

І.С.Волошина

ДЗ «Луганський державний медичний університет»

Ключові слова: сім'яні пухирці, геометрична морфометрія, щур.

Надійшла: 05.01.2014

Прийнята: 23.02.2014

УДК 611.636:57.044:51.76

ОЦІНКА МЕТОДАМИ ГЕОМЕТРИЧНОЇ МОРФОМЕТРІЇ МОРФОЛОГІЧНОЇ МІНЛИВОСТІ СІМ'ЯНИХ ПУХИРЦІВ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Морфогенез органів ендокринної, імунної та кісткової систем під хронічним впливом летучих компонентів епоксидних смол» (номер державної реєстрації 0109U004615).

Реферат. Метою дослідження було встановити морфологічну мінливість сім'яних пухирців статевозрілих щурів у віддалені терміни після інгаляційного впливу толуолу з використанням методів геометричної морфометрії. В ході проведеного дослідження було створено графічне зображення аналізу головних компонент усіх конфігурацій сім'яних пухирців щурів контрольної та експериментальної серій, дендрограми розподілу форм сім'яного пухирця та виділено кластери форми сім'яних пухирців контрольної та експериментальної серій.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 1. – С. 21-25.

© І.С.Волошина, 2014

✉ is_voloshina@mail.ru

Voloshina I.S. The assessment of morphological variability of the seminal vesicles of adult rats with the help of a geometrical morphometry methods.

ABSTRACT. Background. The shape and the size are important basic characteristics of organs. Recently among other morphological methods a new approach of investigations of variety of shapes of morphological objects - geometric morphometry becomes more popular. This is a unique analytical tool that allows evaluating a variety of forms completely eliminating the influence of the size factor. With the help of tpsUtil utility we obtained files of photos of seminal vesicles with the extension .tps. Homologous tags-landmarks of total number 12 were positioned on the longitudinal axis of the body using screen digitizer tpsDig2. Marks were placed twice to obtain the scale of possible bias of intergroup morphological differences. The cluster analysis of the shape of seminal vesicles was made with the help of PAST program. **Objective.** The aim of this study was to determine the morphological variability of a seminal vesicles of adult rats in a late periods after inhalation exposure of toluene by using the methods of geometric morphometry. **Methods.** Sixty male laboratory albino rats were obtained from Lugansk State Medical University Laboratories (Lugansk, Ukraine). When received, the subjects were 12 months of age and weighed 130-150 g. The test animals were exposed to target concentrations of 0 (air control) and 500 mg/m³ of toluene air for 5 hours/day, 5 days/week, for 2 month. **Results.** In our investigation the graphic images of analysis of a principal components of all the configurations of rat seminal vesicles in control and experimental series were created together with a dendrograms of seminal vesicle shapes distribution. **Conclusions.** Under inhalation exposure of toluene on adult rats there were obtained 5 clusters of seminal vesicles shapes, characterized by the change in a body of organ, different correlations "body-hook" and varying degrees of severity of the hook of seminal vesicle.

Key words: seminal vesicles, geometric morphometry, rat.

Citation:

Voloshina IS. [The assessment of morphological variability of the seminal vesicles of adult rats with the help of a geometrical morphometry methods]. *Morphologia*. 2014;8(1):21-5. Ukrainian.

Вступ

У даний час вивчення інформаційно-значимих показників форми органів тварин і рослинних об'єктів займає важливе місце в екологічному моніторингу природних біотопів. Областю застосування геометричної морфометрії є різноманітність конфігурацій морфологічних об'єктів. Цей показник може бути: невизначеною індивідуальною мінливістю; відмінностями між статями, біоморфами або іншими дискретними групами; онтогенетичними або філогенетичними ря-

дами [1]. Базовими характеристиками органів є їх форма і розмір. Останнім часом в морфології активно розвивається новий підхід до вивчення різноманітності форми морфологічних об'єктів – геометрична морфометрія [2; 3], що представляє собою особливий аналітичний інструмент, який дозволяє оцінювати різноманітність форми, повністю виключаючи вплив розмірного фактора [4]. Можливість кількісного порівняння об'єктів за їх формою незалежно від розмірів досягається насамперед нетривіальністю способу опису фор-

ми за допомогою точок координат замість відстаней між ними [5]. В основі даного підходу лежить концепція багатовимірного простору форм, всіма якого є змінні форми. Кожен окремих об'єкт (окрема форма) представляється як точка цього простору [6].

