

THE USE OF VECTOR – PARAMETRIC FLUORESCENCE POLARIZATION MICROSCOPY OF HISTOLOGICAL SECTIONS OF SPLEEN OF RATS WITH ABDOMINAL SEPSIS IN EXPERIMENT

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi, Ukraine)

aspirant-surgeon@ukr.net

The purpose of our work was the development and experimental testing of a new digital method of objective differential diagnosis of the severity of abdominal sepsis through statistical analysis of fluorescent vector-parametric polarization images of histological sections of the spleen of laboratory rats. Our research aims to develop the principles of differential diagnosis of the severity of abdominal sepsis by using the digital technique of vector-parametric polarization mapping of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of laboratory rats. This technique is based on established diagnostically relevant relationships between the distributions of the number of characteristic values of the polarization parameter of the Stokes vector of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of laboratory rats and the severity of the septic process.

In work, for the first time, the method of mapping fluorescent vector-parametric microscopic images of the polycrystalline component of histological sections of the spleen of laboratory rats was used for the differential diagnosis of the severity of the septic process, and a statistical analysis of the distributions of the number of characteristic values of the Stokes vector of fluorescent polarization microscopic images of histological sections of the spleen of laboratory rats was carried out. The relationships between the values of the statistical moments of the 1st - 2nd orders, which characterize the distributions of the number of characteristic values of the Stokes vector of fluorescent polarization microscopic images of histological sections of the spleen of laboratory rats, and the severity of abdominal sepsis have been determined. Quantitative parameters most sensitive to septic conditions have been established, which ensure the implementation of statistically reliable differentiation of histological sections of the spleen of laboratory rats. From the standpoint of evidence-based medicine, the operational characteristics of the diagnostic powers of the fluorescent vector-parametric microscopy method with the assessment of the number of characteristic values of the fourth Stokes vector of polarization images of histological sections of the spleen of laboratory rats with abdominal sepsis have been established.

Key words: abdominal sepsis, spleen, fluorescence microscopy, Stokes vector.

Connection of the publication with planned research works.

This work was carried out within the framework of the planned SRW of the Department of General Surgery of Bukovinian State Medical University “Personalized diagnosis and treatment of acute surgical and urological pathology”, state registration number – 0122U002220.

Introduction.

Abdominal sepsis (AS) is currently the most difficult problem of emergency surgery and the main cause of mortality, which remains at a fairly high level and does not show a tendency to decrease, ranging from 19 to 70% [1]. It has been established that the leading role in the development of abdominal sepsis (AS) belongs to the syndrome of endogenous intoxication (SEI), which leads to multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and secondary immunodeficiency, which in progression causes the death of the patient [2, 3].

An important peripheral organ of the immune system is the spleen, which is responsible for forming the immune response, the main source of antibodies

when an antigen enters the blood. It is in the spleen that IgM is synthesized earlier than in other organs [4, 5, 6].

The aim of the study.

To evaluate the severity of the course of abdominal sepsis by using the digital technique of vector-parametric polarization mapping of fluorescent microscopic images of histological sections of laboratory rat’s spleen.

Object and research methods.

Experimental studies were conducted on 273 white non-linear sexually mature rats of both sexes weighing from 180 to 220 g. The animals were randomized into three experimental groups of 39 animals each and a control group of 39 animals. Experimental animals of groups 1, 2, and 3 were modeled according to their methodology [7]. After 12 and 48h of AS, animals were euthanized following the requirements of the Vancouver Convention, and internal organs were collected from which fresh-frozen histological sections were prepared.

Experimental studies were carried out in compliance with the requirements of humane treatment of experimental animals, regulated by the Law of Ukraine “On

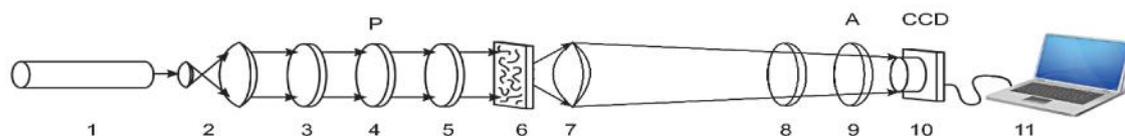


Figure 1 – Optical scheme of the Stokes polarimeter [9]. Marking: 1 – He-Ne laser; 2 – collimator; 3, 5 – quarter-wave plates; 4 – polarizer; 6 – object of research – biological drugs; 7 – polarizing microlens; 8 – polarization analyzer; 9 – interference light filter ($\lambda=0,63 \mu\text{m}$); 10 – digital CCD camera; 11 – personal computer.

the Protection of Animals from Cruelty" (No. 3447-IV dated 21.02.2006) and the European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other scientific goals (Strasbourg, March 18, 1986).

