

Т. Л. Котик

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», м. Івано-Франківськ

МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ПАРЕНХИМИ ПІДНИЖНЬОЩЕЛЕПНОЇ ЗАЛОЗИ ІНТАКТНИХ ЩУРІВ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДІВ БАГАТОВИМІРНОЇ СТАТИСТИКИ

З використанням морфометрії та методів багатовимірної статистики, досліджені серомукоцити і вивідні протоки піднижньощелепної залози інтактних щурів. За допомогою кластерного аналізу виділено три кластери клітин кінцевих відділів, які характеризують відповідні фази секреторного циклу. Встановлено, що серомукоцити, метричні параметри яких змінюються впродовж секреторного циклу, переміщуються з кластера в кластер: з кластера 1 в 2-й – при нагромадженні певної кількості первинних продуктів; з кластера 2 в 3-й – після утворення достатньої кількості секрету внаслідок його синтезу та дозрівання; з кластера 3 в 1-й – після виведення секрету. Ці процеси протікають плавно і паралельно. У той же час, частка клітин, які виділили секрет і поглинають продукти для синтезу секрету (клітини кластера 1), є рівною частці клітин, які готові до його виведення (клітини кластера 3), що вказує на функціональну стабільність секреторного циклу кінцевих відділів досліджуваної залози. Аналіз головних компонент дозволив встановити пріоритетність морфометричних ознак внутрішньочасточкових проток. Встановлено, що найбільш вагомою є площа просвіту гранулярних і посмугованих проток, менш важливою є висота епітеліоцитів цих проток, а найменше значення мають висота епітеліоцитів і площа просвіту вставних проток. Використання кластерного аналізу та аналізу головних компонент дозволяє більш повно оцінити стан паренхіми слинних залоз із позиції функціональної морфології.

Ключові слова: серомукоцити, внутрішньочасточкові протоки, морфометрія, кластерний аналіз, аналіз головних компонент.

Робота є фрагментом НДР “Морфофункціональна характеристика деяких органів та функціональних систем при цукровому діабеті в постнатальному періоді онтогенезу” (номер держреєстрації 0109U001106) та “Оптимізація комплексного лікування морфологічних ушкоджень травної, ендокринної та сечостатевої систем при цукровому діабеті” (номер держреєстрації 0113U000769).

При вивченні змін будь-якого органа в умовах перебігу тієї чи іншої експериментальної патології дослідники зіштовхуються з першочерговим завданням – вивчити будову даного органа в інтактних лабораторних тварин, що дозволить оцінити характер та ступінь його перебудови в експерименті. Результати досліджень щодо структурної організації піднижньощелепної залози (ПНЦЗ) інтактних щурів є досить суперечливі, різняться підходами щодо проведення морфометрії та вибору морфометричних показників [1, 2, 6, 8, 11]. Не знайдено також робіт з використанням методів багатовимірної статистики, а саме кластерного аналізу та аналізу головних компонент.

Метою роботи було встановити особливості морфометричних показників клітин кінцевих відділів і вивідних проток ПНЦЗ інтактних щурів.

Матеріал та методи дослідження. У роботі використано 6 щурів-самців лінії «Вістар» віком 12 місяців. Серомукоцити і вивідні протоки ПНЦЗ вивчали на гістологічних зрізах, забарвлених гематоксиліном і еозином. Морфометрію проводили за допомогою програми ImageJ v.1.47t [15] з використанням розроблених нами оригінальних наборів інструментів «MorphoTools for ImageJ» (свідоцтво про авторське право на твір № 57116 від 17.11.2014) і «DuctsMorpho Tools» (свідоцтво про авторське право на твір № 57679 від 17.12.2014). Визначали: площу профільних полів (далі – площа) серомукоцитів та їх ядер; висоту епітеліоцитів вивідних проток і площі їх просвіту. Статистичний аналіз проводили в програмному середовищі R v.3.0 з пакетом «psych» v.1.4. Результати морфометрії наведені у вигляді: вибіркоче середнє ± стандартне відхилення. Попарні множинні порівняння (ПМП) здійснювали з врахуванням поправки за методом Холма.

Результати дослідження та їх обговорення. Секреторний цикл (СЦ), який лежить в основі функціонування серомукоцитів, включає: 1) надходження необхідних речовин; 2) синтез первинного секрету; 3) його дозрівання; 4) нагромадження; 5) виведення [3, 4]. Ці фази не є чітко розмежовані та переходять одна в одну зі зміною розмірів серомукоцитів ПНЦЗ [14].

