

УДК 616.379-008.64-092.9-06:616.37-018-076

Т.М. Бойчук, О.Г. Ушенко*, М.І. Грицюк

ВДНЗ України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці; *Чернівецький національний університет імені Ю.Федьковича

СТОКС-ПАРАМЕТРИЧНІ АВТОФЛУОРЕСЦЕНТНІ МІКРОСКОПІЧНІ ЗОБРАЖЕННЯ ОПТИЧНО АНІЗОТРОПНИХ ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРІЗІВ ТКАНИНИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ НА РАННІХ ТЕРМІНАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Резюме. У статті наведено дані щодо діагностичних можливостей аналізу автофлуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів тканини підшлункової залози щурів з експериментальним цукровим діабетом. Виявлено діагностичну чутливість застосування поляризованого випромінювання при зазначеній патології.

Ключові слова: підшлункова залоза, поляриметрия, цукровий діабет.

Специфічне ураження нирок при цукровому діабеті (ЦД) прийнято називати "діабетична нефропатія" (ДН). ДН належить до так званих пізніх ускладнень ЦД, котрі розвиваються при обох його типах і є основною причиною смерті пацієнтів. Пізні ускладнення є наслідком системної ангіопатії, яка має різноманітні клінічні прояви і умовно розподіляється на мікро- та макроангіопатії.

У медичній діагностиці широко застосовується поляризоване випромінювання. Подібні медичні дослідження дозволяють аналізувати структури біологічних об'єктів, специфіку структури хіральних біологічних молекул, вимірювати концентрацію цукру у крові, кількісно визначати особливості структури білків у розчинах та інше [1-3].

Мета дослідження: дослідити застосування лазерної поляриметрії як методу діагностики ранніх проявів уражень нирок при експериментальному цукровому діабеті у щурів.

Матеріал і методи. Досліджувалися дві групи зразків гістологічних зрізів тканин внутрішніх органів щура: перша (I) – контрольна група (n=36), яка перебувала на стандартному режимі годування, освітлення та утримання, із дотриманням положень Директиви ЄС №609 (1986) та наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. "Про заходи щодо подальшого удосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин". Дослідній групі тварин (n=36) одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозоцин (Sigma, США) у дозі 70 мг/кг для моделювання експериментального ЦД [1]. Для дослідження основних показ-

ників функцій нирок забій тварин проводили під легким ефірним знеболенням. Розбіжності між групами дослідження здійснювали згідно з методом Стьюдента.

Експериментальні дослідження координатних розподілів параметрів вектора Стокса автофлуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів біологічних тканин щура у межах обох груп виконувалися у розташуванні стокс поляриметра. Для збудження автофлуоресценції опромінювання дослідних зразків проводилося за допомогою твердотільного напівпровідникового синього лазера з довжиною хвилі $\lambda_2 = 0,405 \mu\text{m}$ [4, 5].

Було застосовано алгоритм досліджень явища автофлуоресценції, який базується на застосуванні обчислення набору параметрів математичного вектора Стокса $S(S_1, S_2, S_3, S_4)$, який найбільш повно характеризує орієнтаційну та полікристалічну будову порфіринів гістологічних зрізів біологічних тканин внутрішніх органів щурів. Обчислення значень параметрів вектора Стокса у кожному пікселі цифрової камери проводилося за відповідними алгоритмами [6, 7]. Визначені значення статистичних моментів усереднювалися у межах кожної з груп та визначалося стандартне відхилення $\pm \sigma$. За співвідношеннями визначалася збалансована точність A_c діагностичного тесту [8-10]. Біологічний шар послідовно зондувався лазерним пучком із такими типами поляризації: лінійна з азимутами 0° , 90° , $+45^\circ$ і права циркуляція (\otimes) [11, 12].

© Бойчук Т.М., Ушенко О.Г., Грицюк М.І., 2015

Результати дослідження та їх обговорення.

