

**КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ КАК МЕТОД
КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ В
СРАВНИТЕЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ
ВЛИЯНИЯ СТАТИЧЕСКОЙ И
ДИНАМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА
СОСУДИСТО-ПАРЕНХИМАТОЗНЫЕ
ОТНОШЕНИЯ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ**

Криштоп В.В.

ГОУ ВПО ИВГМА МЗ РФ,

Иваново

При оценке влияния на изучаемый объект двух и более экзогенных факторов перед исследователем встает задача определить общие тенденции и характерные для каждого из факторов в отдельности особенности. При этом встает задача комплексного учета большого числа количественных показателей, выраженных в разных единицах измерения. Одним из возможных путей является применение кластерного анализа, позволяющего путем нормирования данных нивелировать их размерность.

Эксперимент проводился в осенне-зимний период. Работа выполнена на половозрелых белых нелинейных крысах – самцах массой 210-230 г. Забор материала проводился через 1,5 часа и на, 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 20-е, 30-е, 40-е сутки эксперимента. Для моделирования статической нагрузки крысы были подвергнуты ежедневной 1,5-часовой нагрузке в виде вынужденного пребывания в вертикальном положении на шесте, проходящем через сетку, на которую подается напряжение 20 В. Для моделирования динамической нагрузки крысы были подвергнуты ежедневному 1,5-часовому плаванью. Животные забивались передозировкой 0,1% раствора нембутала.

Исследование показало, что при влиянии динамической нагрузки на 1,5 часа и 1 сутки отчетливых изменений со стороны тиреоидного эпителия фолликулов щитовидной железы и гемомикроциркуляторного русла не отмечается. На 3 сутки нагрузки активность тироцитов нарастает, о чем свидетельствует увеличение средней высоты тироцитов, фолликулярно-коллоидного индекса, и стереологического индекса резорбции, а также вакуолизация цитоплазмы тироцитов и изрезанность их апикальной поверхности. Все эти количественные и качественные признаки достигают своей максимальной выраженности на 5-е сутки влияния динамической нагрузки. В последствии на 7-е и 10-е сутки происходит снижение активности тиреоидного эпителия. В последующем на 20-е, 30-е, и 40-е сутки динамической нагрузки отмечается рост активности тироцитов. Следует отметить, что рост и снижение активности тиреоидного эпителия при динамической нагрузке происходили, сочетано с изменениями со стороны гемомикроциркуляторного русла. Пики активности тиреоидного эпителия всегда сопровождалось увеличением удельной доли перифолликулярных гемокапилляров.

При влиянии статической нагрузки повышение активности тиреоидного эпителия возникало уже через 1,5 часа после начала влияния фактора, то есть сразу после окончания 1,5 часовой статической нагрузки. Это сопровождалось увеличением удельной доли перифолликулярных гемокапилляров и развити-

ем венозной гиперемии. Рост активности тироцитов продолжался на 1-е сутки и достигал своего пика на 3-е сутки статической нагрузки. На 5-е сутки статической нагрузки изменений со стороны активности тиреоидного эпителия не происходило – образовывалось плато. Все это сопровождалось развитием венозной гиперемии, плазморрагиями и десквамацией тироцитов в просвет фолликула. В последствии на 7-е и 10-е сутки происходит снижение активности тиреоидного эпителия. На 20-е сутки статической нагрузки вновь отмечается рост активности тироцитов. На 30-е сутки статической нагрузки их активность несколько снижается, возникает отек соединительно-тканного прослоек. На 40-е сутки статической нагрузки фолликулы щитовидной железы визуальны и статистически приближаются к интактным, однако, в щитовидной железе отмечаются локусы, где эритроциты находятся за пределами сосудистого русла: в междольковой соединительной ткани и в просвете фолликулов.

Таким образом, морфологическая картина при влиянии этих факторов достаточно разнообразна. Чтобы выделить общие закономерности был проведен кластерный анализ, в котором были использованы все сроки динамической, статической нагрузки и контроль. Ввиду того, что целью данного анализа явилось не выделение этапов адаптации ЩЖ, а определение сроков и групп сроков, которые могут характеризоваться как похожие, объединенные в один кластер нами было принято решение о проведении кластерного анализа сразу по всем первичным изучаемым признакам. На этом основании «похожести» сроков и их групп можно сделать вывод об общих чертах влияния статической и динамической нагрузки или, наоборот, об их особенностях.

В каждой исследуемой группе при окраске гематоксилин – эозином на 50 фолликулах в центре и на 50 фолликулах на периферии органа при помощи морфометрических методов определялись следующие абсолютные площади: площадь фолликула, площадь оптически не прозрачной части коллоида, площадь оптически прозрачной части коллоида, количество пересечений внутренней поверхности коллоида с линиями тест - сетки, также определялось количество тироцитов в одном фолликуле путем подсчета их ядер и их высота. Абсолютная площадь эпителия определялась для каждого фолликула в отдельности путем нахождения разницы между площадью фолликула и суммой площади оптически не прозрачного коллоида и оптически прозрачного коллоида. Также в 50 полях зрения центре и в 50 полях зрения на периферии при помощи стереологических методов определялись следующие удельные площади: площадь перифолликулярных гемокапилляров, площадь занимаемая сосудами (артериями, артериолами, венами и венами), площадь соединительно-тканного компонента. Кластерный анализ проводился в соответствии с предложением нами рационализаторским предложением (авторское рационализаторское предложение №2337 от 6 ноября 2002 года «Способ использования кластерного анализа для изучения функции щитовидной железы». Авторы: Криштоп В.В., Полянская Л.И., Романов В.А., выданным 26 ноября 2002 года ИВГМА).