Геометрична морфометрія являє собою сукупність методів алгебри багатовимірного аналізу координат міток, що в сукупності описують конфігурацію морфологічних об'єктів. Основними завданнями геометричної морфометрії в морфологічних дослідженнях є об'єктивізація оцінки форми органів і розробка методів, які виявляють відмінності між цими формами [7].

Значний інтерес серед науковців викликають зміни структури органів репродуктивної системи у відповідь на вплив різних екзогенних факторів. Одним з таких факторів є толуол, що широко використовується у якості промислового розчинника. Толуол застосовується на виробництві епоксидних смол і може стати джерелом надходження у навколишнє середовище з готової продукції. Він також є складовою частиною бензину для збільшення октанового числа, використовується при виробництві бензолу та як розчинник фарб.

Мета

Мета дослідження полягає у встановленні морфологічної мінливості сім'яних пухирців статевозрілих щурів у віддалені терміни після інгаляційного впливу толуолу з використанням методів геометричної морфометрії.

Матеріали та методи

Експериментальне дослідження виконано на 60 білих щурах-самцях, які були введені в експеримент у віці 12-ти тижнів та початкова маса яких становила 130-150 г. Тварини були отримані з віварію ДЗ «Луганський державний медичний університет». Утримання та маніпуляції над тваринами виконувались відповідно до основних етичних принципів у сфері біоетики, що викладені у положенні «Общих этических принципов экспериментов на животных», затверджених I Національним конгресом з біоетики [8], у «Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей», що була ратифікована у 1985 році у Страсбурзі [9], згідно стандарту ідентичному міжнародному документу OECD Test № 421 «Reproduction / Developmental Toxicity Screening Test» (ОЕСР Тест № 421 «Скринінгове дослідження репродуктивної/ембріональної токсичності») [10] та вимогам Міжнародного комітету з лабораторних тварин, Міжнародної федерації з захисту тварин та вітчимизаними інструктивними документами [11], а також відповідно до рекомендацій «Про правові, законодавчі та етичні норми і вимоги при виконанні наукових морфологічних досліджень [12].

Щури були розділені на контрольну та ек-

периментальну серії (серія II). Контрольну серію (К) склали інтактні щури. Серія II була представлена щурами, які зазнавали інгаляційного впливу толуолу у концентрації 500 мг/м³ протягом 60 днів, 5 днів на тиждень, 5 годин на добу. Такі умови створювалися за допомогою спеціальної установки, яка складається з затравочної камери(1), камери, у якій створювалася необхідна концентрація діючої речовини(2), датчика толуолу(3) та допоміжного оснащення(4). Кожна серія тварин була розділена на п'ять груп (по 6 щурів в кожній) у відповідності з терміном виведення тварин з експерименту на 1, 7, 15, 30 та 60 доби після припинення впливу толуолу.

Після закінчення досліду тварин зважували на лабораторних вагах та виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом, дотримуючись «Методичних рекомендацій з виведення лабораторних тварин з експерименту». Органи вилучали єдиним комплексом з навколишньою жировою тканиною і ретельно препарували та фотографували.

За допомогою утиліти tpsUtil отримували файли існуючих фотознімків сім'яних пухирців з розширенням *.tps. Гомологічні мітки-лендмарки загальною кількістю 12 на поздовжню вісь органу виставляли за допомогою екранного дигітайзера tpsDig2. Кожній з точок давали пару значень x,y-координат в ортогональній системі осей. Для отримання масштабу можливого зміщення оцінок міжгрупових морфологічних розбіжностей, що зумовлені розстановкою гомологічних міток та процесом оцифрування зображень, розстановка міток проводилася двічі. Головною властивістю аналізу з використанням методу геометричної морфометрії є можливість кількісної оцінки розбіжностей у формі морфологічних об'єктів. Для проведення канонічного аналізу прокрустових координат та аналізу головних компонент використовували програму MorphoJ. Після Прокрустового накладення отримували форму, що базується на коваріаційному матриксі Прокрустових координат. Отримували значення суми квадратів відхилення міток від центроїду. Після цього визначали відсоток дисперсії, що пояснює варіабельність форми органу у кожній з головних компонент. Здійснювали кластерний аналіз форми сім'яних пухирців, що було реалізовано у програмі PAST.