На рис. 1 і рис. 2 наведено серію координатних дво- (фрагменти (1)) та тривимірних (фрагменти (2)) і гістограм (фрагменти (3)) розподілів орієнтаційного параметру S_2 автофлуоресцентних мікроскопічних зображень лінійних осциляторів молекул порфірину гістологічних зрізів підшлункової залози (ПЗ) здорової (рис. 1) та хворої (рис. 2) тварини. У таблиці 1 наведені усереднені у ме-

жах контрольної та дослідної груп значення статистичних моментів 1-4 порядків, які характеризують координатні розподіли орієнтаційного параметру S_2 ансамблів молекул порфірину, визначеного для серії автофлуоресцентних зображень гістологічних зрізів ПЗ.

Аналіз експериментальних даних дослідження статистичної структури координатних розподілів набору орієнтаційних параметрів S_2 ,

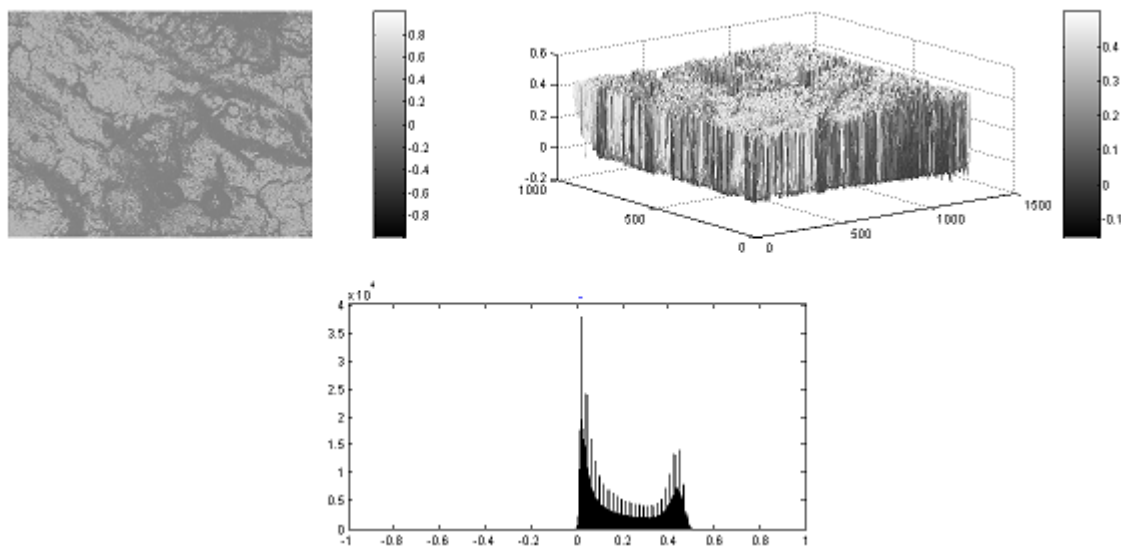


Рис. 1. Дво- (фрагменти (1)) та тривимірних (фрагменти (2)) і гістограм (фрагменти (3)) розподілів орієнтаційного параметра S_2 лазерного автофлуоресцентного мікроскопічного зображення гістологічного зрізу підшлункової залози здорової щура. Пояснення у тексті

