

ПЕРСПЕКТИВА ВИКОРИСТАННЯ КЛАСТЕРНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ОТРИМАННЯ НОВИХ НАУКОВИХ РЕЗУЛЬТАТІВ НА ПРИКЛАДІ ДОСЛІДЖЕННЯ УРОТЕЛІОЦИТІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ДІАБЕТИЧНІЙ ЦИСТОПАТІЇ

О.Г. Попадинець, О.М. Юрах, Н.С. Токарук, Г.Ю. Юрах¹, І.В. Пукач, М.М. Осипчук²,
О.П. Колосов³, В.І. Коржовська, Н.М. Дубина⁴, А.С. Дмитренко⁵

Кафедра анатомії людини, кафедра гістології¹

Кафедра мовознавства⁴

Кафедра фізичного виховання та здоров'я⁵

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Кафедра статистики і вищої математики²

ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника»

Відділення анестезіології і інтенсивної терапії МКЛ № 1³, м. Івано-Франківськ

Івано-Франківськ, Україна

e-mail: ilonap624@gmail.com

THE PROSPECT OF CLUSTER ANALYSIS' USE TO OBTAIN THE NEW SCIENTIFIC RESULTS AT THE EXAMPLE OF UROTHELIOCYTES' STUDY IN EXPERIMENTAL DIABETIC CYSTOPATHY

О.Н. Popadynets, О.М. Yurakh, N.S. Tokaruk, H.Yu. Yurakh¹, I.V. Pukach, M.M. Osypchuk²,
O.P. Kolosov³, V.I. Korzhovska, N.M. Dubyna⁴, A.S. Dmytrenko⁵

Department of Human Anatomy, Department of Histology¹

Department of Linguistics⁴

Department of Physical Education and Health⁵

SHEI "Ivano-Frankivsk National Medical University"

Department of Statistics and Higher Mathematics²

SHEI "Vasyl Stefanyk Precarpathian National University"

Department of Anesthesiology and Intensive Care of MCH (Municipal Clinical Hospital) № 1³, Ivano-Frankivsk,

Ivano-Frankivsk, Ukraine

e-mail: ilonap624@gmail.com

Резюме. У ході експерименту на 70 дорослих щурах-самцях лінії Вістар визначені пріоритетні механізми розвитку стрептозотоцинової діабетичної цистопації. Морфометрично і статистично доведено, що розбалансованість системних механізмів функціонування перехідного епітелію сечового міхура, яка настає вже з перших термінів розвитку діабетичної цистопації і не відновлюється до кінця експерименту, пов'язана з порушенням характерної для норми структурно-функціональної рівноваги між уротеліоцитами кластерів 4 і 1 та кластерів 2 і 3, а також із втратою уротелієм сечового міхура морфологічної стратифікації.

Виявлені загальнопатологічні процеси, які супроводжують розвиток діабетичної цистопації сечового міхура. За результатами гістологічних, морфометричних, ультраструктурних методів, біохімічних досліджень крові та сечі, визначення водного балансу і кластерного аналізу встановлені головні системні та позасистемні фактори, які є причиною розвитку цих патологічних процесів.

Ключові слова: стрептозотоциновий діабет, діабетична цистопація, уротеліоцити, перехідний епітелій, кластерний аналіз.

Abstract. During the experiment on 70 adult male rats of the Wistar line the priority mechanisms of development of streptozotocin diabetic cystopathy were determined. It's morphometrically and statistically proved that the imbalance of the systemic mechanisms of the functioning of the transitional epithelium of the bladder starts from the first stages of the development of diabetic cystopathy and is not restored to the end of the experiment; it is associated with a violation of the structural and functional balance between the urothelocytes of clusters 4 and 1 and clusters 2 and 3, as well as with a loss of urothelial bladder of morphological stratification.

The general pathological processes accompanying the diabetic cystopathy of a bladder development were revealed. According to the results of histological, morphometric, ultrastructural methods, biochemical studies of blood and urine, determination of water balance and cluster analysis, the main systemic and non-systemic factors that cause the development of these pathological processes were established.

Key words: streptozotocin diabetes; diabetic cystopathy; urothelocytes; transient epithelium; cluster analysis.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень. Ця стаття є логічним продовженням наукової роботи [6], що була написана на основі результатів кластерного аналізу клітин перехідного епітелію (ПЕ) сечового міхура (СМ) щурів у нормі. У попередній статті ми констатували, що використання кластерного аналізу за умови експериментальної патології відкриває набагато ширші можливості щодо отримання нових результатів. Для прикладу ми обрали експериментальну діабетичну цистопацію (ДЦ), яка розвивається в лабораторних щурів на тлі змодельованого стрептозотоцинового

діабету (СД).

Ця стаття, як і попередня, може слугувати методичними рекомендаціями, у першу чергу, молодим науковцям для розширення їхнього наукового кругозору. Такий методичний підхід щодо отримання нових наукових результатів може бути з успіхом застосований для дослідження клітин епітеліальних пластів, які мають високу здатність до фізіологічної та репаративної регенерації (епітеліоцити шлунка, тонкої та товстої кишок, повітроносних і сечовивідних шляхів, піхви, ендометрію, епідермісу та ін.) як у нормі, так і при різних

патологіях.

Найголовнішим, що було встановлено в попередніх наших дослідженнях [4, 6, 10, 11, 13], є наступне: 1) найбільш коректними метричними ознаками для проведення кластерного аналізу клітин ПЕ СМ є площа профільного поля його клітин та їхніх ядер; 2) кластерний аналіз уротеліоцитів СМ доцільно проводити при неоднорідності клітинного складу окремих його шарів, що можна визначити за допомогою коефіцієнта варіації; 3) для уротеліоцитів СМ найвагоміше значення має коефіцієнт варіації їхніх ядерно-цитоплазматичних відношень (ЯЦВ), який, окрім неоднорідності складу, вказує також і на ступінь їхньої диференціації в кожному шарі епітеліального пласта; 4) найбільш універсальним з агломеративно-ієрархічних методів, які дають можливість отримати нові результати щодо кількості кластерів клітинного складу епітеліальних пластів, є метод Варда, а з метрик – евклідова; 5) з ітераційних методів, що визначають метричні показники клітин різних кластерів, достатньо застосовувати метод k-means (алгоритм Hartigan-Wong); 6) для образного представлення результатів кластерного аналізу доцільно використовувати когнітивну графіку, різні елементи якої забарвлені різними кольорами, кожний з яких має свій визначений зміст, що дає можливість без аналізу великої кількості даних робити певні висновки; до такої графіки належить представлення результатів кластеризації за методом k-means; 7) у морфологічних роботах для встановлення певних закономірностей проводять морфологічні дослідження на макро-, мікро- і ультраструктурному рівнях, які доповнюються морфометричними показниками, а дескриптивну (описову) і порівняльну статистику використовують для підтвердження доказовості отриманих результатів; кластерний аналіз дає додаткову можливість отримати статистично аргументовані нові результати, які відображають в числових вимірах об'єктивно існуючі зв'язки між предметами та явищами; ці нові результати потребують обґрунтування з використанням як морфологічних, так і фізіологічних, біохімічних та інших методів дослідження.

За таких умов нами вперше в нормі отримано чотири кластери (КЛ) клітин уротелію СМ щурів, а саме: КЛ 1, який за нашими даними утворений базальними уротеліоцитами, що є камбіальними клітинами і, за даними ряду авторів [15, 17, 27], диференціюються в клітини інших шарів ПЕ; КЛ 4, що сформований, як ми встановили, парасольковими клітинами, які утворюють уротеліальний бар'єр [17, 25, 27]; серед проміжних уротеліоцитів, які за літературними даними є мігруючими клітинами, що диференціюються [15, 17, 25], нами були виділені два КЛ, які метрично відрізняються між собою за розмірами клітин та їхніх ядер і рівнем ЯЦВ, а морфологічно – за кількістю уротеліальних пухирців і лізо-сом, виразністю комплексу Гольджі (КЛ 2 утворений помірно-, а КЛ 3 – високодиференційованими уротеліоцитами).