Our [8] method is based on established diagnostically relevant relationships between the distributions of the number of characteristic values of the polarization parameter of the Stokes vector of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of laboratory rats and the severity of the septic process.

Irradiation was carried out (fig. 1) with a parallel beam ($\varnothing=10^4\mu\text{m}$) of a blue laser ($\lambda=0.405\mu\text{m}$) 1. Polarizing filter (quarter-wave plate 3, 5 (manufacturer – Achromatic True Zero-Order Waveplate) and polarizer 4 (manufacturer – B+W Kaesemann XS-Pro Polarizer MRC Nano)) formed a right circularly polarized laser beam – a coherent probe. Images of rat blood films 6 were projected using a polarizing microlens 7 (manufacturer – Nikon CFI Achromat P, focal length – 30 mm, numerical aperture – 0.1, magnification – 4x) into the plane of the photosensitive area of the CCD camera 10 (The Imaging Source DMK 41AU02.AS, monochrome 1/2" CCD, Sony ICX205AL (progressive scan); resolution – 1280x960; photosensitive area size – 7600x6200 μm ; sensitivity – 0.05 lx; dynamic range – 8 bit, SNR – 9 bit), photosensitive area which contains $m \times n = 1280 \times 960$ pixels. By rotating the transmission axis of the analyzer 8 (manufacturer – B+W Kaesemann XS-Pro Polarizer MRC Nano) to the angles $0^\circ, 90^\circ, 45^\circ$, as well as to the angle $\Theta = -45^\circ$ relative to the axis of the highest speed of the quarter-wave plate 8, the transmission conditions were formed linearly (with azimuths $0^\circ, 90^\circ, 45^\circ$) and the left circularly polarized states of fluorescent radiation emitted by the interference light filter 9 at the wavelength $\lambda=0,63\mu\text{m}$.

Further, the coordinate distributions of the value of the fourth parameter of the Stokes vector of the fluorescent microscopic image of the biological preparation were calculated accordingly.

For a more detailed study of the polycrystalline structure of rat blood films, we used the following information selection method.

From the entire calculated coordinate set of values of the fourth parameter $S_4(x, y)$ of the Stokes vector of the digital fluorescent microscopic image of the research object, samples of certain extreme (characteristic) values were formed – $S_4(x, y)=0$ – the maximum level of crystallization of the optically anisotropic component of the biological blood preparation. The method of determining samples of extreme values of the coordinate distribution of the fourth parameter $S_4(x, y)$ of the Stokes vector of the digital fluorescent microscopic image of blood films consisted of the following actions. The number (within the column $m_i \div m_i + 1 \text{ pix}$) of extreme values $S_4(x, y)=0$ in the two-dimensional array $S_4(x, y)$ was calculated (by scanning along the direction $n_{i+1} = n_i + 1 \text{ pix}$).

Next, the distribution $N(S_4)$ corresponding to them was determined: $\{N(S_4=0)=N_1(0), N_2(0), \dots, N_{m-1}(0); N_m(0)\}$. The structure of the study of the polycrystalline component of biological preparations of rat blood in the differential diagnosis of the severity of the septic condition using the methods of digital Stokes polarimetric fluorescence microscopy consists of the following experimental and analytical actions:

1. Representative samples of histological sections of the spleen of the following groups of rats are formed:

- ◆ Intact rats – “control” group 1 (39 samples);
- ◆ Sick rats (sepsis – mild form) – “experimental” group 2:
 - duration 12 hours (39 samples) – “experimental” subgroup 2.1;
 - duration of 48 hours (39 samples) – “research” subgroup 2.2.
- ◆ Sick rats (sepsis – medium form) – “experimental” group 3:
 - duration 12 hours (39 samples) – “experimental” subgroup 3.1;
 - duration of 48 hours (39 samples) – “research” subgroup 3.2.
- ◆ Sick rats (sepsis – severe form) – “experimental” group 4:
 - duration 12 hours (39 samples) – “experimental” subgroup 4.1;
 - duration of 48 hours (39 samples) – “research” subgroup 4.2.

2. Within each of the four groups for each sample of a biological preparation of histological sections of the spleen:

- measurement of the coordinate distribution of the value of the fourth parameter of the Stokes vector (crystallization parameter – CP) in the pixels of the digital fluorescent microscopic image;
- determination of distributions of the number of characteristic values $\{N(S_4=0)=N_1(0), N_2(0), \dots, N_{m-1}(0); N_m(0)\}$;
- calculation of the value of a set of statistical moments of the 1st – 2nd orders, which characterize the average S and dispersion D of distributions $\{N(S_4=0)=N_1(0), N_2(0), \dots, N_{m-1}(0); N_m(0)\}$.

3. For the obtained group sets (average S and dispersion D), determine the average values and fluctuations of the statistical moments of the 1st – 2nd orders.