Результати та їх обговорення

При дослідженні форм сім'яних пухирців щурів контрольної серії після Прокрустового накладення було отримано форму, що базується на коваріаційному матриксі Прокрустових координат. При цьому значення суми квадратів відхилення міток від центроїду склали 0,553. Перша головна компонента пояснює 46,12% дисперсії. Друга та третя компоненти відображають різні рівні, що разом пояснюють 41,57% дисперсії. Кожна з головних компонент після третьої демонструє менш,

ніж 5% загальної дисперсії (рівень, асоційований з шумовими векторами). Близько 96,5% дисперсії акумулюється на шостій головній компоненті. У той час, як перший вектор, пояснюючи значну частку дисперсії, показує велику статистичну стабільність, наступні вісі - градієнт, який асоційований з менш стабільними компонентами.

Перша компонента залучає скорочення гачка сім'яного пухирця та зміщення верхівки останнього у бік переходу «тіло-гачок». Крім того, зміщення дистальної та проксимальної ділянок тіла у протилежних напрямках сприяють зменшенню кривизни поздовжньої вісі тіла сім'яного пухирця. Друга головна компонента залучає збільшення довжини гачка пухирця та відхилення його верхівки вбік від поздовжньої вісі. При цьому значних змін з боку форми тіла не спостерігається за винятком скорочення проксимальної частки останнього. Третя головна компонента залучає зменшення кривизни

вигину тіла сім'яного пухирця, що залежить від векторів, направлених із середньої ділянки тіла в бік гачка. До того ж сам гачок «наближається» до тіла, про що свідчать вектори, направлені в іншому напрямку. Наступна компонента характеризується відхиленням проксимальної ділянки тіла від гачка і, навпроти – зближенням дистальної ділянки тіла з гачком. Таким чином, поздовжня вісь тіла набуває S-подібної форми. Цікавим є форма сім'яного пухирця, яку пояснює п'ята компонента. Зміщення верхівки гачка в цьому випадку та переходу «тіло-гачок» в одному напрямку (в бік тіла) та направлення векторів міток середини гачка – зумовлює форму органу у вигляді незамкнутого кільця, яке утворене дистальною ділянкою тіла та гачком сім'яного пухирця. В результаті кластерного аналізу форм сім'яного пухирця щурів контрольної серії було виділено 3 кластери форм (рис. 1).

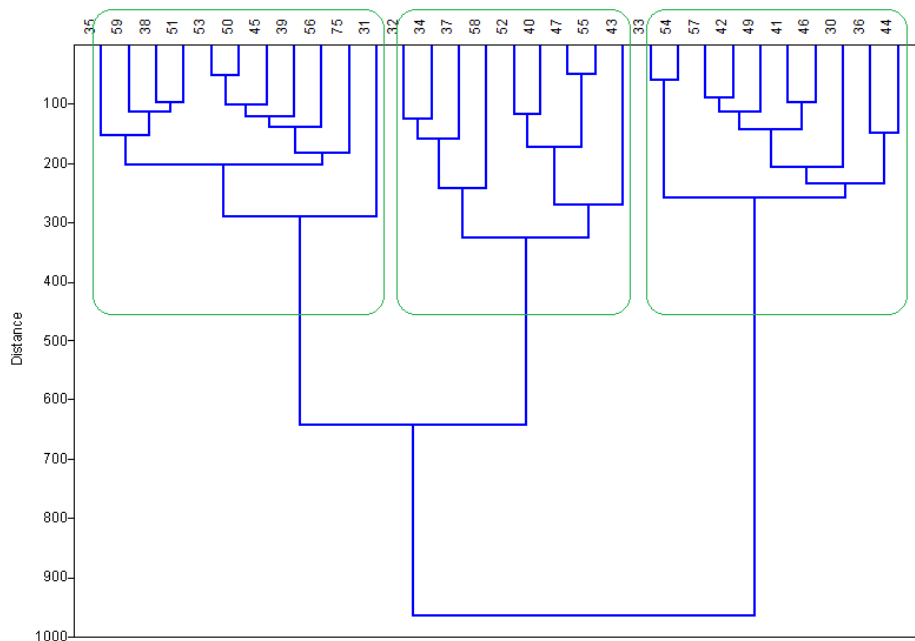


Рис. 1. Дендродіаграма розподілу форм сім'яного пухирця щурів контрольної серії. 3 кластери форми СП.