Нами встановлено, що при дослідженні клітинного складу ПЕ СМ особливу увагу треба звертати на порівняння відсотків клітин, які формують кожний з кластерів, а саме: на відсутність статистично значимої відмінності між частками клітин КЛ 1 і 4, які відображають узгодженість між проліферативними потенціями базальних уротеліоцитів (КЛ 1) і цілісністю уротеліального клітинного бар'єра (КЛ 4), а також між відсотками клітин КЛ 2 і 3, що вказують на баланс між початковим та кінцевим етапами диференціації проміжних клітин уротелію СМ.

Таким чином, результати попередніх досліджень (з використанням кластерного аналізу) вказують на те, що в нормі між клітинами цих пар кластерів існує структурно-функ-

ціональна рівновага, яка відображає морфометричні особливості функціонування клітин ПЕ СМ за звичайних умов. Тобто, кластерний аналіз дозволяє підійти до вивчення клітинного складу уротелію СМ з позицій структурного аналізу – методу дослідження сталих характеристик ієрархічно впорядкованої системи (у нашому випадку системи клітин ПЕ СМ) шляхом виділення в ній підсистем і елементів різного рівня (у нашому випадку клітин різних кластерів) та визначення відносин і зв'язків між ними.

Мета дослідження: на прикладі дослідження клітин ПЕ СМ на тлі розвитку діабетичної цистопатії показати можливість кластерного аналізу щодо отримання нових наукових результатів, проілюструвати зразки обґрунтування нових даних за результатами гістологічних, ультраструктурних, біохімічних методів дослідження крові та сечі, вивчення водного балансу, а також навести приклад комплексної оцінки патоморфологічної перебудови уротелію з використанням когнітивної графіки.

Матеріал і методи

Дослідження проведено на 70 щурах-самцях лінії Вістар віком 12 місяців (на кожний термін дослідження по 10 тварин діабетичних і 4 – контрольних). Цукровий діабет (ЦД) моделювали стрептозотоцином (60 мг/кг маси тіла). Забір матеріалу проводили на 14, 28, 42, 56 і 70-ту доби дослідження. ПЕ СМ вивчали на гістологічних зрізах, забарвлених гематоксиліном і еозином (H&E), та ультраструктурно згідно рекомендацій [8]. Морфометрію здійснювали програмно для аналізу і обробки зображень ImageJ v. 1.47 (<https://imagej.nih.gov/ij/>), яка розповсюджується з відкритим вихідним кодом без ліцензійних обмежень [20, 30]. Статистичний аналіз, включаючи кластерний, виконували в програмному середовищі для статистичних обчислень і графіки R v. 3.0 (<https://www.r-project.org/>), яке також розповсюджується без ліцензійних обмежень [29]. Числові дані представляли у вигляді середнього значення та стандартного відхилення (Mean±SD). Кластерний аналіз проводили за площею профільних полів (далі – площа) уротеліоцитів та їхніх ядер методом k-means (алгоритм Hartigan-Wong) [14, 16, 19]. Рівень глюкози в крові визначали за допомогою глюкометра "Accu-Chek Active" німецької фірми "Roche Diagnostics GmbH". Рівень глюкози в сечі та глюкози в крові під час забору матеріалу встановлювали глюкозо-оксидантним методом. Вимірювання рН сечі проводили рН-метром «Checker 1» («Hanna Instruments»). Визначення маси тіла щура виконували на лабораторній вазі, а маси СМ – на електронній. Збір сечі здійснювали в метаболічній камері власної конструкції [7].

Результати та їх обговорення

Отримані дані за умови норми були взяті за основу для вивчення клітин ПЕ СМ при СД, який спричиняє розвиток діабетичної цистопатії. Оскільки кількість кластерів в клітинному складі уротелію була встановлена в нормі, використовували тільки ітераційний метод кластеризації k-means, який дав можливість отримати відсотки клітин, які формують кожний кластер, і в кожному кластері – середню площу уротеліоцитів та їхніх ядер, з яких вираховували ЯЦВ.

Нами вперше встановлено, що в ході розвитку СД порушується характерна для норми структурно-функціональна рівновага між парасольковими клітинами (КЛ 4) і базальними уротеліоцитами (КЛ 1), а також між клітинами КЛ 2 і 3. Підтвердження цього (рис. 1) є статистично значиме збільшення з 14-ї доби дослідження і в наступні терміни відсотків клітин КЛ 1 у межах 1,90–2,53 раза і зменшення часток клітин КЛ 3 і 4 в 1,40–1,83 раза і в 1,42–2,30 раза відповідно. Водночас,

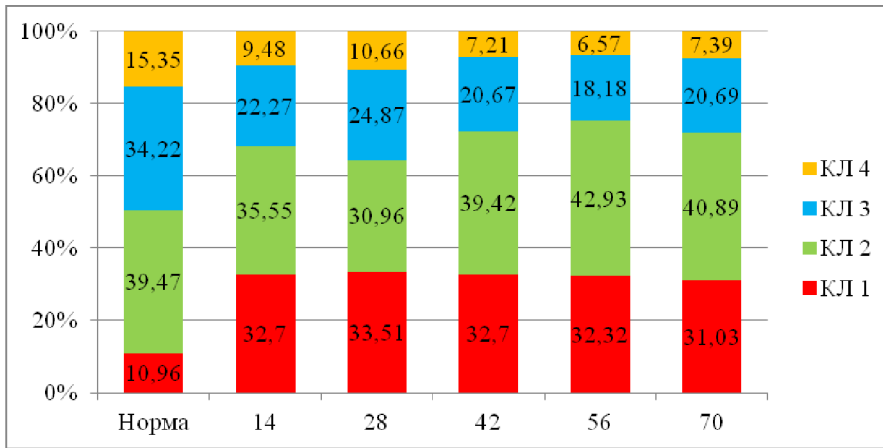


Рис. 1. Частки уротеліоцитів різних кластерів на етапах дослідження. Внизу представлені терміни спостереження (доби)

частка клітин КЛ 2 упродовж експерименту статистично значимо не змінювалася. Така перебудова кластерних структур вказує на розбалансованість системних механізмів функціонування ПЕ СМ, яка настає вже з перших термінів розвитку СД і не відновлюється до кінця експерименту. Ці статистичні результати, які ми отримали за даними морфометрії клітин ПЕ та кластерного аналізу на кожному етапі спостереження розвитку ДЦ, є новими (аналогів у доступній літературі ми не знайшли), але вони потребують подальшого обґрунтування, що було нами здійснено.

Так, вже на ранніх етапах розвитку СД [11; 32] у шурів розвивається десквамація клітин КЛ 4 і 3, що виявляється як на світлооптичному (рис. 2), так і ультраструктурному (рис. 3) рівнях і призводить до зменшення відсотків клітин цих кластерів (див. рис. 1). Ми вважаємо, що злушення клітин ПЕ СМ на 14–28-у доби дослідження спричиняє високий гідростатичний тиск сечі, об'єм якої збільшується в ці терміни в 12,14–18,54 рази [10]. На десквамацію уротелію СМ при експериментальному ЦД, яка була представлена тільки описово, вказують також інші дослідники [24; 25], тільки в більш пізні терміни ЦД (на кінець 8–9-го тижнів). Ще інші автори [18; 28] при різних патологічних впливах виявили десквамацію парасолькових клітин набагато раніше: перші через 72 години, а другі – на 20-у хвилину після дії чинника.