4. For all groups of biological preparations of blood films, a cross-analysis of the statistical reliability of the obtained data is carried out and objective criteria for differential diagnosis of the presence of a septic process and its degree of severity are determined by the method of Stokes polarimetric fluorescence microscopy.

For the coordinate distributions of the number of characteristic values (Φ) of the fourth parameter of the Stokes vector in the plane of the digital fluorescent microscopic image of the biological preparation, a set of central statistical moments of the 1st – 2nd orders (S -average, D -dispersion) was calculated according to analytical algorithms, the formulas and structure of which are presented in cycles of scientific publications [6, 7].

Research results and their discussion.

On a series of fragments of fig. 2 – fig. 3 presents vector-parametric maps and distributions of the number of characteristic CP values, which are determined for digital fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of rats from control group 1 of intact animals.

Fig. 4. – fig. 5 illustrate the data of Stokes polarimetric microscopy – vector-parametric maps and distributions of the number of characteristic CP values of digital fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of rats from group 2.1 ((1),(2)) and group 2.2 ((3),(4)).

In fig. 6 – fig. 7 presents vector-parametric maps (fig. 6) and distributions of the number of

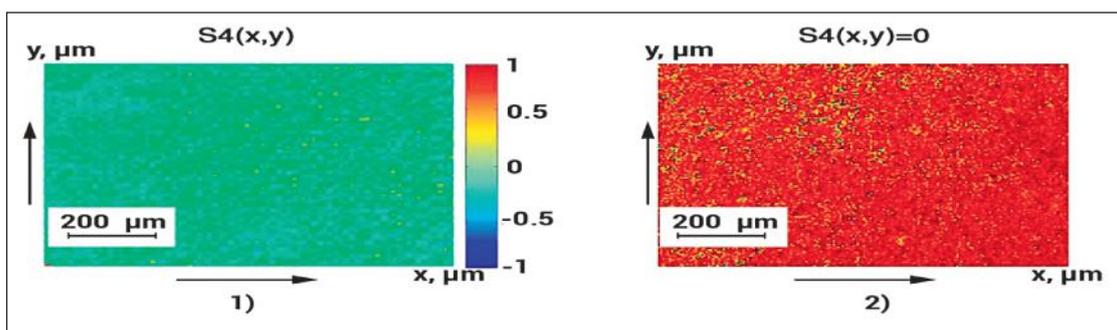


Figure 2 – Vector-parametric map (fragment 2) CP (fragment 1) of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of rats from group 1.

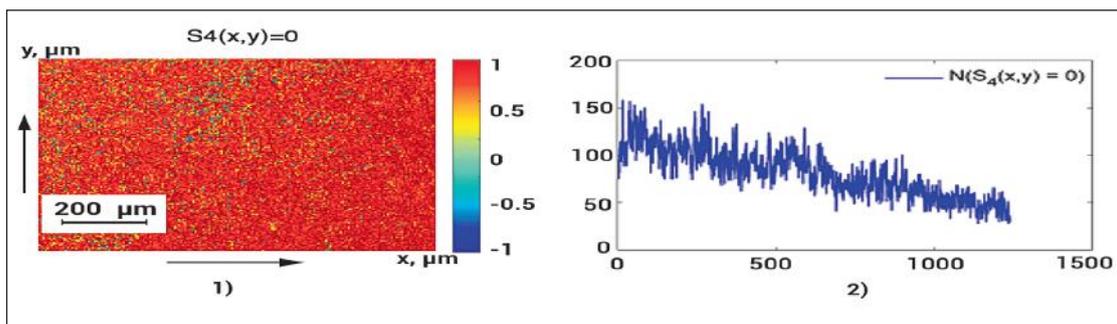


Figure 3 – Vector-parametric map (fragment 1) and distribution of the number of characteristic values (fragment 2) of CP in points of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of rats from group 1.

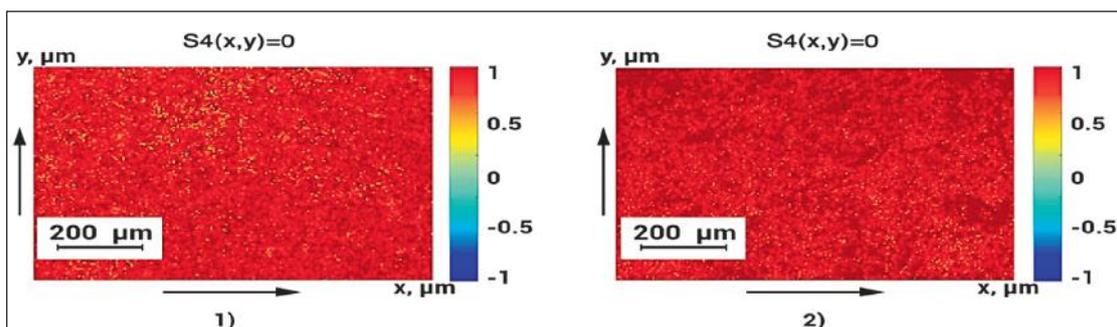


Figure 4 – Vector-parametric maps (fragments 2), (3) CP (fragment 1) of fluorescent microscopic images of histological sections of rat spleen from group 2.1 (fragment 2) and group 2.2 (fragment 2)).

