemporal network analysis of cell communities / S. Mahadevan, B.L. Long, C.W. Hu [et al.] // PLOS Computational Biology. — 2022. — Vol. 18, № 6. — Art. e1009846. — DOI: 10.1371/journal.pcbi.1010644.
5. Asif A. Unleashing the potential of AI for pathology: challenges and recommendations / A. Asif, K. Rajpoot, S. Graham [et al.] // The Journal of Pathology. — 2023. — Vol. 260, № 5. — P. 564–577. — DOI: 10.1002/path.6168.
6. Press C.M. The morphology of the immune system in teleost fishes / C.M. Press, O. Evensen // Fish & Shellfish Immunology. — 1999. — Vol. 9, № 4. — P. 309–318. — DOI: 10.1006/fsim.1998.0181.
7. Thapa B.R. Liver function tests and their interpretation / B.R. Thapa, A. Walia // The Indian Journal of Pediatrics. — 2007. — Vol. 74, № 7. — P. 663–671. — DOI: 10.1007/s12098-007-0118-8.
8. Hoefling H. HistoNet: a deep learning-based model of normal histology / H. Hoefling, T. Sing, I. Hossain [et al.] // Toxicologic Pathology. — 2021. — Vol. 49, № 4. — P. 784–797. — DOI: 10.1177/0192623321993425.
9. Hölscher D.L. Next-generation morphometry for pathomics-data mining in histopathology / D.L. Hölscher, N.J. Bouteldja, M. Joodaki [et al.] // Nature Communications. — 2023. — Vol. 14, № 1. — P. 470. — DOI: 10.1038/s41467-023-36173-0.
10. Sharma H. A review of graph-based methods for image analysis in digital histopathology / H. Sharma, N. Zerbe, S. Lohmann [et al.] // Diagnostic Pathology. — 2015. — Vol. 1, № 1. — DOI: 10.17629/www.diagnosticpathology.eu-2015-1:61.
11. Yener B. Cell-graphs: image-driven modeling of structure-function relationship / B. Yener // Communications of the ACM. — 2016. — Vol. 60, № 1. — P. 74–84. — DOI: 10.1145/2960404.
12. Shehwana H. Comparative transcriptomics between zebrafish and mammals: A roadmap for discovery of conserved and unique signaling pathways in physiology and disease / H. Shehwana, O. Konu // Frontiers in Cell and Developmental Biology. — 2019. — Vol. 7. — P. 5. — DOI: 10.3389/fcell.2019.00005.
13. de Souza Anselmo C. Zebrafish (Danio rerio): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? / C. de Souza Anselmo, V.F. Sardela, V.P. de Sousa, H.M.G. Pereira [et al.] // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. — 2018. — Vol. 212. — P. 34–46. — DOI: 10.1016/j.cbpc.2018.06.005.
14. Kinoshita M. Medaka: biology, management, and experimental protocols / M. Kinoshita, K. Murata, K. Naruse [et al.]. — John Wiley & Sons, 2009.

15. Boaru A. Poeciliidae fish as a model organism / A. Boaru, D. Struți, B. Georgescu // *Poeciliid Research*. — 2021. — Vol. 11, № 1. — P. 12–17.
16. Wootton R.J. The Darwinian stickleback *Gasterosteus aculeatus*: a history of evolutionary studies / R.J. Wootton // *Journal of Fish Biology*. — 2009. — Vol. 75, № 8. — P. 1919–1942. — DOI: 10.1111/j.1095-8649.2009.02412.x.
17. Naumann U. Comprehensive colony health management and emerging pathogens of the annual killifish *Nothobranchius furzeri* / U. Naumann, J.L. Brazzell, M.J. Crim [et al.] // *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. — 2024. — Vol. 63, № 1. — P. 20–33. — DOI: 10.30802/aalas-jaalas-23-000067.
18. Bulavkina E.V. Multifaceted *Nothobranchius* / E.V. Bulavkina, A.A. Kudryavtsev, M.A. Goncharova [et al.] // *Biochemistry*. — 2022. — Vol. 87, № 12. — P. 1563–1578. — DOI: 10.1134/s0006297922120136.
19. Ali S. Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens / S. Ali, D.L. Champagne, H.P. Spaik [et al.] // *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. — 2011. — Vol. 93, № 2. — P. 115–133. — DOI: 10.1002/bdrc.20206.
20. Wolf J.C. Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers / J.C. Wolf, W.A. Baumgartner, V.S. Blazer [et al.] // *Toxicologic Pathology*. — 2015. — Vol. 43, № 3. — P. 297–325. — DOI: 10.1177/0192623314540229.
21. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) / M. Westerfield. — 4th ed. — Eugene : Univ. of Oregon Press, 2000.
22. Nikiforov-Nikishin D.L. Evaluation of age-dependent changes in the coloration of male killifish *Nothobranchius guentheri* using new photoprocessing methods / D.L. Nikiforov-Nikishin, N.I. Kochetkov, E.V. Mikodina [et al.] // *Biology*. — 2022. — Vol. 11, № 2. — P. 205. — DOI: 10.3390/biology11020205.
23. Suvarna S.K. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book / S.K. Suvarna, C. Layton, J.D. Bancroft. — Amsterdam : Elsevier Health Sciences, 2018.