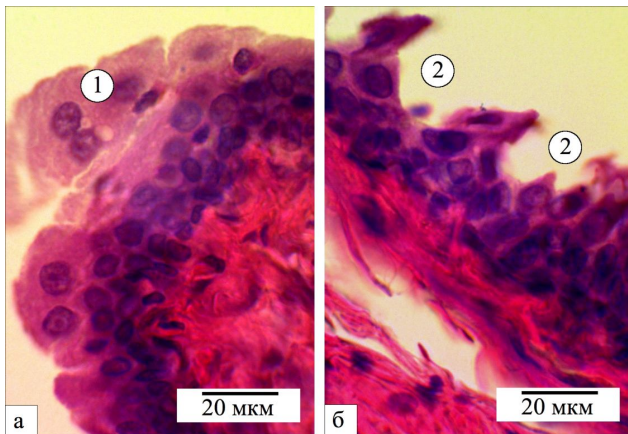


Рис. 2. Десквамація клітин ПЕ на 14-у (а) і 28-у (б) доби дослідження. Забарвлення: Н&Е. Збільшення $\times 400$. 1 – пласт клітин, який злуцується; 2 – «порожні» ділянки, які залишилися після десквамації

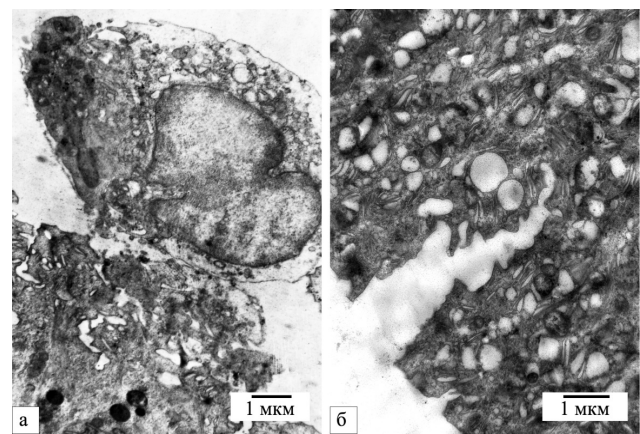


Рис. 3. Десквамація парасолькової клітини ПЕ та їхній клиноподібний розрив на 14-у (а) і 28-у (б) доби дослідження. Електронні мікрофотографії. Збільшення $\times 6400$ (а) і $\times 8000$ (б)

Ми встановили, що на 42- і 56-у доби розвитку СД [11] десквамація ПЕ СМ настає, що ідентифікується як на гістологічних зрізах (рис. 4), так і ультраструктурно (рис. 5 а, б). Злушення піддаються уротеліоцити усіх шарів ПЕ, що веде до порушення стратифікації (патологічна зміна пошарової будови ПЕ) та оголення базальної мембрани (рис. 4 б). Посиленню десквамації клітин ПЕ, як вказують окремі автори [3], сприяє зміщення реакції сечі до кислоти. У нашому досліді, починаючи з 42-ї доби, рН сечі діабетичних шурів становила 6,08–5,53 [10]. На втрату уротелієм СМ морфологічної стратифікації при різних цистопатіях, а саме при вібраційній хворобі та хронічному

простатиті вказують інші автори [5]. Необхідно зазначити, що поряд із ділянками ПЕ, в яких наявні патологічні зміни, виявляються ділянки, де уротелій мало чим відрізняється від норми чи контролю. На такий поліморфізм змін уротеліоцитів при цистопатіях вказують ряд авторів [2, 9, 25].

Достеменно відомо, що руйнування уротеліального клітинного бар'єра (уротеліоцитів КЛ 4) спричиняє підвищення проліферативної активності клітин базального шару ПЕ (уротеліоцитів КЛ 1), які далі диференціюються в клітини інших шарів уротелію [15, 17, 18, 21, 25, 27]. Очевидно, що в нашому досліді збільшення відсотка базальних уротеліоцитів (клітин КЛ 1), також є наслідком їхньої проліферації.

Виходячи з наших даних і даних літератури [27, 28], можна стверджувати, що зменшення часток клітин КЛ 3, яке ми виявили, свідчить про сповільнення кінцевого (термінального) етапу диференціації проміжних уротеліоцитів СМ. При цьому початковий етап їхньої диференціації не страждає, на що вказує відсутність статистично значимої різниці між відсотками клітин КЛ 2 контрольних і діабетичних шурів в усі періоди розвитку СД. До речі R. E. Hurst et al. [23] відзначають, що при деяких патологіях СМ спостерігається дефект саме термінального диференціювання клітин уротелію.

За даними проведеного нами морфометричного і

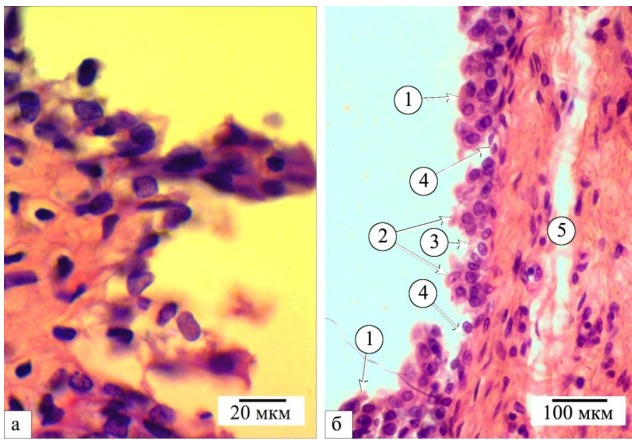


Рис. 4. Тотальна десквамація ПЕ на 42-у (а) і порушення його стратифікації на 56-у (б) доби дослід. Забарвлення: Н&Е. Збільшення: $\times 400$ (а) і $\times 100$ (б). Шари клітин ПЕ, які залишилися: 1 – три; 2 – два; 3 – один; 4 – оголення БМ; 5 – інтерстиційний набряк

кластерного аналізу було встановлено, що на 14–28-у доби дослід в усіх кластерах статистично значимо збільшується середня площа уротеліоцитів в 1,21–1,40 раза, а їхніх ядер – в 1,17–1,44 раза (рис. 6). Ці результати є оригінальними, однак потребують визначення причин таких змін.

Ми дослідили, що вказані вище морфометричні зміни спричинені розвитком вакуольної дистрофії, яка на гістологічних препаратах виявляється як світлі ділянки цитоплазми, які не сприймають еозин (рис. 7). Найчастіше ці ділянки локалізуються навколо ядер уротеліоцитів. Власне на гістологічних зрізах видно, що вакуольна дистрофія виникає одночасно в уротеліоцитах усіх шарів ПЕ, особливо, у проміжному і базальному, і може бути менше чи більше вираженою. На ультраструктурному рівні визначається вакуольна трансформація мітохондрій, в яких виявляються дрібнозернисті, сітчасті чи тонкофібрилярні структури (рис. 8 а). У таких уротеліоцитах можуть спостерігатися апоптотні ядра (рис. 8 б). Водночас ідентифікується розширення навколоядерного простору, розширення каналців і цистерн ендоплазматичної сітки та вакуолізація мітохондрій (рис. 8 в). Вакуолі часто розташовуються у вигляді кільця навколо ядра (рис. 8 г). Останнє пояснює локалізацію просвітлених ділянок цитоплазми на гістологічних препаратах. Рідина нагромад-