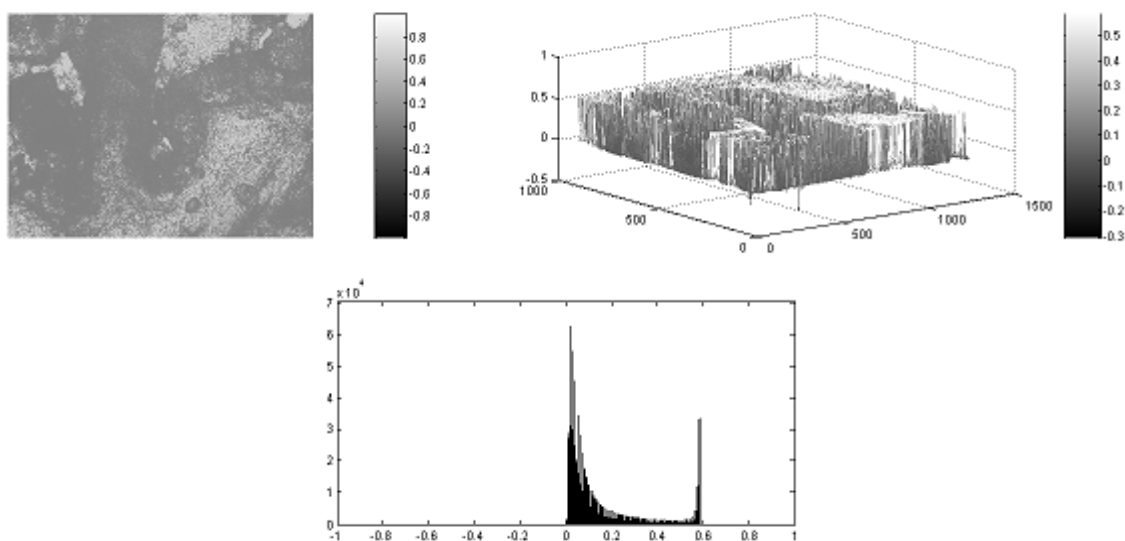


Рис. 2. Дво- (фрагменти (1)) та тривимірних (фрагменти (2)) і гістограм (фрагменти (3)) розподілів орієнтаційного параметра S_3 лазерного автофлуоресцентного мікроскопічного зображення гістологічного зрізу підшлункової залози щура з цукровим діабетом. Пояснення у тексті

Таблиця 1

Статистичні $Z_{i=1;2;3;4}$ параметри, що характеризують координатні розподіли орієнтаційного параметру $S_3(m \times n)$ автофлуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів підшлункової залози

Параметри	Контрольна група (n=36)	Дослідна група (n=36)	Ac, %
Z_1	$0,14 \pm 0,021$	$0,16 \pm 0,027$	64%
Z_2	$0,18 \pm 0,033$	$0,24 \pm 0,039$ P>0,05	78%
Z_3	$0,75 \pm 0,097$	$0,98 \pm 0,11$ P>0,05	84%
Z_4	$0,81 \pm 0,12$	$0,73 \pm 0,097$	66%

які характеризують ступінь впорядкованості молекул порфіринів гістологічних зрізів ПЗ виявив:

- Перевагу лінійних осциляторів у гістологічному зрізі ПЗ хворих щурів. Це впливає із збільшення ймовірності випадкових значень орієнтаційного параметра $S_2 = 0,5$ (рис. 1, рис. 2, фрагменти (3)) у межах автофлуоресцентних зображень гістологічних зрізів ПЗ у дослідної групи.

- Порівняльний моніторинг орієнтаційної структури мікроскопічних автофлуоресцентних мікроскопічних зображень набору гістологічних зрізів ПЗ обох груп щурів виявив більший ступінь формування орієнтаційної структурованості ансамблів порфіринів щурів з модельованим ЦД.

У межах статистичного підходу до аналізу проявів автофлуоресценції ансамблів лінійних молекул порфіринів визначено набір усереднених у межах обох груп статистичних моментів 1-4 порядку, які характеризують координатні розподіли $S_2(m \times n)$ – таблиця 1.

Із аналізу одержаних даних усереднені значення статистичних характеристик координатних розподілів орієнтаційного параметру S_2 поляризаційних автофлуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів ПЗ установлено найбільшу чутливість до зміни орієнтаційної структури лінійних осциляторів флуоресценції ПЗ статистичних моментів 2-го і 3-го порядків, які характеризують зміни розкиду випадкових значень та гостроти піку гістограм розподілів орієнтаційного параметру. Нами установлена добра якість ($Ac = 78\% - 84\%$) діагностичного тесту у диференціації гістологічних зрізів тканини ПЗ. На рис.

3 і рис. 4 наведено результати досліджень координатних дво- (фрагменти (1)) та тривимірних (фрагменти (2)) гістограм (фрагменти (3)) розподілів параметру кристалізації S_4 поляризаційно відфільтрованих автофлуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів ПЗ щурів контрольної (рис. 3) та дослідної (рис. 4) груп.