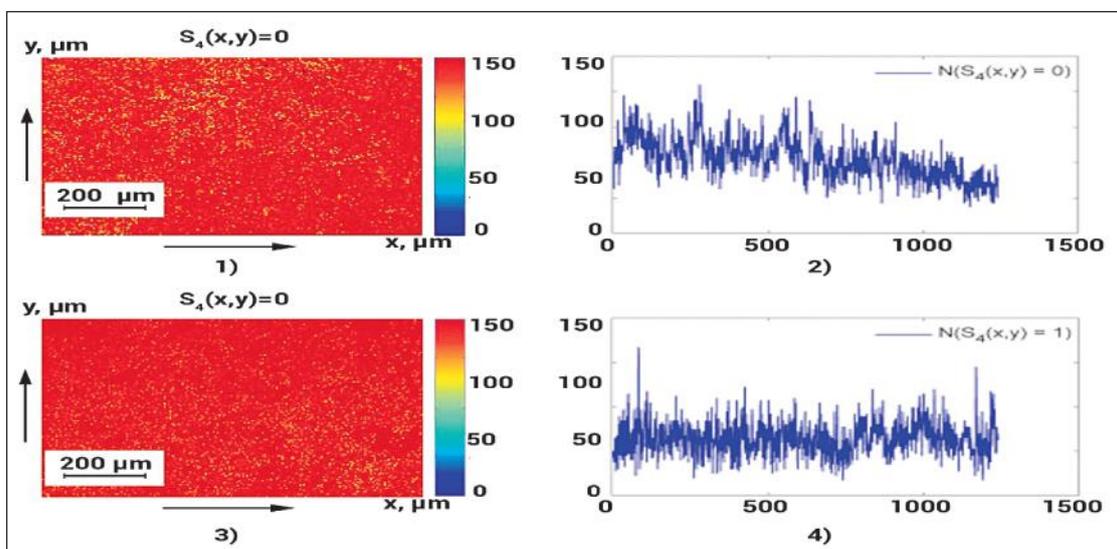


Figure 5 – Vector-parametric maps (fragments 1), (3) and distributions of the number of characteristic values (fragments 2), (4) CP in the points of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of rats from group 2.1 (fragments 1),(2) and groups 2.2 (fragments 3),(4)).

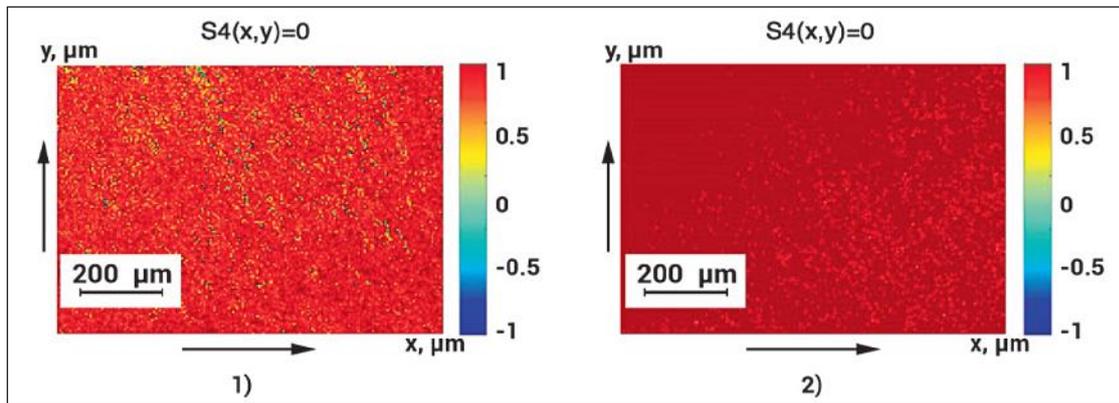


Figure 6 – Vector-parametric maps (fragments (2), (3)) CP (fragment (1)) of fluorescent microscopic images of histological sections of rat spleen from group 3.1 (fragment (2)) and group 3.2 (fragment (2)).