Нами встановлено, що площа клітин кінцевих відділів становить $123,2 \pm 21,64$ мкм², а їх ядер – $14,9 \pm 2,92$ мкм². Однак, таке представлення даних не дозволяє оцінити співвідношення кількості серомукоцитів на різних фазах СЦ, що буде свідчити про функціональний стан кінцевих відділів ПНЦЗ [4]. Виходячи з цього, ми провели кластерний аналіз для виявлення таких груп (кластерів) серомукоцитів, які характеризуватимуть відповідні фази СЦ. Гістологічно, за розмірами серомукоцитів і їх ядер, можна виділити тільки три таких кластери клітин: 1) найменших, які виділили секрет і поглинають продукти; 2) середніх розмірів, в яких здійснюється синтез і дозрівання секрету; 3) найбільших серомукоцитів, що містять велику кількість секреторних гранул і готові до їх виведення.

Ієрархічним агломеративним методом кластеризації Варда [9] отримано дендрограму (рис. 1), яка підтверджує нашу гіпотезу щодо існування трьох кластерів в сукупності серомукоцитів ПНЦЗ, а за допомогою ітеративного методу кластеризації k-means (алгоритм Хартігана і Вонга) визначено їх метричні параметри (табл. 1).

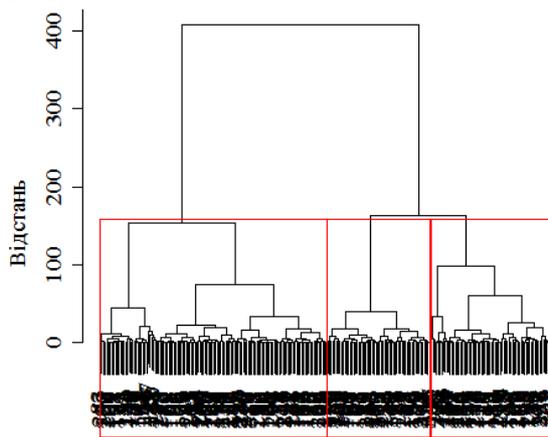
Таблиця 1

Параметри різних кластерів серомукоцитів інтактних тварин

	Площа серомукоцитів, мкм ²	Площа ядер серомукоцитів, мкм ²	% клітин, які формують кластер
Кластер 1	97,0 ± 8,87	14,0 ± 2,48	26,4
Кластер 2	121,2 ± 7,83	14,7 ± 2,86	42,9
Кластер 3	148,7 ± 11,13	16,1 ± 3,02	30,7

При ПМП (тест Уїлкоксона) встановлено, що всі кластери відрізняються між собою за площею серомукоцитів і їх ядер ($p < 0,05$). При цьому, відсотки клітин, які утворюють кластери 1 і 3, не відрізняються між собою ($p > 0,05$) і є меншими за такий же показник кластера 2 ($p < 0,05$) (ПМП пропорцій, команда «pairwise.prop.test»).

Отримані кластери представлені на рис. 2. Бачимо, що ці кластери не перекриваються, що вказує на високу ступінь адекватності отриманої класифікації. Зірочками позначено центри відповідних кластерів, а їх координати відповідають середнім значенням площі серомукоцитів (по осі абсцис) та їх ядер (по осі ординат). З рис. 2 наглядно видно, що клітини кластера 1 є компактно розташовані навколо центру їх кластера, що свідчить про незначну варіабельність досліджуваних метричних характеристик даного кластера. Натомість клітини кластера 3 є найбільш дифузно розміщені, тобто вони є найбільш мінливі.



Серомукоцити піднижньощелепної залози

Рис. 1. Дендрограма сукупності клітин кінцевих відділів ПНЦЗ шура (метрика - евклідова, метод - Варда). Червоною лінією виділені три кластери сукупності серомукоцитів.

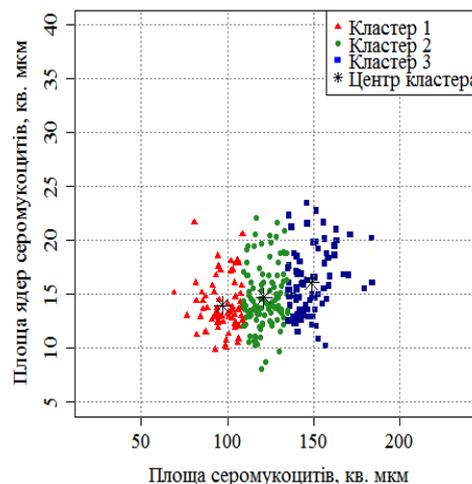


Рис. 2. Кластерна структура серомукоцитів ПНЦЗ інтактних тварин.