24. Schindelin J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.] // *Nature Methods*. — 2012. — Vol. 9, № 7. — P. 676–682. — DOI: 10.1038/nmeth.2019.
25. Macenko M. A method for normalizing histology slides for quantitative analysis / M. Macenko, M. Niethammer, J.S. Marron [et al.] // 2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro. — Boston, 2009. — P. 1107–1110. — DOI: 10.1109/ISBI.2009.5193250.
26. Bankhead P. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis / P. Bankhead, M.B. Loughrey, J.A. Fernández [et al.] // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7, № 1. — P. 1–7. — DOI: 10.1038/s41598-017-17204-5.
27. Haeri M. ImageJ plugin for analysis of porous scaffolds used in tissue engineering / M. Haeri, M. Haeri // *Journal of Open Research Software*. — 2015. — Vol. 3, № 1. — DOI: 10.5334/jors.bn.
28. Poburko D. ImageJ_macros / D. Poburko. — 2019. — URL: https://github.com/dpoburko/ImageJ_macros/blob/master/findNearestROIs_v2.ijm (accessed: 05.09.2025).
29. Grise G. Surface reconstruction using Delaunay triangulation for applications in life sciences / G. Grise, M. Meyer-Hermann // *Computer Physics Communications*. — 2011. — Vol. 182, № 4. — P. 967–977. — DOI: 10.1016/j.cpc.2010.12.037.
30. Virtanen P. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python / P. Virtanen, R. Gommers, T.E. Oliphant [et al.] // *Nature Methods*. — 2020. — Vol. 17, № 3. — P. 261–272. — DOI: 10.1038/s41592-019-0686-2.
31. Bastian M. Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks / M. Bastian, S. Heymann, M. Jacomy // *Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media*. — 2009. — Vol. 3, № 1. — P. 361–362. — DOI: 10.1609/icwsm.v3i1.13937.
32. Lê S. FactoMineR: an R package for multivariate analysis / S. Lê, J. Josse, F. Husson // *Journal of Statistical Software*. — 2008. — Vol. 25. — P. 1–18. — DOI: 10.18637/jss.v025.i01.
33. Kassambara A. Package 'factoextra': extract and visualize the results of multivariate data analyses / A. Kassambara, F. Mundt // *R Package Version*. — 2017. — Vol. 76, № 2. — P. 10–18637. — DOI: 10.32614/cran.package.factoextra.
34. R: A language and environment for statistical computing / R Core Team. — Vienna : R Foundation for Statistical Computing, 2023. — URL: <https://www.R-project.org/> (accessed: 05.09.2025).
35. da Cunha R.L. Effects of titanium dioxide nanoparticles on the intestine, liver, and kidney of *Danio rerio* / R.L. da Cunha, L. de Brito-Gitirana // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. — 2020. — Vol. 203. — Art. 111032. — DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111032.
36. Kodera K. Zebrafish, medaka and turquoise killifish for understanding human neurodegenerative/neurodevelopmental disorders / K. Kodera, H. Matsui // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23, № 3. — Art. 1399. — DOI: 10.3390/ijms23031399.
37. Martí-Aguado D. Digital pathology: accurate technique for quantitative assessment of histological features in metabolic-associated fatty liver disease / D. Martí-Aguado, A. Rodríguez-Ortega, C. Mestre-Alagarda [et al.] // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. — 2021. — Vol. 53, № 1. — P. 160–171. — DOI: 10.1111/apt.16100.
38. Akiyoshi H. Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny / H. Akiyoshi, A. Inoue // *Zoological Science*. — 2004. — Vol. 21, № 8. — P. 841–850. — DOI: 10.2108/zsj.21.841.
39. Furness A.I. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause / A.I. Furness // *Biological Reviews*. — 2016. — Vol. 91, № 3. — P. 796–812. — DOI: 10.1111/brv.12194.
40. Ackerman H.D. Piscine polemics: small tropical fish species as models for aging research / H.D. Ackerman, G.S. Gerhard // *Conn's Handbook of Models for Human Aging*. — Academic Press, 2018. — P. 361–375.

41. Simakov Y.G. Histological examination of the young *Oncorhynchus mykiss* intestines using the feed with chelated and probiotic supplements / Y.G. Simakov, A.K. Ponomarev, D.L. Nikiforov-Nikishin // *Brazilian Journal of Biology*. — 2022. — Vol. 84. — Art. e265121. — DOI: 10.1590/1519-6984.265121.
42. Okuthe G.E. Morphology, histology and histochemistry of the digestive tract of the Banded tilapia, *Tilapia sparrmanii* (Perciformes: Cichlidae) / G.E. Okuthe, B. Bhomela // *Zoologia (Curitiba)*. — 2020. — Vol. 37. — Art. e51043. — DOI: 10.3897/zoologia.37.e51043.
43. Rodrigues R.A. Liver histology and histomorphometry in hybrid sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans*) reared on intensive fish farming / R.A. Rodrigues, K.C. Saturnino, C.E. Fernandes // *Aquaculture Research*. — 2017. — Vol. 48, № 9. — P. 5083–5093. — DOI: 10.1111/are.13325.