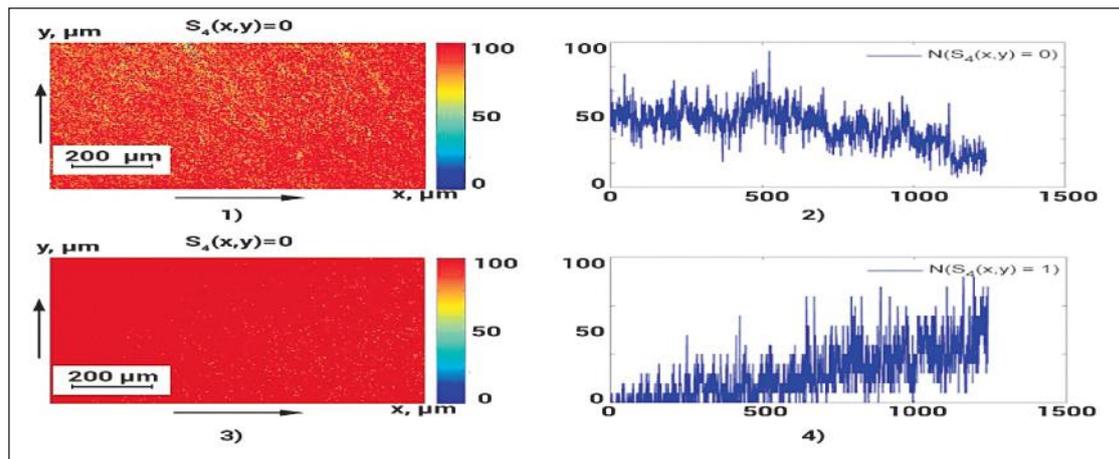


Figure 7 – Vector-parametric maps (fragments (1), (3)) and distributions of the number of characteristic values (fragments (2), (4)) CP in the points of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of rats from group 3.1 (fragments (1), (2)) and groups 3.2 (fragments (3),(4)).

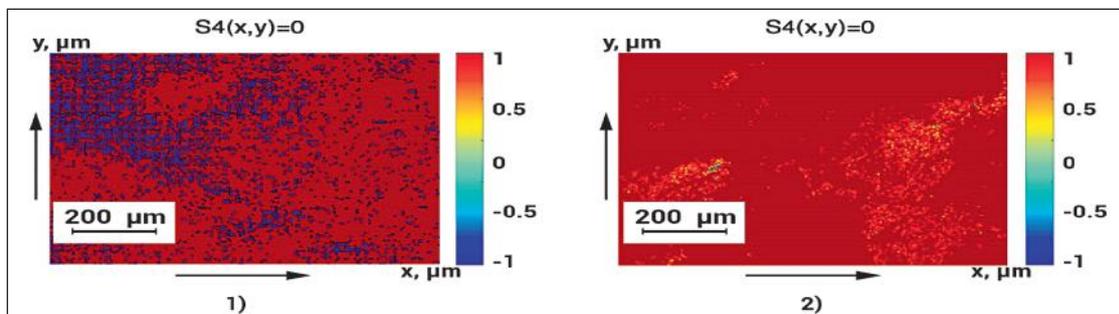


Figure 8 – Vector-parametric maps (fragments (2), (3)) PC (fragment (1)) of fluorescent microscopic images of histological sections of rat spleen from group 4.1 (fragment (2)) and group 4.2 (fragment (2)).

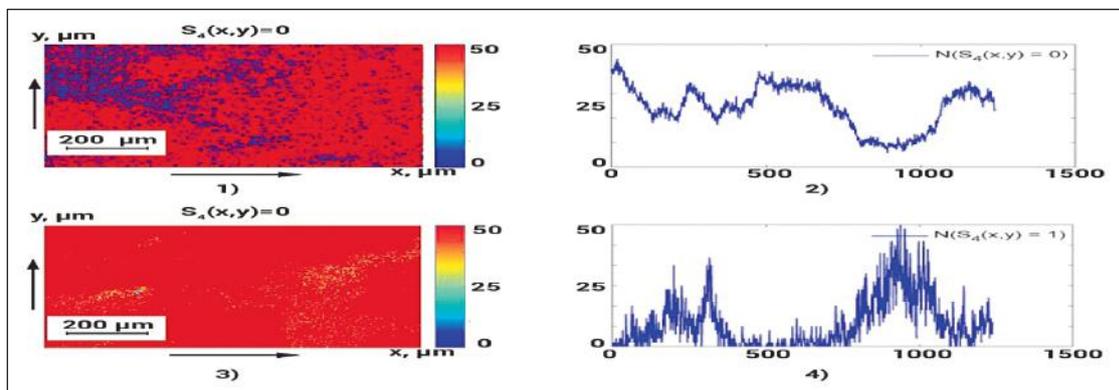


Figure 9 – Vector-parametric maps (fragments (1), (3)) and distributions of the number of characteristic values (fragments (2), (4)) CP in the points of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen of rats from group 4.1 (fragments (1), (2)) and groups 4.2 (fragments (3),(4)).

characteristic CP values (fig. 7), which are determined for digital fluorescent microscopic images of histological sections of rat spleens from group 3.1 (fragments (1), (2)) and group 3.2 (fragments (3), (4)).