Секрет з кінцевих відділів надходить в систему вивідних проток. Відомо, що крім виведення секрету з кінцевих відділів, внутрішньочасточкові протоки мають ще й інші функції: 1) вставні (ВП) – регенераторну [5, 10]; 2) гранулярні (ГП) мають відношення до підтримки місцевого імунітету порожнини рота [7]; 3) посмуговані (ПП) – модифікують електролітний склад слини [13]. На основі морфометричного аналізу встановлено, що площа просвіту проток збільшується у дистальному напрямку, при цьому висота епітеліоцитів ГП є найбільшою, а ВП – найменшою (табл. 2).

Таблиця 2

Метричні параметри вивідних проток ПНЦЗ інтактних тварин

	Висота епітеліоцитів, мкм	Площа просвіту, мкм ²
ВП	4,4 ± 0,89	7,0 ± 3,96
ГП	16,9 ± 1,98	20,5 ± 11,40
ПП	14,0 ± 2,13	69,0 ± 51,62

Однак, такий підхід щодо аналізу досліджуваної системи вивідних проток не дозволяє встановити, які з наведених морфометричних параметрів є найважливішими, а які відіграють

менше значення. З цією метою було проведено аналіз головних компонент (пакет «psych» для R), який часто розглядають як один з методів факторного аналізу. Для визначення кількості головних компонент (ГК) використовували критерій Кайзера [12], за яким враховуються тільки ті ГК, власні значення яких є більшими за 1,0. Результат аналізу приведений в табл. 3.

Як бачимо з табл. 3, площа просвіту ГП і ПП вагомо впливають на ГК 1 (сила зв'язків з ГК 1 дорівнює 0,77 і 0,90, відповідно). Ми вважаємо, що вона є ГК пропускної здатності вивідних проток і є найбільш значимою, оскільки визначає найбільшу частку сукупної дисперсії (25,0 %) (рис. 3). На ГК 2 значно впливає висота епітеліоцитів ГП і ПП (сила їх зв'язків з ГК 2 є більшою 0,7), тобто вона є ГК морфофункціонального стану епітеліоцитів досліджуваних проток і відображає їх функціональну активність (див. рис. 3). При цьому, ГК 2 детермінує меншу частку сукупної дисперсії (21,9%), ніж ГК 1. ГК 3 є найменш важливою, бо характеризує найменшу частку сукупної дисперсії (20,7%). Вона має вагомі зв'язки тільки з морфометричними показниками ВП (з висотою епітеліоцитів – сила зв'язку 0,93, а з величиною просвіту – 0,30) і є головною компонентою вставних проток.

Таблиця 3

Навантаження змінних на ГК вивідних проток ПНЦЗ інтактних тварин (тип обертання – промакс)

	ГК 1	ГК 2	ГК 3
Висота епітеліоцитів ВП	-0,03	-0,08	0,93
Площа просвіту ВП	-0,22	0,25	0,30
Висота епітеліоцитів ГП	-0,09	0,82	-0,28
Площа просвіту ГП	0,77	-0,10	0,26
Висота епітеліоцитів ПП	0,18	0,74	0,28
Площа просвіту ПП	0,90	0,12	-0,24
Власні значення ГК	1,60	1,40	1,01
Внесок кожної ГК у сукупну дисперсію	25,0 %	21,9 %	20,7 %
Сумарна частка дисперсії, яка визначається трьома ГК	67,6 %		