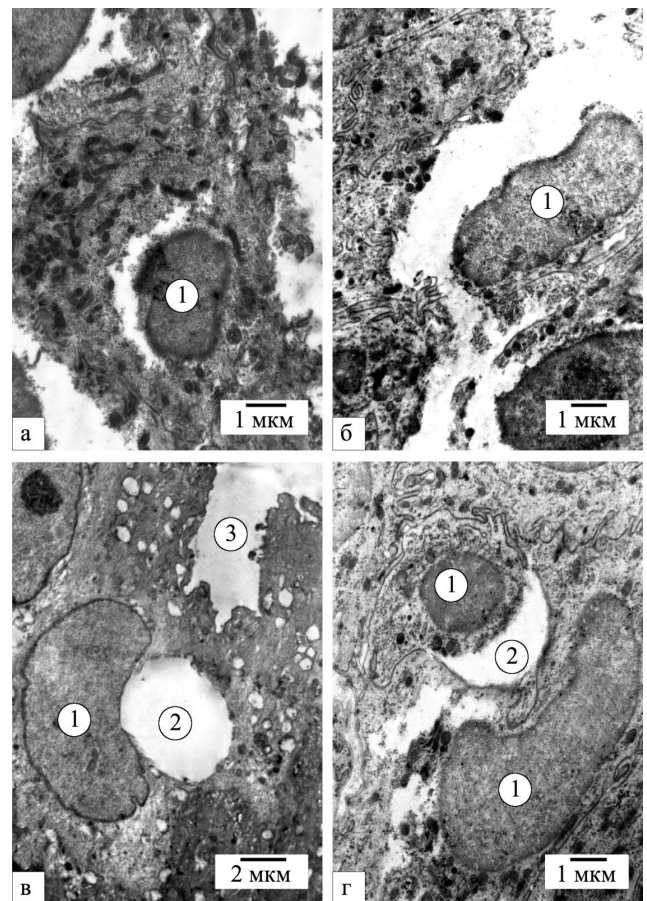


Рис. 5. Тотальна десквамація клітин уротелію на 42-у (а) та 56-у (б) доби дослід. Балонна дистрофія парасолькових (в) і базальних (г) клітин на 56-у добу розвитку цукрового діабету. Збільшення: $\times 6400$ (а, б, г); $\times 4000$ (в). 1 – ядра уротеліоцитів; 2 – балони, які стискають ядра; 3 – ділянка руйнування верхівкового полюса парасолькової клітини

жується також у фаголізосомах, в яких активуються гідролітичні ферменти, які розривають молекулярні зв'язки біополімерів із приєднанням молекули води. У таких вакуолях можна спостерігати нерозщеплені залишки різної величини і щільності (рис. 8 б, г).

Ряд авторів указують, що після пошкодження уротеліаль-

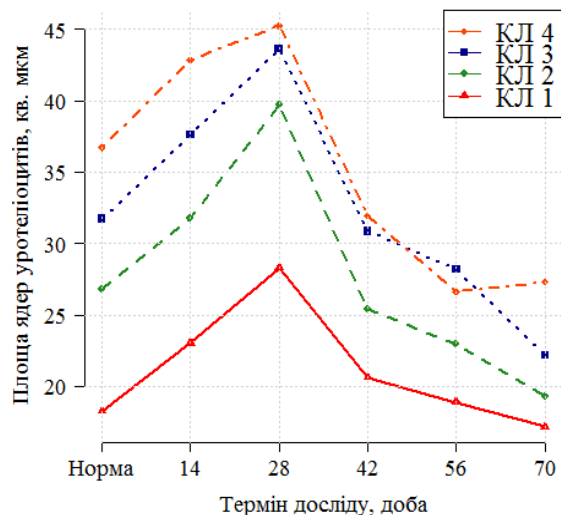
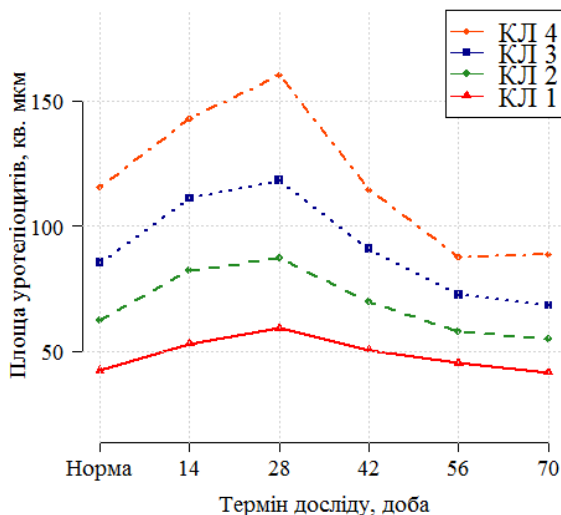


Рис. 6. Зміна площі уротеліоцитів (А) та їхніх ядер (Б) у різних кластерах при стрептозотозинному діабеті

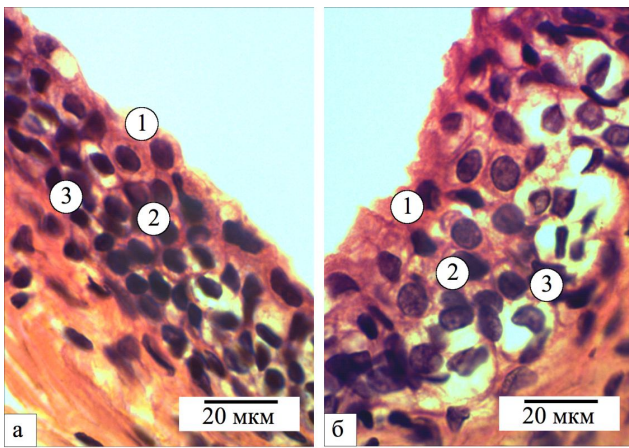


Рис. 7. Вакуольна дистрофія уротеліоцитів. Забарвлення: Н&Е. Збільшення: $\times 400$. Клітини поверхневого (1), проміжного (2) і базального (3) шарів ПЕ

ного бар'єру відбувається переміщення компонентів сечі, зокрема води, у глибші шари ПЕ СМ [17, 18]. Цьому в нашому досліді особливо сприяла десквамація уротелію, яка подекуди могла досягати БМ. Слід враховувати, що гіперглікемія спричиняє осмотичний діурез, який унаслідок зменшення реабсорбції води в проксимальних трубочках і петлі нефрона призводить на 14–28-у добу досліді до збільшення в 12,14–18,54 раза добового об'єму сечі, яка має низьку питому щільність. У транспорті води з такої сечі до уротеліоцитів можуть бути задіяні два механізми: пасивний – дифузія відповідно до концентраційного градієнта [27] і активний – за участю аквапоринів (AQPs) [22] і транспортерів сечовини (UTs), які модулюють розміри уротеліоцитів і осмолярність сечі [22, 31].

У наступні терміни спостереження клітини з вакуольною дистрофією трапляються все рідше і на 70-у добу практично не виявляються. На 42–56-у доби нерідко виявляються клітини, в яких відбулося злиття вакуоль у великі пухирі – балони, що стискають ядро та органели (див. рис. 5 в, г). Вважається, що така (балонна) дистрофія спричиняє розвиток фокального коліквацийного некрозу клітин [1].

Починаючи з 42-ї доби і до кінця досліді (див. рис. 6), відбувається прогресивне зменшення розмірів клітин ПЕ і їхніх ядер так, що на останній термін досліді середні площі уротеліоцитів КЛ 1, 2, 3 і 4 стають меншими в 1,07–1,24 раза, а їхні ядер – в 1,16–1,39 раза. Ці результати, що отримані за допомогою морфометричного і кластерного аналізів, мають також високий ступінь новизни, але вони, як і попередні, потребують визначення причин такої перебудови клітин ПЕ.