On a series of fragments of fig. 8 – fig. 9 presents vector-parametric maps (fig. 8) and distributions of the number of characteristic CP values (fig. 9), which are determined for digital fluorescent microscopic images of histological sections of rat spleens from group 4.1 (fragments (1), (2)) and group 4.2 (fragments (3), (4)).

Comparative analysis of the results of polarization vector-parametric microscopy (table 1) of the polycrystalline component of histological sections of the spleen revealed:

- the presence of distributions of characteristic CP values, which are formed by mechanisms of optical anisotropy of samples from all groups;
- the dependence of the structure of distributions of the number of CP parameter values (fragments (2), (4)) in the points of digital fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen on the condition of rats – healthy and septicly affected;
- dependence on the degree of severity of the average septic process and the range of dispersion of the number of characteristic CP values in polarization-filtered fluorescent microscopic images (fragments (2), (4) respectively).

From the comparative analysis (table 2) of the values of a set of statistical moments of the 1st – 2nd orders, which characterize the histograms of phase distributions in the points of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen, it was found:

1. Central statistical moment of the 1st order (average S):

- the average group value S within the set of representative samples «group 1 – group 4» decreases from 101.3 to 12.2;
- intergroup differences – statistically significant ($p_{1-4}, p_{2-3}, p_{3-4}, p_{2-4} < 0,05$);
- intra-group differences for group 4 are statistically unreliable ($p > 0,05$).

2. Central statistical moment of the 2nd order (dispersion D):

- the average group value of dispersion D within the set of representative samples «group 1 – group 4» decreases from 25.8 to 3.3;
- intergroup differences – statistically significant for all groups ($p_{1-4}, p_{2-3}, p_{3-4}, p_{2-4} < 0,05$);
- intra-group differences for group 4 are statistically unreliable ($p > 0,05$).

Conclusions.

1. The optical arrangement of the Stokes-polarimetric mapping system with vector-parametric analysis of fluorescent microscopic images of blood films of laboratory rats was experimentally tested.

2. An album of vector-parametric polarization maps and distributions of the number of characteristic val-

Table 1 – Statistical parameters of vector-parametric maps of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen

Groups	Group 1 Intact (n=39)	Group 2 Sepsis (mild) (n=39)		Group 3 Sepsis (moderate) (n=39)	
	0 hours	2.1 (12 hours)	2.2 (48 hours)	3.1 (12 hours)	3.2 (48 hours)
Average, S	101,3±2,67	75,2±1,45	56,9±1,04	44,7±0,81	28,1±0,62
Dispersion, D	25,8±0,54	19,6±0,49	13,4±0,32	8,7±0,26	6,2±0,21
Groups	Group 4 Sepsis (severe) (n=39)				
	Duration	4.1 (12 hours)	4.2 (48 hours)		
Average, S	15,3±2,41	12,2±2,38			
Dispersion, D	4,1±0,66	3,3±0,51			

Table 2 – Efficiency of statistical differentiation of vector-parametric maps of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen

Groups	Statistical reliability, p _i						
	“1-2,3,4” $p_{1(2,3,4)}$	“2-3” p_{23}	“2-4” p_{24}	“3-4” p_{34}	“2.1-2.2” $p_{2(12)}$	“3.1-3.2” $p_{3(12)}$	“4.1-4.2” $p_{4(12)}$
Average, S	P<0,05					P>0,05	
Dispersion, D	P<0,05					P>0,05	

ues of the crystallization parameter at the points of the digital fluorescent microscopic image of polycrystalline blood films of rats from control group 1 and experimental groups 2 – 4 with different severity of septic pathology was obtained.

3. The statistical reliability of differentiation of vector-parametric maps of fluorescent microscopic images of polycrystalline blood films of rats from control group 1 and experimental groups 2 – 4 with different severity of septic pathology was determined.

4. The most diagnostically sensitive statistical criteria for differentiation of vector-parametric polarization maps of fluorescent microscopic images of polycrystalline blood films of rats from control group 1 and experimental groups 2 – 4 with different severity of septic pathology were found.

5. The operational characteristics of the diagnostic power of the Stokes-polarimetric microscopy method of polycrystalline blood films of rats of the control and experimental groups were determined.

6. Balanced accuracy is established:

- ♦ differentiation of healthy and sepsis-affected rats;
- ♦ intergroup differentiation of the degree of severity of the septic process in sick rats;
- ♦ intragroup differentiation of patients with rat sepsis.

Prospects for further research.

In our opinion, the research aimed at developing the principles of differential diagnosis of the severity of the septic process by using the digital technique of vector-parametric polarization mapping of fluorescent microscopic images of histological sections of internal organs of laboratory rats will be promising.