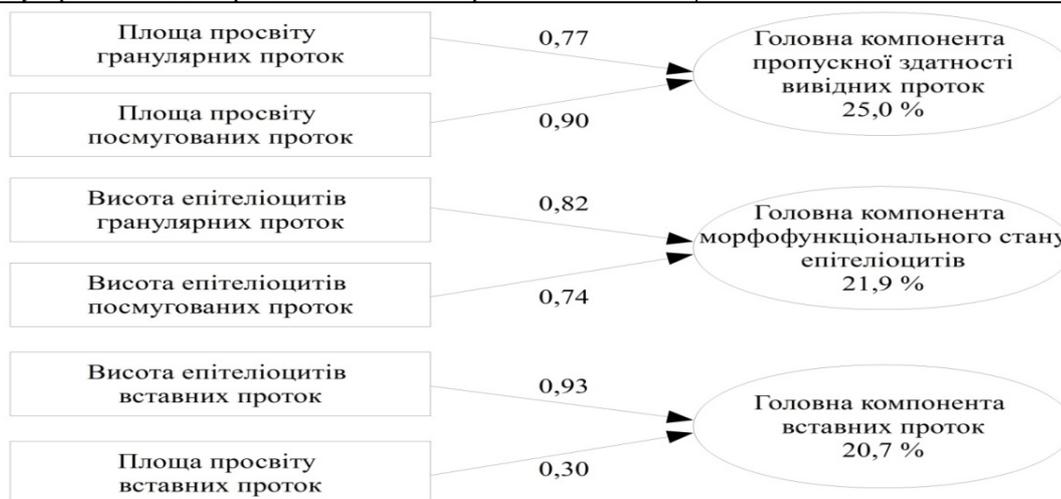


Рис. 3. Структура головних компонент вивідних проток ПНЦЗ інтактних тварин.

Висновки

1. Вперше проведено кластерний аналіз серомукоцитів ПНЦЗ і виділено кластери, які відповідають різним фазам СЦ. Впродовж СЦ змінюються розміри серомукоцитів, що зумовлює їх послідовне переміщення з кластера в кластер: з кластера 1 в кластер 2 – при нагромадженні певної кількості первинних продуктів; з кластера 2 в кластер 3 – після утворення достатньої кількості секрету внаслідок процесів його синтезу та дозрівання; з кластера 3 в кластер 1 – після виведення секрету. Ці процеси протікають плавно і паралельно.
2. Встановлено, що частка клітин, які виділили секрет і поглинають продукти для синтезу секрету (клітини кластера 1), є рівною частці клітин, які готові до його виведення (клітини кластера 3), що вказує на функціональну стабільність СЦ кінцевих відділів ПНЦЗ.
3. Вперше проведено аналіз головних компонент морфометричних показників внутрішньочасточкових проток ПНЦЗ інтактних щурів. За результатами цього аналізу найбільше значення має площа просвіту гранулярних і посмугованих проток, менш важливе – висота епітеліоцитів цих проток, а найменше – метричні параметри вставних проток.

4. Використання цих методів багатомірної статистики дозволяє більш повно оцінити стан паренхіми слинних залоз із позиції функціональної морфології.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть присвячені вивченню кластерів сукупності клітин кінцевих відділів і структури головних компонент інших слинних залоз в нормі та при моделюванні експериментальної патології.

Список літератури

- Gubina-Vakulik G. I. Morfologicheskie osobennosti podnizhnecheljustnoj sljunnoj zhelezy krysa pri jeksperimental'noj gipokinezii ih materej / G. I. Gubina-Vakulik, Ju. A. Slin'ko, I. I. Sokolova, N. G. Kolousova // Svit medicini ta biologii. – 2013. – №2. – С. 26-28.
- Croshenko G.A. Analiz znachushhosti koreljacijnih zv'jazkiv mizh morfometrchnimi pokaznikami velikih slinnih zaloz shhuriv pislja stimuljacii / G. A. Croshenko // Svit medicini ta biologii. – 2012. – №2. – С. 94-97.
- Korol' T. V. Suchasni ujavlennja pro sekreciju ta rol' u nij kal'ciju / T.V. Korol' // Aktual'ni problemi medicini, farmacii ta biologii biologii. – 2006. – №2. – С. 65-72.
- Mozhejko L. A. O geterogenosti jezkokrinnogo otdela podzheludочноj zhelezy i ego fiziologicheskikh rezervah / L. A. Mozhejko // Zhurnal GrGMU. – 2009. – №4. – С. 66-69.
- Chajkovsk'ij Ju. B. Stovburovi klitini velikih slinnih zaloz / Ju. B. Chajkovsk'ij, S. B. Gerashhenko, O. I. Del'cova // Svit medicini ta biologii. – 2012. – №2. – С. 200-203.
- Ali Z. H. Histomorphometric analysis of the postnatal development and growth of rat submandibular glands in offsprings of diabetic mothers / Z. H. Ali, R. Mubarak // Journal of American Science. – 2012. – Vol.8, №1. – P. 342-349.
- Carpenter G. H. Secretion of IgA by rat parotid and submandibular cells in response to autonomic stimulation in vitro / G. H. Carpenter, G. B. Proctor // International Immunopharmacology. – 2004. – Vol.4, №8. – P. 1005-1014.
- Caldeira E. J. Stereology and ultrastructure of the salivary glands of diabetic Nod mice submitted to long-term insulin treatment. / E. J. Caldeira // The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. – 2005. – Vol.286, №2. – P. 930-937.
- Haldar P. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. / P. Haldar, Ian D. Pavord, D. E. Shaw [et al.] // American journal of respiratory and critical care medicine. – 2008. – Vol.178, №3. – P. 218-224.
- Man Y. G. Contributions of intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats. / Y. G. Man, W. D. Ball, L. Marchetti, a R. Hand // The Anatomical record. – 2001. – Vol.263, №2. – P. 202-14.
- Noorafshan A. Volume-weighted mean volume of the submandibular gland acini in male and female diabetic rats / A. Noorafshan // Micro. – 2006. – Vol.37, №7. – P. 613-616.
- Peres-Neto P. R. How many principal components? stopping rules for determining the number of non-trivial axes revisited / P. R. Peres-Neto, D. a. Jackson, K. M. Somers // Computational Statistics & Data Analysis. – 2005. – Vol.49, №4. – P. 974-997.
- Roussa E. Distribution of V-ATPase in rat salivary glands / E. Roussa, F. Thévenod // Eur.J.Morpho. – 1998. – №36. – P. 147-152.
- Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. / C. M. Krane, J. E. Melvin, H. V. Nguyen [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 2001. – Vol.276, №26. – P. 23413-20.
- Schneider C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri // Nature Methods. – 2012. – Vol.9, №7. – P. 671-675.