Було встановлено, що на 42–70-у доби розвитку СД наростає вміст уротеліоцитів, які виглядають дегідратованими (рис. 9). Їхній матрикс осміофільний із малим вмістом уротеліальних пухирців і редукованими цитоплазматичними органелами. На 56–70-у доби досліді поряд із такими клітинами визначаються поодинокі уротеліоцити з просвітленою цитоплазмою і вторинними лізосомами, які розпадаються, що вказує на переважання в цитоплазмі цих клітин процесів лізису. У ці терміни часто виявляються розриви сполучних комплексів, які ведуть до щільноподібних розширень між парасольковими клітинами (рис. 9 б).

На нашу думку, зменшення розмірів клітин ПЕ та

їхніх ядер і наростання вмісту дегідратованих уротеліоцитів спричинені глюкозурією, яка в ці терміни спостереження є найбільш вираженою: концентрація глюкози в сечі становить (21,26–21,67) ммол/л і є більшою за контроль у 22,61–22,81 раза. При цьому діурез діабетичних шурів у дані терміни, у порівнянні з 28-ю добою, зменшується в 1,74–1,76 раза. Власне зменшення діурезу при високій глюкозурії значно збільшує питому щільність сечі, осмотичний тиск якої стає вищим, ніж в уротеліоцитах, і вода за градієнтом концентрації виходить із клітин. Унаслідок цього розвивається дегідратація уротеліоцитів. Із літератури відомо, що при гіпертонічній сечі клітини ПЕ втрачають воду [15, 27]. До цього треба додати, що в період із 28-ї до 56-ї доби досліді десквамація уротеліоцитів СМ ще не вщухає і спостерігається руйнування багатьох сполучних комплексів між парасольковими клітинами, що сприяє переміщенню сечі високої питомої щільності по міжклітинних просторах в глибші шари ПЕ. На можливість за певних умов такого уротеліального парасолькового транспорту речовин, навіть без пошкодження уротеліального бар'єра, вказує N. Montalbetti et al. [26].

Найбільш доступним для наочного сприйняття результатів кластеризації за методом k-means, на нашу думку, є представлення їх в координатному полі у вигляді когнітивної

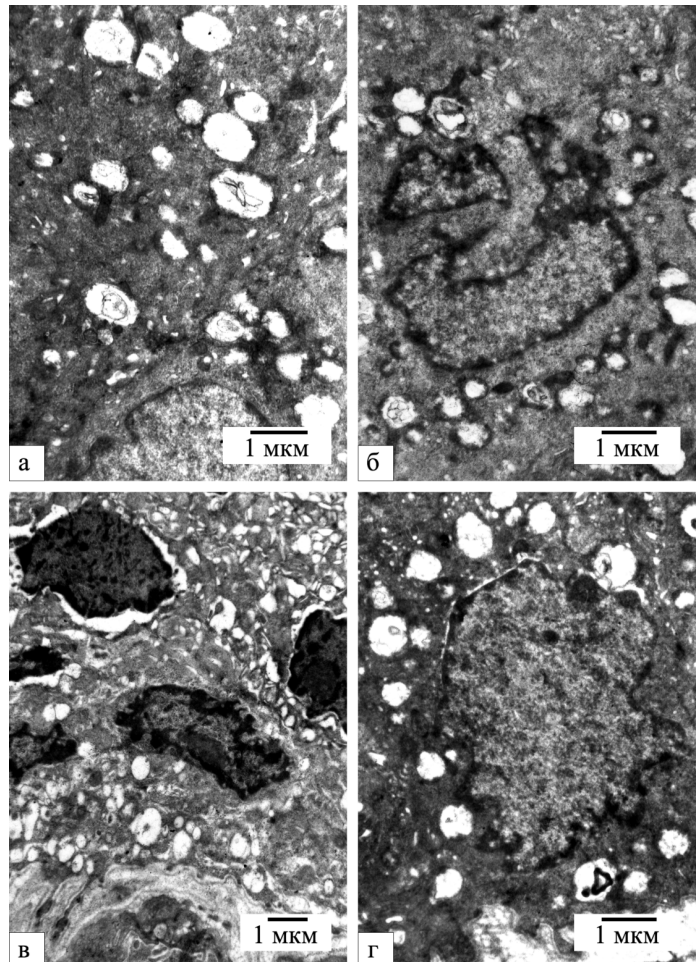


Рис. 8. Вакуольна дистрофія уротеліоцитів поверхневого (а), проміжного (б) і базального (в, г) шарів ПЕ СМ на 14-у (а, в) і 28-у (б, г) доби досліді. Набухання і вакуольна трансформація мітохондрій (а, г), наявність апоптотичних ядер (б), розширення каналців і цистерн ендоплазматичної сітки та вакуолізація мітохондрій з розширенням навколоядерного простору (в), розташування вакуоль у вигляді кільця навколо ядра (г). Збільшення: $\times 8000$ (а, б, г); $\times 6400$ (в)

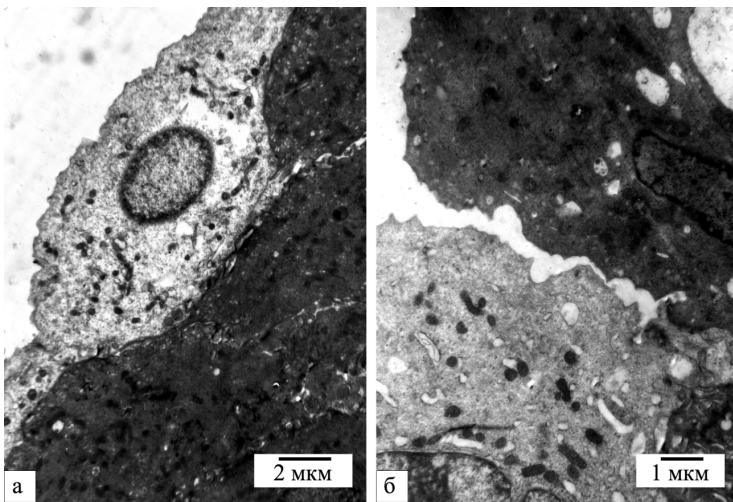


Рис. 9. Поодинокі просвітлені парасолькові клітини на тлі дегідратованих осміофільних клітин ПЕ СМ на 56-у (а) і 70-у (б) добу дослідю. Щілиноподібні розриви сполучних комплексів між парасольковими клітинами (б). Збільшення: $\times 4000$ (а); $\times 6400$ (б)

графіки (рис. 10). На рис. 10 подані кластерні структури клітин ПЕ СМ в нормі та в різні терміни розвитку СД на площині, де вісь абсцис – це площа уротеліоцитів, а вісь ординат – площа їхніх ядер. Уротеліоцити кожного кластеру позначені маркерами різного кольору: клітини КЛ 1, 2, 3 і 4, відповідно, – червоним, зеленим, синім і оранжевим кольорами. З рисунка наочно видно, що на 14-у добу розвитку СД відмічається значне розрідження елементів кластерної структури, особливо КЛ 4 і 3. З'являються численні викиди (значення, які різко відрізняються від більшості в групі досліджень). Ймовірно причиною цього є потужний позауротеліальний чинник, який значно розбалансовує систему клітинного складу ПЕ. На нашу думку, таким чинником є поліурія, яка виникає внаслідок осмотичного діурезу, що збільшує добовий діурез діабетичних щурів у 12,14 рази в порівнянні з нормою [10]. Унаслідок цього, гідростатичний тиск великого об'єму сечі і швидка наповнюваність СМ руйнують уротеліальний бар'єр, який утворений монопластом парасолькових клітин. Останнє стимулює проліферацію базальних уротеліоцитів [15, 17, 18, 21, 25, 27] і запускає каскад патоморфологічних змін.