ВИКОРИСТАННЯ ВЕКТОР – ПАРАМЕТРИЧНОЇ ФЛУОРЕСЦЕНТНО ПОЛЯРИЗАЦІЙНОЇ МІКРОСКОПІЇ ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРІЗІВ СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ З АБДОМІНАЛЬНИМ СЕПСИСОМ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Буковинський державний медичний університет (м. Чернівці, Україна)

aspirant-surgeon@ukr.net

Метою нашої роботи була розробка і експериментальна апробація нової цифрової методики об'єктивної диференціальної діагностики ступеня важкості абдомінального сепсису шляхом статистичного аналізу флуоресцентних вектор-параметричних поляризаційних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів. Наше дослідження спрямоване на розробку принципів диференціальної діагностики ступеня важкості абдомінального сепсису шляхом використання цифрової методики вектор-параметричного поляризаційного картографування флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів. Така методика базується на установленні діагностично-актуальних взаємозв'язків між розподілами кількості характеристичних значень поляризаційного параметру вектора Стокса флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів і важкістю септичного процесу.

В роботі вперше для диференціальної діагностики ступеня важкості септичного процесу застосовано метод картографування флуоресцентних вектор-параметричних мікроскопічних зображень полікристалічної складової гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів та проведено статистичний аналіз розподілів кількості характеристичних значень вектора Стокса флуоресцентних поляризаційних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів. Визначено взаємозв'язки між величинами статистичних моментів 1-го – 2-го порядків, які характеризують розподіли кількості характеристичних значень вектора Стокса флуоресцентних поляризаційних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів та ступенем важкості абдомінального сепсису. Установлено найбільш чутливі до септичних станів кількісні параметри, які забезпечують реалізацію статистично достовірної диференціації гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів. З позицій доказової медицини установлені операційні характеристики діагностичної сил методу флуоресцентної вектор-параметричної мікроскопії з оцінюванням кількості характеристичних значень четвертого вектора Стокса поляризаційних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів з абдомінальним сепсисом.

Ключові слова: абдомінальний сепсис, селезінка, флуоресцентна мікроскопія, Стокс вектор.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дана робота виконана в рамках планової НДР кафедри загальної хірургії Буковинського державного медичного університету «Персоналізована діагностика та лікування гострої хірургічної та урологічної патології», № державної реєстрації – 0122U002220.

Вступ.

Абдомінальний сепсис (АС) на сьогодні є найбільш складною проблемою ургентної хірургії та головною причиною летальності, яка утримується на досить високому рівні та не має тенденції до зниження і складає від 19 до 70% [1]. Встановлено, що провідна роль в розвитку абдомінального сепсису (АС) належить синдрому ендогенної інтоксикації (СЕІ), який призводить до настання поліорганної недостатності (ПОН) та вторинного імунodefіциту, що при прогресуванні спричиняє смерть хворого [2, 3].

Важливим периферійним органом імунної є селезінка, яка відповідає за формування імунної відповіді, а саме головним джерелом антитіл при потраплення антигену в кров. Саме в селезінці, раніше ніж в інших органах синтезується IgM [4, 5, 6].

Мета дослідження.

Оцінити важкість перебігу абдомінального сепсису шляхом використання цифрової методики вектор-параметричного поляризаційного картографування флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів.

Об'єкт і методи дослідження.

Експериментальні дослідження проведенні на 273 білих нелінійних статевозрілих щурах обох статей масою від 180 до 220 г. Тварин рандомізовано на три дослідні по 39 тварин у кожній та контрольну в кількості 39 тварин групи. Дослідним тваринам 1, 2, та 3 груп АС моделювали за власною методикою [7].

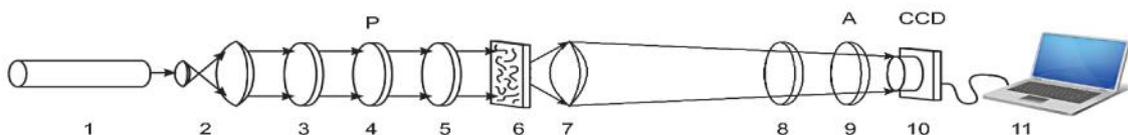


Рисунок 1 - Оптична схема Стокс-поляриметра [9]. Позначення: 1 – He-Ne лазер; 2 – коліматор; 3, 5 – чвертьхвильові платівки; 4 – поляризатор; 6 – об'єкт дослідження – біологічні препарати; 7 – поляризаційний мікрооб'єктив; 8 – поляризаційний аналізатор; 9 – інтерференційний світлофільтр ($\lambda=0,63 \mu\text{m}$); 10 – цифрова CCD камера; 11 – персональний комп'ютер.

Через 12 та 48 год перебігу АС проводили евтаназію тварин з дотриманням вимог Ванкуверської конвенції та проводили забір внутрішніх органів, з яких готували свіжозаморожені гістологічні зрізи.