Реферати

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПАРЕНХИМЫ ПОДНИЖНЕЧЕЛЮСТНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИНТАКТНЫХ КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МНОГОМЕРНОЙ СТАТИСТИКИ

Котик Т. Л.

С использованием морфометрии и методов многомерной статистики, исследованы серомукоциты и выводные протоки поднижнечелюстной железы интактных крыс. С помощью кластерного анализа выделены три кластера клеток концевых отделов, которые характеризуют соответствующие фазы секреторного цикла. Установлено, что серомукоциты, метрические параметры которых изменяются в течение секреторного цикла, перемещаются из кластера в кластер: из кластера 1 во 2-й – при накоплении определенного количества первичных продуктов; из кластера 2 в 3-й – после образования достаточного количества секрета вследствие его синтеза и созревания; из кластера 3 в 1-й – после выделения секрета. Эти процессы протекают плавно и параллельно. В то же время, доля клеток, которые выделили секрет и поглощают продукты для синтеза (клетки кластера 1), соответствует доле клеток, которые готовы выделению секрета (клетки кластера 3), что указывает на функциональную стабильность секреторного цикла концевых отделов исследуемой железы. Анализ главных компонент позволил установить приоритетность морфометрических признаков внутридольковых протоков. Установлено, что наиболее весомым является площадь просвета гранулярных и исчерченных протоков, менее важна высота эпителиоцитов этих

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF SUBMANDIBULAR GLAND PARENCHYMA OF INTACT RATS USING THE METHODS OF MULTIVARIATE STATISTICS

Kotyk T L.

Seromucous cells and excretory ducts of intact rats were investigated using morphometry and multivariate statistics methods. Three clusters of terminal portion cells, which characterize the corresponding phases of secretory cycle, were identified by means of cluster analysis. It was determined that seromucous cells, metric parameters of which vary during the secretory cycle, are moving from cluster into the cluster: from cluster 1 into the 2nd – after a certain amount of primary products accumulation; from 2nd cluster into the 3rd – after a sufficient amount of secret synthesis and maturation; from cluster 3 into 1st – after the secretions evacuation. The described above processes pass smooth and parallel. At the same time, the share of #1 cluster cells (those that excrete secret and absorb the required incoming products) equals to the share of #3 cluster cells (those that are ready to secretions evacuation). This fact indicates that the secretory cycle of studied gland terminal portions is to be functionally stable. The principal component analysis allowed to specify the priority of morphological features of intralobular ducts. It was determined that the lumen area of the granular and striated ducts is the most significant, the height of duct epithelial

проток, а наименьшее значение имеют высота эпителиоцитов и площадь просвета вставочных протоков. Использование кластерного анализа и анализа главных компонент позволяет более полно оценить состояние паренхимы слюнных желез с позиции функциональной морфологии.