У таблиці 2 наведені дані обчислення усереднених у межах обох груп тварин величин статистичних моментів 1-4 порядків, які характеризують координатні розподіли параметру кристалізації S_4 , визначеного для серії поляризаційних автофлуоресцентних мікроскопічних зображень полікристалічних мереж порфіринів гістологічних зрізів ПЗ. Порівняльний аналіз стокс-поляриметричних автофлуоресцентних зображень полікри-

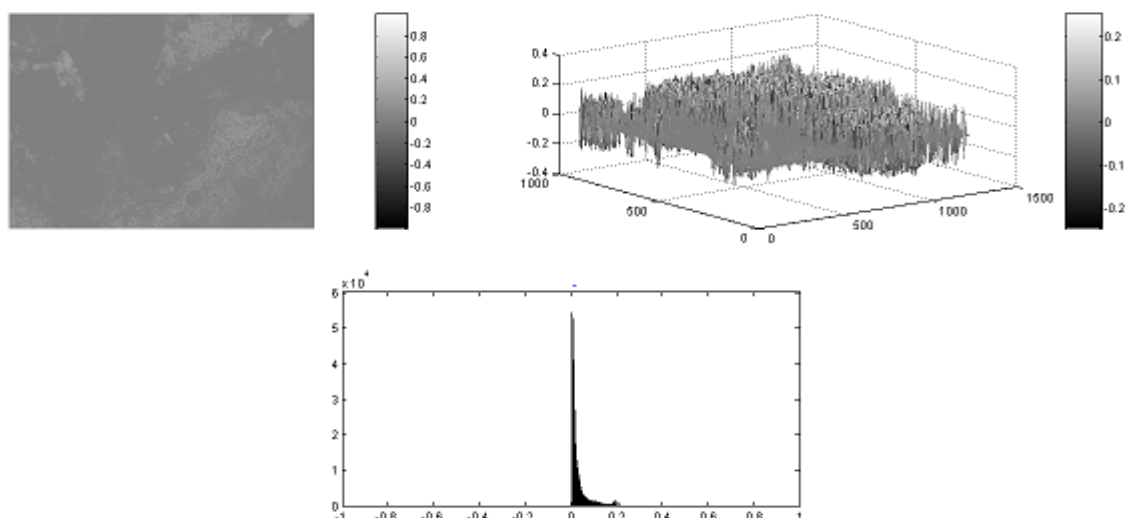


Рис. 3. Дво- (фрагменти (1)) та тривимірних (фрагменти (2)) і гістограм (фрагменти (3)) розподілів параметру кристалізації S_4 лазерного автофлуоресцентного мікроскопічного зображення гістологічного зрізу підшлункової залози здорового щура