При дослідженні форм сім'яних пухирців щурів, які в експерименті зазнавали інгаляційного впливу толуолу багатомірний аналіз декартових координат міток, що були розміщені на поверхні сім'яних пухирців, у сукупності надали можливість отримати так званий еталонний об'єкт, конфігурація якого реалізує прокрустову метрику відповідного простору структур. Так, у щурів II серії Прокрустова сума квадратів відхилення міток від еталонного об'єкта склала 0,676, а відповідна тангенціальна сума – 0,649. Перша головна компонента, маючи власне значення 0,012, пояснює 53,02% дисперсії. Друга головна компонента виявилася на рівні 0,005, що демонструє 23,25% дисперсії. Відповідні значення для третьої головної компоненти

склали 0,003 та 11,48%. Таким чином, кумулятивне значення дисперсії зазначених вище трьох компонент склало 87,75%. Починаючи з четвертої головної компоненти кожна з них пояснює менш, ніж 5% загальної дисперсії. На дев'ятнадцятій компоненті кумулюється близько 99,99% дисперсії.

Перша головна компонента залучає незначні зміщення міток проксимальної та середньої частин тіла у протилежних напрямках, зменшуючи таким чином вигин тіла сім'яного пухирця. У той же час верхівка гачка відхиляється в бік, протилежний тілу. Друга головна компонента, як і перша, характеризується незначною зміною форми тіла органу, проте, більшою мірою змінюється форма гачка. Вектори зміщення міток останнього направлені у

бік переходу «тіло-гачок». В цьому випадку деформаційна решітка має найбільш виражену деформацію у ділянці гачка сім'яного пухирця. Третя компонента залучає більш виразні зміни у формі тіла і, як попередня – формі гачка. Вектори зміщення міток середини тіла і гачка сім'яного пухирця мають напрямлення протилежні один одному. При цьому проксимальна та дистальна частини тіла

свою форму значно не змінюють. Четверта та п'ята головні компоненти залучають більш значні зміни форми гачка сім'яного пухирця, що характеризується зменшенням його вигину. В результаті проведеного кластерного аналізу форм сім'яного пухирця щурів, які в експерименті зазнавали впливу толуолу було виділено 5 кластери форм (рис. 2).