Ключевые слова: серомукоциты, интрадолевковые протоки, морфометрия, кластерный анализ, анализ главных компонент.

cells less important, and the height of epithelial cells and intercalated ducts lumen area are the least important. The cluster analysis and principal component analysis can serve as a mean of a better salivary gland parenchyma condition assessment (from the side of functional morphology).

Key words: seromucous cells, intralobular ducts, morphometric analysis, cluster analysis, principal component analysis.

Стаття надійшла 23.09.2014 р.

Рецензент Єрошенко Г.А.

УДК 577.151.63:57.017.6

С. І. Крижна

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОРУШЕННЯ ПОРФІРИНОВОГО ОБМІНУ НА МОДЕЛЯХ СВИНЦЕВОЇ ТА БЕНЗОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЙ

У роботі наведені результати експериментального пошуку оптимальної моделі відтворення порушення порфіринового обміну у піддослідних тварин.

Встановлено, що моделювання хронічної бензольної і свинцевою інтоксикацій достовірно призводить до порушення порфіринового обміну за показниками проміжного обміну порфіринів у крові та сечі щурів. Такі зміни завжди супроводжуються достовірним ураженням печінки за показниками зростання активності в плазмі крові індикаторів цитолізу, холестерину і паренхиматозного запалення. Найбільш оптимальною для визначення проміжних продуктів синтезу гема в головному мозку є модель свинцевої інтоксикації в дозі 0,5 мл / кг щодня протягом 2-х тижнів.

Ключові слова: порфірія, модель, бензолева і свинцева інтоксикації.

Робота є фрагментом НДР «Фармакологічні дослідження біологічно-активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування у медичній практиці» (№ державної реєстрації 0113U000478).

Серед нозології хвороби людини клініцисти та патофізіологи окремо виділяють широкую групу спадково обумовленої патології – порфірії. Поширеність захворювання зумовлена типом ферментативного дефекту біосинтезу гему та впливом тригерних факторів таких як солі важких металів, алкоголь, контакт з отрутохімікатами, лікарські препарати, порушення гормонального профілю у жінок, різка зміна характеру харчування, голодування, інфекційні захворювання, стресові ситуації тощо [1, 4]. Гостру порфірію можна підозрювати у будь-якого хворого, що госпіталізовано в клініку з раптовим абдомінальним болем, периферичною невротатією або з порушенням психіки. Проте незважаючи на низку визначених механізмів розвитку порфірії, наразі неврологічна дисрегуляція досліджена вкрай недостатньо [8]. Проблема досліджень полягає в тому, що створити модель захворювання *in vivo* вкрай важко, бо δ-амінолевулінова кислота та порфобіліноген швидко перетворюються в фотосенсибілізуючі порфірини і стало високої концентрації цих сполук не відбувається [9]. Існуючі дані щодо перебігу порушеного метаболізму гему наразі недостатні, але безперечно, необхідні з точки зору розуміння фізіологічних та патологічних процесів, які відбуваються у нервовій системі.

Метою роботи було оцінювання особливостей порушеного порфіринового обміну в організмі щурів на різних експериментальних моделях (інтоксикації бензолом, оцтовокислим свинцем) задля визначення найбільш оптимальної модельної патології.

Матеріал та методи дослідження. Ступінь ураження печінки за умов бензольної інтоксикації вивчали за допомогою морфологічних, морфометричних та біохімічних методів дослідження. Для відтворення порушення порфіринового обміну використовували 150 тварин та 2 експериментальні моделі: 1) шляхом бензольної інтоксикації протягом 15 діб вводили 0,1 мл/кг та 0,5 мл/кг (один раз на дві доби протягом 30 діб); 2) підшкірними ін'єкціями оцтовокислого свинцю з розрахунку 2,5 мг на 100 г маси або 10 мг на 1 кг маси тіла тварин кожен день протягом 10 днів [5]. Тварини були поділені на експериментальні групи: 1. контрольні щури; 2. щури, яким моделювали порушення порфіринового обміну. Об'єктом досліджень були внутрішні органи (печінка, головний мозок), сеча, цільна кров, що відбиралася на антикоагулянт (трикалієва сіль ЕДТА); сироватка крові. У інтактних щурів і щурів з порушеним порфіриновим обміном визначали рівень 5-амінолевулінова кислота (АЛК) і порфобіліноген (ПБГ) в сечі, активність ферментів аспартатамінотрансферази (АлАТ) і аланінамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ), показники тимолової проби в сироватці крові [6]. Кількісне визначення АЛК і ПБГ в сечі проводили за методом Mauzerall і Granick (1970), що заснований на їх розділенні за допомогою