На 28-у добу дослідю розрідженість елементів кластерної структури і викиди наростають, а лінія, на якій розміщені центри кластерів, вигинається (див. рис. 10). Ми вважаємо, що це зумовлено посиленням позауротеліального фактора (добовий діурез збільшується у 18,54 рази). До того ж з'являється новий фактор – ацидурія [10].

Починаючи з 42-ї доби перебігу СД, спостерігається зворотний процес – елементи кластерів групуються навколо своїх центрів (див. рис. 10), що вказує на зменшення впливу попереднього фактору (добовий діурез у діабетичних щурів, у порівнянні з 28-ю добою, зменшується в 1,45 рази). На 56-у добу дослідю внаслідок подальшого зменшення діурезу (в 2,07 рази) площа кластерної структури уротелію стає ще меншою. Важливим є те, що, у порівнянні з нормою, площа кластерних структур в ці два терміни помітно зменшується. До того ж, кластери зміщуються до центру координат, що вказує на зменшення площі уротеліоцитів та їхніх ядер. Така перебудова кластерних структур уротеліоцитів на 42–56-у добу дослідю свідчить, що з'явилися потужні впливи нового позасистемного фактору, а саме значної глюкозурії (концентрація глюкози в сечі, у порівнянні з 28-ю добою дослідю, у вказані терміни збільшується в 2,53–2,67 рази).

Тільки на 70-у добу розвитку СД (див. рис. 10), порівняно з попереднім терміном, площа кластерної структури клітин ПЕ СМ практично не змінюється, а лінія, на якій розміщені центри КЛ наближається до прямої і нагадує таку в нормі. У цілому кластерна структура клітинного складу уротелію в останній термін дослідю наводить на думку, що система клітинного складу ПЕ СМ пристосувалася до постійного впливу позауротеліальних (позасистемних) факторів, які були вказані вище.

Підсумовуючи вищесказане, можна стверджувати, що використання кластерного аналізу, як методу пізнання, дає можливість отримати нові результати, які в подальшому потребують обґрунтування/підтвердження, що можливе з використанням не тільки морфологічних методів (гістологічних, субмікроскопічних і морфометричних), але й інших методів дослідження (у першу чергу біохімічних, масометричних, дослідження водного балансу та інших – залежно від поставленої мети). Таким чином створюється великий масив числових даних, отриманих різ-

ними методами дослідження, що дозволяє здійснити комплексну оцінку отриманих патоморфологічних змін, які в морфології прийнято подавати в описовому форматі. При цьому, чим більший масив даних, тим більший об'єм описової інформації і тим важче її усвідомити. У таких випадках для представлення отриманих даних доцільно перетворити текстові описи на логістичні образи, тобто застосувати методи і прийоми когнітивної графіки та узагальнити результати у вигляді схем (рис. 11).

Рисунок 11 поєднує в собі представлення як біохімічних змін, так і морфологічних. До того ж, за допомогою стрілок відображено зв'язок між ними, що дозволяє без числового аналізу значного об'єму первинних даних визначити пріоритетні напрямки розвитку патоморфологічних процесів. Слід зазначити, що зміни визначальних біохімічних показників (гіперглікемія, глюкозурія) та діурезу наведено порівняно з контролем, що нівелює індивідуальну мінливість та вкотре сприяє об'єктивізації отриманих даних. Дані щодо морфологічних та метричних змін популяції уротеліоцитів подано у вигляді узагальнюючих тез, що дозволяє швидко проаналізувати каскад патоморфологічних змін. При цьому, виокремлення термінів спостереження сприяє розумінню етапності перебудови уротеліального складу ПЕ СМ залежно від тривалості впливу тих чи інших чинників.

З рис. 11 наочно видно, що весь каскад змін запускає гіперглікемія, яка визначається вже з першого терміну спостереження, до 42-ї доби дослідю – наростає, а в останні два терміни – залишається стабільно високою. Гіперглікемія є причиною осмотичного діурезу, який збільшує, у порівнянні з контролем, добовий об'єм сечі в 12,4–18,54 рази в перші два терміни. При цьому концентрація глюкози в сечі збільшується всього в 2,47–4,08 рази. Внаслідок значного збільшення діурезу і незначної глюкозурії сеча стає низької питомої щільності.

Великий об'єм сечі на 14–28-у добу дослідю спричиняє наростаючу десквамацію і щілиноподібні розриви парасолькових клітин та перебудову кластерних структур уротелію, а сеча низької питомої щільності на тлі значно збільшеного діурезу поступає в уротеліоцити, що веде до розвитку наростаючої їхньої вакуольної дистрофії і збільшення розмірів клітин ПЕ та їхніх ядер. Виявлені нами морфологічні прояви реологічних порушень крові у вигляді складів у венулах, інтерстиційні набряки, дистрофічні зміни ендотеліоцитів та