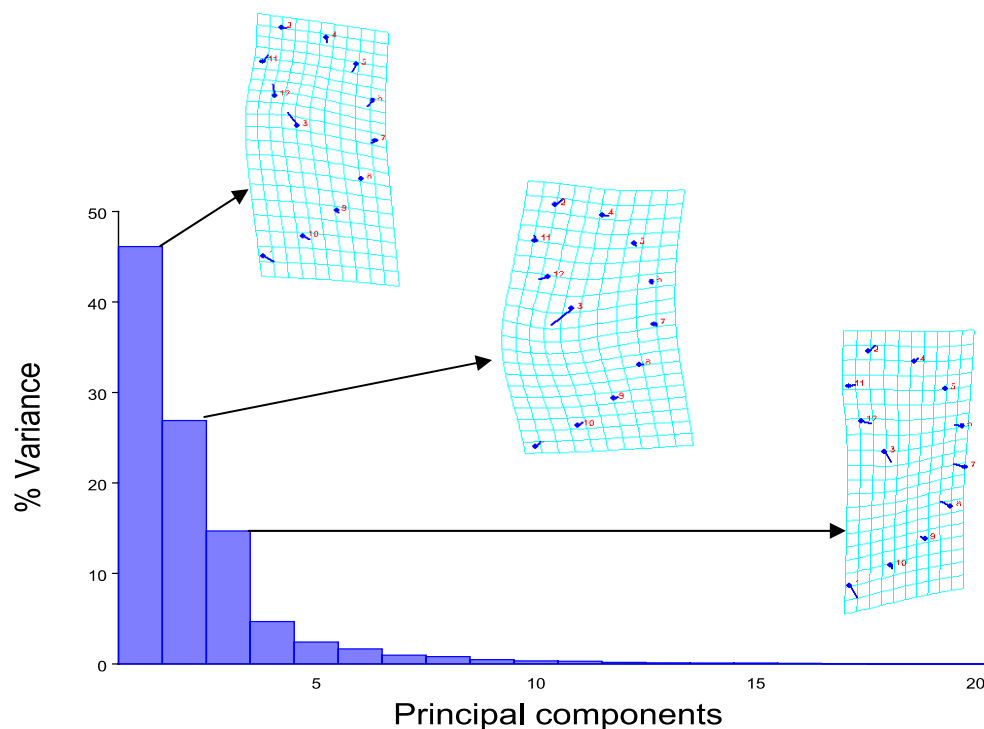


Рис. 2. Графічне зображення аналізу головних компонент усіх конфігурацій сім'яних пухирців щурів, які зазнавали впливу толуолу. Розподіл дисперсій вздовж головних компонент та деформаційні решітки для перших трьох головних компонент.

Підсумок

В ході проведеного дослідження ми встановили, що при інгаляційному впливі на організм статевозрілих щурів толуолу існує 5 кластерів форми сім'яного пухирця, що характеризуються зміною форми тіла органу, різним взаємовідношенням «тіло-гачок» та різним ступенем виразнос-

ті гачка сім'яного пухирця.

Перспективи подальших розробок полягають у вивченні гістологічної будови сім'яних пухирців щурів за умов інгаляційного впливу толуолу у поєднанні з застосуванням лікарських препаратів з антиоксидантною дією.

Літературні джерела References

1. Pavlinov LYa, Mikeshina NG. [Principles and methods of geometric morphometrics]. Zhurnal obshchey biologii. 2002; 63 (6): 473-93. Russian.
2. Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. Ital J Zool. 2004;71:5-16.
3. Rohlf FJ. Relative warps analysis and example of its application to mosquito wings. In: Contributions to morphometrics. Madrid: C.S.C.I.; 1993. p. 131-60.
4. Pavlinov IYa. [Geometric morphometry - a new analytical approach to comparing computer images]. In: Informatsionniye i telekommunikatsionniye resursy v zoologii i botanike. 2001. p. 65-90. Russian.
5. Pavlinov IYa. [Analysis of shape variation of the third upper molar in the rock vole, *Alticola* (Cricetidae) by geometric morphometrics] Zoologicheskii Zhurnal. 1999; 78 (1): 78-83. Russian.
6. Pavlinov IYa. [Geometric morphometrics of

the skull of various murid rodents (Mammalia, Rodentia): relation of the skull shape to the trophic specialization]. *Zh Obshch Biol.* 2000 Nov-Dec;61(6):583-600. Cited in: PubMed; PMID: 11190561.

7. Zlobin YuA, Sklyar VG, Bondareva LM, Kyrylchuk KS. [The morphometric concept in modern botany]. *Chornomorskyi botanichnyi zhurnal.* 2009;5(1):5-22. Ukrainian.

8. [General ethical principles of animal experimentation]. Proceedings of the 1st National Congress on bioethics. Kyiv: National Academy of Science of Ukraine; 2001. 16 p. Russian.

9. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg; 1986 Mar 18. 53 p.

10. Euro-Asian Council for standardization, metrology and certification. [Methods for testing the impact of chemical production on human organism. Reproduction/Development toxicity screening test] [International standard project]. Moscow: Standartinform; 2013. 18 p. Russian.

11. Sievko OL. [Ethic aspects of biomedical researches using experimental animals]. In: [3rd National Congress with international participation on bioethics; 2007 Oct 8-11; Kyiv; Ukraine]. Kyiv; 2007. p. 139-40. Ukrainian.

12. Mishalov VD, Chaikovsky YuB, Tverdokhle IV. [About legal, legislative, ethical standards and requirements at performance scientific morphological researches]. *Morphologia.* 2007;1(2):108-15. Ukrainian.

Волошина И.С. Оценка методами геометрической морфометрии морфологической изменчивости семенных пузырьков половозрелых крыс.

Реферат. Целью исследования было установить морфологическую изменчивость семенных пузырьков половозрелых крыс в отдаленные сроки после ингаляционного воздействия толуола с использованием методов геометрической морфометрии. В ходе проведенного исследования было создано графическое изображение анализа главных компонент всех конфигураций семенных пузырьков крыс контрольной и экспериментальной серий, дендрограммы распределения форм семенных пузырьков, выделено кластеры формы семенных пузырьков контрольной и экспериментальной серий соответственно.

Ключевые слова: семенные пузырьки, геометрическая морфометрия, крыса.