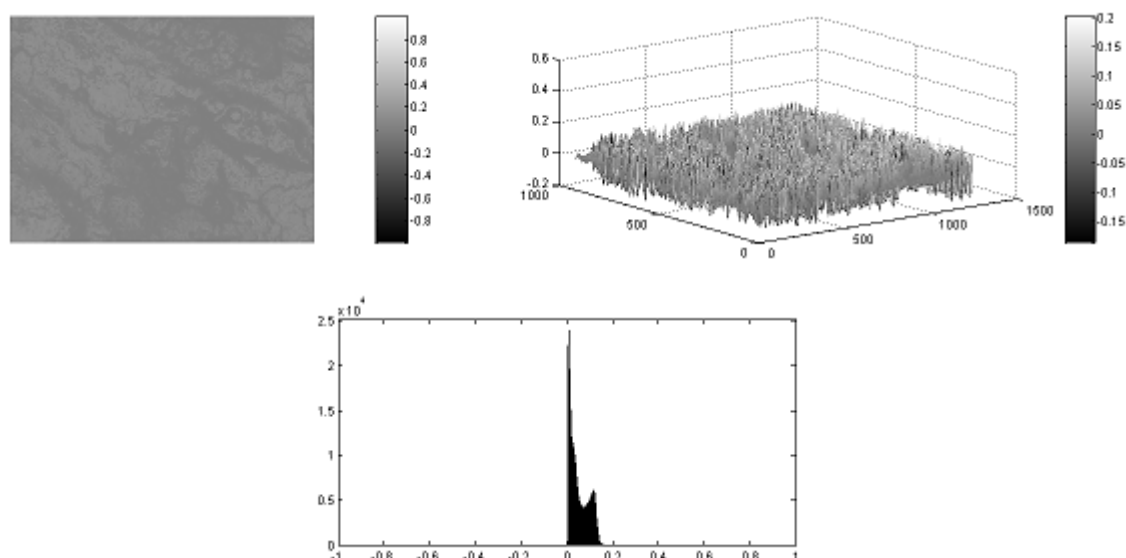


Рис. 4. Дво- (фрагменти (1)) та тривимірних (фрагменти (2)) і гістограм (фрагменти (3)) розподілів параметру кристалізації S_4 лазерного автофлуоресцентного мікроскопічного зображення гістологічного зрізу підшлункової залози щура з цукровим діабетом

сталічних порфіринових мереж виявив особливості:

- Достатньо вузький діапазон зміни випадкових значень параметра кристалізації мереж порфіринів – $0 \leq S_4 \leq 0,25$. Даний факт вказує на переважний механізм автофлуоресцентного випромінювання мережами вільних молекул порфірину.

- Для патологічних станів спостерігається зростання значень параметра кристалізації, які локалізовані на рівні $S_4 = 0,2$. Виявлена тенденція статистичної трансформації координатних розподілів ступеня кристалізації підтверджує формування вільних молекул порфіринів у полікристалічні мережі.

- У межах статистичного аналізу поляризаційно-відфільтрованих мікроскопічних автофлуоресцентних зображень полікристалічних мереж порфіринів виявлено величини усереднених у межах обох груп статистичних моментів 1-4 порядків, які характеризують гістограми випадкових значень S_4 – таблиця 2.

- З аналізу одержаних даних встановлено, що найбільш чутливими до зміни ступеню кристалізації мереж порфіринів ПЗ виявилися статистичні моменти вищих порядків. При цьому досягається практично відмінна якість діагностичного тесту $Ac = 81\% - 87\%$.

Таблиця 2

Статистичні $Z_{i=1;2;3;4}$ параметри, які характеризують координатні розподіли параметра кристалізації $S_4 (m \times n)$ автофлуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів підшлункової залози

Параметри	Контрольна група (n=36)	Дослідна група (n=36)	Ac, %
Z_1	$0,05 \pm 0,008$	$0,07 \pm 0,01$	70%
Z_2	$0,08 \pm 0,011$	$0,11 \pm 0,017$ P>0,05	68%
Z_3	$0,28 \pm 0,037$	$0,37 \pm 0,051$	81%
Z_4	$1,56 \pm 0,23$	$1,17 \pm 0,19$ P>0,05	87%

Висновки. 1. Виявлено основні взаємозв'язки між змінами набору статистичних моментів 1-4 порядків, які характеризують координатні розподіли орієнтаційного параметра за фізіологічним станом внутрішніх органів щурів, що забезпечило збалансовану точність діагностики патології: підшлункова залоза – найбільш чутливими виявилися статистичні моменти 2-го і 3-го порядків із наступним діапазоном зміни значень збалансованої точності $Ac = 78\% - 84\%$.

2. Виявлено інформаційні взаємозв'язки між змінами набору статистичних моментів 1-4 порядків, які характеризують координатні розподіли параметра ступеня кристалізації та особливостями автофлуоресценції полікристалічних мереж

порфіринів внутрішніх органів щурів, що забезпечило збалансовану точність діагностики патології підшлункової залози. Найбільш чутливими виявилися статистичні моменти 3-го і 4-го порядків з діапазоном зміни значень збалансованої точності $A_c = 81\% - 87\%$.

Перспективи подальших досліджень. Зважаючи на новизну застосованого методу, видаються перспективними подальші дослідження виявлення ранніх ознак ушкодження підшлункової залози при експериментальному цукровому діабеті у тварин.