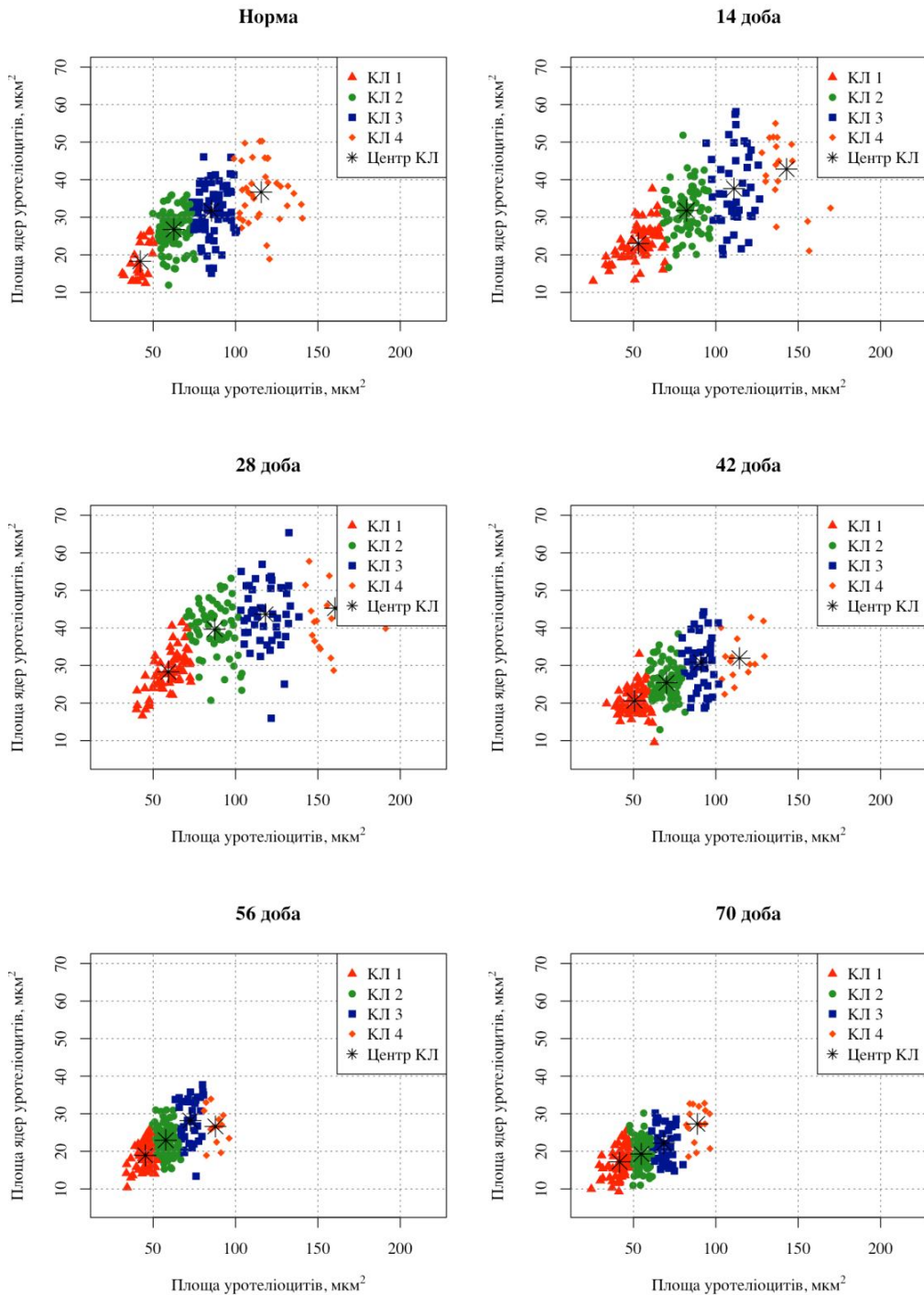


Рис. 10. Кластерні структури клітин перехідного епітелію в координатному полі в нормі та в різні терміни розвитку стрептозототинового діабету

незначні порушення структури базальної мембрани [12] у ці терміни суттєво не впливають на патоморфологічні зміни клітин уротелію.

На 42–56-у доби експерименту вплив діурезу (рис. 11) збільшується, що спричиняє десквамацію клітин проміжного і базального шарів уротелію, розриви сполучних комплексів, розширення міжклітинних просторів, злиття дрібних вакуоль у балони. У ці терміни дослідження висока глюкозурія і зменшення діурезу значно збільшують питому щільність сечі, яка спричиняє дегідратацію уротеліоцитів, що ультраструктурно проявляється ущільненням їхньої цитоплазми і морфометрично підтверджується зменшенням розмірів клітин та їхніх ядер та збільшенням кількості уротеліоцитів з

цитоплазмою підвищеної електронної щільності. Ці процеси нарастають до 70-ї доби дослідження, що пов'язано зі збільшенням тривалості впливу на уротелій глюкозурії. Цьому сприяє [12] також виражена діабетична мікроангіопатія, яка морфологічно проявляється генералізацією сладж-синдрому, вираженими дистрофічними та деструктивними змінами ендотеліоцитів, значними порушеннями структури базальної мембрани капілярів та наростанням плазматичного просякання периваскулярної сполучної тканини.

Слід відмітити, що в доступній літературі можна знайти багато прикладів використання когнітивної графіки для образного сприйняття результатів різних спостережень. Водночас треба констатувати, що побудова когнітивного

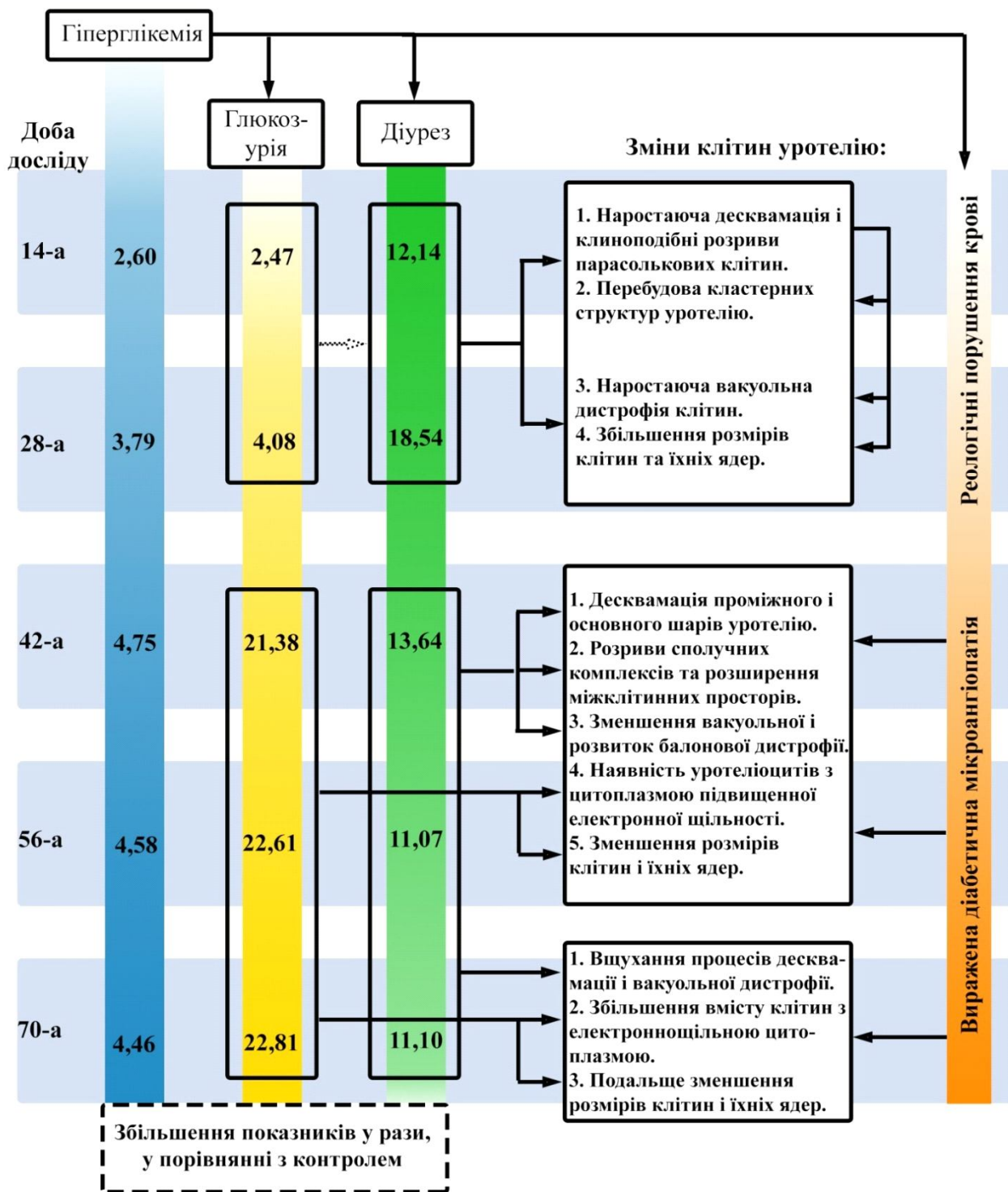


Рис. 11. Морфофункціональні зміни уротеліоцитів у ході розвитку стрептозотоцинової гіперглікемії

графіку на основі кластерного аналізу досліджуваних показників при будь-якій експериментальній чи клінічній патології дає можливість отримати нове бачення розвитку тих чи інших процесів.

Висновки

1. Застосування кластерного аналізу, який можна використати для класифікації об'єктів за двома і більшою кількістю метричних ознак, при дослідженні будь-яких патологічних процесів дає перспективу отримання нових результатів, що розкриватимуть об'єктивно існуючі зв'язки між

предметами та явищами без застосування складних, трудомістких і вартісних методик.

2. Об'єктивно охарактеризувати отримані кластерні структури в патології можна тільки порівняно з кластерними структурами, здобутими в нормі, які визначені згідно з поставленою метою за добре продуманими і статистично обґрунтованими алгоритмами дослідження.

3. Оцінка перебудови структур кластерів є непростим завданням і вимагає, окрім морфологічних і морфометричних, використання також й інших методів дослідження, як це було показано на прикладі експериментальної діабетичної мікроангіопатії.