В данной работе был выбран следующий вариант нормировки: $Z=(x-\text{хсреднее})/\sigma$. Где σ - среднее квадратичное отклонение, x - исходное значение параметра, хсреднее - среднее значение очередного параметра, Z - нормированное значение. В качестве рабочего пространства использовалось Евклидово пространство как наиболее распространенной и интуитивно понятное. Как метод объединения точек - объектов в группы - кластеры на основе матрицы расстояний был использован метод Варда. Этот метод отличается от всех других методов, поскольку он использует методы дисперсионного анализа для оценки расстояний между кластерами. Метод минимизирует сумму квадратов для любых двух (гипотетических) кластеров, которые могут быть сформированы на каждом шаге.

Таким образом, кластерный анализ проводился в 20-ти мерном евклидовом пространстве методом Варда, при помощи пакета программ Statistica 6.0. В результате были получены следующие данные:

1-й кластер образован контролем, 1,5 часами, 3-ми, 7-ми сутками статической нагрузки. 2-й кластер состоит из двух близко расположенных групп: первая - 10-е сутки статической и динамической нагрузки, вторая - 1,5 часа и 1-е сутки динамической нагрузки. 3-й кластер состоит из сроков статической нагрузки. Это: 1-е, 5-е, 20-е, 30-е, 40-е сутки. 4-й кластер состоит из сроков динамической нагрузки. Это: 3-и, 5-е, 20-е, 30-е, 40-е сутки. 5-й кластер состоит из 5-х и 40-х суток динамической нагрузки - двух пиков активности.

Из этого на наш взгляд надо сделать следующие выводы:

1. 10-е сутки - единственный срок, когда влияние статической и динамической нагрузки однотипно, что, на наш взгляд, вызвано общими особенностями в адаптации к физической нагрузке независимо от ее характера, выражающимися в наличии двух фаз повышения активности, разделенных периодом гиподинамии - 10 ми сутками.

2. Во всех других отношениях во влиянии статической и динамической нагрузки на сосудисто-паренхиматозные отношения в щитовидной железе выявлены отличия.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ (НК), У МЫШЕЙ С ОПУХОЛЕВЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ПЕЧЕНИ

Кузовлев¹ Е.Н., Лебединская² О.В.,
Ахматова³ Н.К., Доненко¹ Ф.В., Шубина¹ И.Ж.,
Макашин³ А.И., Киселевский¹ М.В., Семенов³ Б.Ф.

¹ГУ Российский научный онкологический центр
им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

²ГОУ ВПО «Пермская государственная
медицинская академия МЗ РФ»

³ГУ НИИ Вакцин и сывороток им.
И.И. Мечникова РАМН, Москва

Введение. Печень является одним из основных мест метастазирования при росте опухолей различной локализации. Примерно у 20% пациентов после хирургического лечения по поводу колоректального рака обнаруживаются метастазы в печени, которые

часто являются причиной смерти больных в результате развивающейся печеночной недостаточности. В последние годы появились экспериментальные исследования, позволившие выделить особую субпопуляцию лимфоцитов - так называемые печень - ассоциированные натуральные киллеры (НК). По своему иммунофенотипу они были отнесены к НКТ-клеткам, так как на их мембране экспрессируются маркеры Т-клеток и НК. По мнению авторов, НКТ обладают антиметастатической активностью, а их активация может существенно усиливать цитотоксический потенциал данной разновидности НК. В частности, было показано, что производные липополисахаридов (ЛПС) при системном введении вызывают у мышей регрессию метастазов в печени. Рассматриваемый антиметастатический эффект связывался с активацией НК печени посредством увеличения секреции ИЛ-12, стимулированными ЛПС дендритными клетками печени.

Цель работы - изучение НК-активности и цитотоксических свойств печень-ассоциированных лимфоцитов у мышей с имплантированной опухолью раковых яичников СаО-1.

Цитотоксический тест. Цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) определяли на НК-зависимой линии клеток мышинной лимфомы YAC-1 и аутологичных опухолевых клетках в тесте восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-тест). Опухолевые клетки (3×10^4 в 1 мл) инкубировали в культуральной среде с МНЛ в соотношении 1:5 в плоскодонных 96-луночных микропланшетах (фирма Costar, Франция) 18 часов при 37°C и 4,5 % CO₂. Затем в лунки добавляли витальный краситель МТТ (фирма Sigma, США). Результат оценивали спектрофотометрически по оптической плотности, измеряемой при длине волны 540 нм на мультискане MS (фирма Labsystem, Финляндия) и рассчитывали процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности).

Результаты и обсуждение. На 14 сутки после имплантации опухолевых клеток в печени обнаруживались опухолевые узлы овальной формы от 3 до 15 мм в диаметре, прорастающие окружающие ткани.

Как следует из полученных данных, МНЛ, выделенные из пораженной опухолью печени, обладали высокой спонтанной НК-активностью и почти в 2 раза превосходили киллерные свойства лимфоцитов селезенки. МНЛ печени характеризовались также способностью эффективно лизировать аутологичные опухолевые клетки, в отличие от МНЛ селезенки (цитотоксичность рассматриваемых клеток-эффекторов составляла 43% и 18% соответственно).

Из интактной печени у мышей контрольной группы не удалось выделить значимого количества лимфоцитов, необходимого для проведения цитотоксического теста.

Следовательно, образование опухолевого узла в печени у мышей вызывает инфильтрацию паренхимы МНЛ. Они обладают не только значительным уровнем спонтанной НК-активности при испытании на НК-чувствительной линии YAC-1, но и более высоким цитотоксическим потенциалом по отношению к аутологичным опухолевым клеткам, чем лимфоциты селезенки. Данные клетки практически не обнаружи-