Список використаної літератури

1. Відтворення експериментальної стрептозотоцин-індукованої моделі цукрового діабету 2 типу у щурів / Т.І. Галенова, В.В. Конопельнюк, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко // *Фізика живого*. – 2010. – Т. 18, № 3. – С. 50-54.
2. Карачевцев А.О. Фур'є-Стокс-Поляриметрія Полів Лінійно Та Циркулярно Двопроменезаломлюючих Протеїнових Мереж: автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук 01.04.05 – оптика, лазерна фізика / А.О. Карачевцев. – Львів, 2012.
3. Ребров Б.А. Поражение почек при сахарном диабете / Б.А. Ребров // *Международ. эндокринолог. ж.* – 2011. – № 2(34). – С. 51-55.
4. Ushenko Yu.A. Polarization-phase filtering of laser images of biological liquids / Yu.A. Ushenko, M. Sidor // *Proc. SPIE*. – 2013. – Vol. 8882. – P. 88820Q.
5. Multidimensional Mueller Matrices Microscopy of Biological Crystal Networks Structure / Yuriy A. Ushenko, Alexander V. Dubolazov, Artem O. Karachevtsev [et al.] // *Proc. Fringe*, 2013. – 2014. – P. 855-858.
6. Kliger D.S. Polarized Light in Optics and Spectroscopy / D.S. Kliger, J.W. Lewis, C.E. Randall. – New York, USA: Academic Press-Harcourt Brace Jovanovich, 1990. – 304 p.
7. Laser polarization fluorescence of optically anisotropic crystals molecular imaging in the differentiation of biological benign and malignant tumors / Yu. A. Ushenko, A.V. Dubolazov, A.O. Karachevtsev [et al.] // *Proc. SPIE*. – 2013. – Vol. 8812. – P. 88120Z.
8. Brouseau C. Fundamentals of Polarized Light a Statistical Approach / C. Brouseau. – New York, USA: John Wiley & Sons, 1998. – 405 p.
9. Laser polarization-variable autofluorescence of the network of optically anisotropic biological tissues: diagnostics and differentiation of early stages of cancer of cervix uteri / Yu.A. Ushenko, M.I. Sidor, N. Pashkovskaia [et al.] // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2014. – Vol. 07, Issue 03. – P. 1450024.
10. Laser polarization autofluorescence of endogenous porphyrins of optically anisotropic biological tissues and fluids in diagnostics of necrotic and pathological changes of human organs / Yu.A. Ushenko, A.D. Arkheliyuk, M.I. Sidor [et al.] // *Appl. Opt.* – 2014. – № 53. – P. B181-B191.
11. Fourier-domain Jones-matrix mapping of a complex degree of mutual anisotropy in differentiation of biological tissues' pathological states / Yu.A. Ushenko, L.Yu. Trifonyuk, A.V. Dubolazov, A.O. Karachevtsev // *Appl. Opt.* – 2014. – № 53. – P. B205-B214.
12. Тучин В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике / В.В. Тучин. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2012. – 811 с.

СТОКС-ПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ АВТОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗОБРАЖЕНИЯ ОПТИЧЕСКИ АНИЗОТРОПНЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС НА РАННИХ СРОКАХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Резюме. Статья представляет данные, касающиеся диагностических возможностей анализа автофлуоресцентных микроскопических изображений гистологических срезов ткани поджелудочной железы белых крыс при моделировании экспериментального сахарного диабета. Опытным путем выявлена диагностическая чувствительность при использовании поляризованного излучения при экспериментальном сахарном диабете.
Ключевые слова: поджелудочная железа, поляриметрия, сахарный диабет.

STOKES-PARAMETRIC AUTOFLUORESCENCE MICROSCOPIC IMAGES OF OPTICALLY ANISOTROPIC HISTOLOGICAL SECTIONS OF THE PANCREATIC TISSUES OF RATS AT THE EARLY STAGES OF EXPERIMENTAL DIABETES

Abstract. The article presents the findings concerning diagnostic possibilities of the analysis of autofluorescence microscopic images of histological sections of the pancreatic tissue in rats in case of modeling experimental diabetes mellitus. Diagnostic sensitivity of the use of polarized radiation in case of experimental diabetes mellitus has been revealed.

Key words: pancreas, polarimetry, diabetes mellitus.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi);
Chernivtsi National University named after Yuriy Fedkovych (Chernivtsi)

Надійшла 02.11.2015 р.
Рецензент – проф. Пашковська Н.В. (Чернівці)