тичної цистопатії. Останнє, у свою чергу, призводить до значного зростання масиву отриманих даних, узагальнення якого дозволяє здійснити комплексну оцінку патологічних процесів та визначити пріоритетні напрямки розвитку структурних, біохімічних та функціональних змін.

Перспектива подальших досліджень

Доцільним є проведення кластерного аналізу клітин епітеліальних пластів, які мають високу здатність до фізіологічної та репаративної регенерації на тлі інших експериментальних патологій.

Література

1. Авцын А. П. Ультраструктурные основы патологии клетки / А. П. Авцын, В. А. Шахламов. – М. : Медицина, 1979. – 320 с.
2. Биосинтетические реакции и ультраструктура уротелиоцитов при хроническом цистите и цистопатиях / Л. М. Непомнящих, С. В. Айдагулова, О. И. Иванинский [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 9. – С. 349 – 355.
3. Біохімічні показники в нормі і при патології: навч. довідник / [Д. П. Бойків, Т. І. Боднарчук, О. Л. Іванків [та ін.]; за ред. О.Я. Склярова. – К.: Медицина, 2007. – 320 с.
4. Досвід використання кластерного аналізу в морфологічних дослідженнях / О. М. Юрах, О. Г. Попадинець, О.Я. Жураківська [та ін.] // Актуальні питання медичної науки : [зб. наук. праць]. – Запоріжжя: ДЗ «ЗМАПО МОЗ України», 2015. – В. 82. – Т. 2. – К. 2. – С. 98 – 107.
5. Непомнящих Л. М. Ремоделированное мышечной оболочки (детрузора) гиперактивного мочевого пузыря при гиперплазии предстательной железы / Л. М. Непомнящих, Е. Л. Лушникова, А. И. Неймарк // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 5. – С. 742 – 747.
6. Нові підходи щодо отримання наукової новизни при морфологічних дослідженнях перехідного епітелію сечового міхура / [О. Г. Попадинець, О. М. Юрах, Н. С. Токарук та ін.] // Галицький лікарський вісник. – 2017. – Т. 24, № 2. – С. 37 – 47.
7. Патент на корисну модель № 97771 Україна, МПК А 61 В 5/20. Метаболічна камера для забору сечі дрібних тварин / Токарук Н. С., Котик Т. Л., Юрах О. М., [та ін.]; власники Токарук Н. С., Котик Т. Л., Юрах О. М., [та ін.]. – № u 201408798; под. 04.08.2014; публік. 10.04.2015, Бюл. № 7.
8. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перова. – Москва: Медицина, 1996. – 544 с.
9. Стереотипные варианты структурной модификации уротелия при различных патологических процессах в мочевом пузыре и предстательной железе / Г. И. Непомнящих, С. В. Айдагулова, Д. Л. Непомнящих [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 10. – С. 395 – 399.
10. Токарук Н. С. Динаміка морфофункціональних змін сечового міхура щура за умов експериментального цукрового діабету / Н. С. Токарук // Галицький лікарський вісник. – 2015. – Т. 22, № 3, ч. 2. – С. 95-99.
11. Токарук Н. С. Морфологічне обґрунтування результатів кластерного аналізу перехідного епітелію сечового міхура щура при цукровому діабеті / Н. С. Токарук // Актуальні питання медичної науки та практики. – 2015. – № 82, Т. 2, кн. 2. – С. 480 – 488.
12. Токарук Н. С. Характеристика гемосудин сечового міхура щурів при цукровому діабеті / Н. С. Токарук // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2016. – Т. 16, № 1. – С. 249-255.
13. Токарук Н. С. Характеристика перехідного епітелію сечового міхура щурів у нормі за результатами морфометричного та кластерного аналізів // Світ медицини та біології. –

2015. – Т. 48, № 1. – С. 163 – 166.

14. Abbas O. Comparisons between data clustering algorithms / O. Abbas // Int. Arab J. Inf. Technol. – 2008. – Vol. 5, № 3. – P. 320 – 325.
15. Apodaca G. The uroepithelium: not just a passive barrier / G. Apodaca // Traffic. – 2004. – № 3. – P. 117 – 128.
16. Bakhshi M. Review and comparison between clustering algorithms with duplicate entities detection purpose / M. Bakhshi, M. Feizi-Derakhshi, E. Zafarani // Int. J. Comp. Sci. Emerging Tech. – 2012. – No. 3. – P. 108 – 114.
17. Birder L. Urothelial signaling / L. Birder, K.-E. Andersson // Physiol Rev. – 2013. – № 93. – P. 653 – 680.
18. Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells / J. Lavelle, S. Meyers, R. Ramage [et al.] // Am J Physiol Renal Physiol. – 2002. – № 283 (2). – P. 242 – 253.
19. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes / P. Haldar, I. D. Pavord, D. E. Shaw [et al.] // Am. J. Resp. Crit. Care Med. – 2008. – Vol. 178, № 3. – P. 218 – 224.
20. Collins T. ImageJ for microscopy / T. Collins // BioTechniques. – 2007. – Vol. 43, № S1. – P. S25 – S30.
21. Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage / M. E. Kreft, R. Romih, M. Kreft [et al.] // Differentiation. – 2009. – № 77. – P. 48 – 59.
22. Expression, localization, and regulation of aquaporin-1 to -3 in rat urothelia / D. A. Spector, J. B. Wade, R. Dillow [et al.] // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2002. – № 282. – P. 1034 – 1042.
23. Hurst R. E. Bladder defense molecules, urothelial differentiation, urinary biomarkers, and interstitial cystitis / R. E. Hurst, R. M. Moldwin, S. G. Mulholland // Urology. – 2007. – № 69. – P. 17 – 23.
24. Ibrahim S. H. Evaluation of time-dependent structural changes of rat urinary bladder in experimentally-induced diabetes mellitus light and electron microscopic study / S. H. Ibrahim // Egypt. J. Urol. – 2007. – № 30. – P. 367 – 382.
25. Impact of diabetes mellitus on bladder uroepithelial cells / A. T. Hanna-Mitchell, G. W. Ruiz, F. Danechgarri [et al.] // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2013. – Vol. 304, № 2. – P. 84 – 93.
26. Increased urothelial paracellular transport promotes cystitis / N. Montalbetti, A. C. Rued, D. R. Clayton [et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Physiol. – 2015. – Vol. 309, № 12. – F. 1070 – 1081.
27. Khandelwal P. Cell biology and physiology of the uroepithelium / P. Khandelwal, S. N. Abraham, G. Apodaca // Am J Physiol Renal Physiol. – 2009. – Vol. 297, № 6. – P. 1477 – 1501.
28. Rapid differentiation of superficial urothelial cells after chitosan-induced desquamation / P. Veranic, A. Erman, M. Kerec-Kos [et al.] // Histochem Cell Biol. – 2008. – № 131. – P. 129-139.
29. R Core Team R: a language and environment for statistical computing / R Core Team. — Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing, 2015.
30. 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.
31. Spector D. A. High urea and creatinine concentrations and urea transporter b in mammalian urinary tract tissues / D. A. Spector, Q. Yang, J. B. Wade // Am. J. Physiol. Renal Physiol. “ 2007. “ Vol. 292, № 1. - P. 467 – 474.
32. Tokaruk N. Changes in morphometric parameters and cluster structure of the bladder urothelial cells on the 28th day of experimental diabetes / N. S. Tokaruk, O. Balashchuk // Information Booklet of XIII International Congress of Medical Sciences (Sofia, 8-11 May 2014). – Sofia, 2014. – P. 31.

Надійшла: 27.11.2017

Завершено рецензування: 28.12.2017

Прийнята до друку: 28.12.2017