Експериментальне дослідження було проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Наша [8] методика базується на установленні діагностично-актуальних взаємозв'язків між розподілами кількості характеристичних значень поляризаційного параметру вектора Стокса флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів і важкістю септичного процесу.

Опромінювання проводилось (рис. 1) паралельним пучком ($\varnothing=10^4$ мкм) синього лазера ($\lambda=0.405$ мкм) 1. Поляризаційний фільтр (чвертьхвильова пластинка 3, 5 (виробник – Achromatic True Zero-Order Waveplate) і поляризатор 4 (виробник – V+W Kaesemann XS-Pro Polarizer MRC Nano)) формував право циркулярно поляризований лазерний пучок – когерентний зонд. Зображення плівок крові щурів 6 проектувалися за допомогою поляризаційного мікрооб'єктиву 7 (виробник – Nikon CFI Achromat P, фокусна відстань – 30 мм, числова апертура – 0,1, збільшення – 4x) в площину світлочутливої площадки CCD камери 10 (The Imaging Source DMK 41AU02.AS, monochrome 1/2» CCD, Sony ICX205AL (progressive scan); роздільна здатність – 1280x960; розмір світлочутливої площадки – 7600x6200 мкм; чутливість – 0,05 lx; динамічний діапазон – 8 bit, SNR – 9 bit), світлочутлива площадка якої містить $m \times n = 1280 \times 960$ пікселів. Шляхом обертання осі пропускання аналізатора 8 (виробник – V+W Kaesemann XS-Pro Polarizer MRC Nano) на кути $0^\circ, 90^\circ, 45^\circ$, а також на кут $\Theta = -45^\circ$ відносно осі найбільшої швидкості чвертьхвильові пластинки 8 формувалися умови пропускання лінійно (з азимутами $0^\circ, 90^\circ, 45^\circ$) і ліво циркулярно поляризованих станів флуоресцентного випромінювання, яке виділяв інтерференційний світлофільтр 9 на довжині хвилі $\lambda=0,63 \mu\text{m}$.

Далі згідно розраховувались координатні розподіли величини четвертого параметру вектора Стокса флуоресцентного мікроскопічного зображення біологічного препарату.

З метою більш детального дослідження полікристалічної структури плівок крові щурів ми скористалися наступними методом селекції інформації.

З усієї обчисленої координатної множини значень четвертого параметру $S_4(x, y)$ вектора Стокса цифрового флуоресцентного мікроскопічного зображення об'єкту дослідження формувалися вибірки певних екстремальних (характеристичних) значень – $S_4(x, y)=0$ – максимальний рівень кристалізації оптично анізотропної складової біологічного препарату крові. Методика визначення вибірок екстремальних значень координатного розподілу четвертого параметру $S_4(x, y)$ вектора Стокса цифрового флуоресцентного мікроскопічного зображення плівок крові полягала у наступній послідовності дій. У двовимір-

ному масиві $S_4(x, y)$ здійснювався підрахунок (шляхом сканування вздовж напрямку $n_{i+1}=n_i+1\text{pix}$) кількості (y межах стовпчика $m_i \div m_i + 1\text{pix}$) екстремальних значень – $S_4(x, y)=0$.

Далі визначався відповідний до них розподіл $N(S_4)$: $\{N(S_4=0)=N_1(0), N_2(0), \dots, N_{m-1}(0); N_m(0)\}$. Структура дослідження полікристалічної складової біологічних препаратів крові щурів у диференціальній діагностиці ступеня важкості септичного стану методами цифрової Стокс-поляриметричної флуоресцентної мікроскопії складається з наступних експериментальних та аналітичних дій:

1. Формуються репрезентативні вибірки зразків гістологічних зрізів селезінки наступних груп щурів:

◆ Інтактні щури – “контрольна” група 1 (39 зразків);

◆ Хворі щури (сепсис – легка форма) – “дослідна” група 2:

• тривалість 12 год. (39 зразків) – “дослідна” підгрупа 2.1;

• тривалість 48 год. (39 зразків) – “дослідна” підгрупа 2.2.

◆ Хворі щури (сепсис – середня форма) – “дослідна” група 3:

• тривалість 12 год. (39 зразків) – “дослідна” підгрупа 3.1;

• тривалість 48 год. (39 зразків) – “дослідна” підгрупа 3.2.

◆ Хворі щури (сепсис – важка форма) – “дослідна” група 4:

• тривалість 12 год. (39 зразків) – “дослідна” підгрупа 4.1;

• тривалість 48 год. (39 зразків) – “дослідна” підгрупа 4.2.

2. У межах кожної з чотирьох груп для кожного зразку біологічного препарату гістологічних зрізів селезінки:

• вимірювання координатного розподілу величини четвертого параметру вектора Стокса (параметру кристалізації – ПК) у пікселях цифрового флуоресцентного мікроскопічного зображення;

• визначення розподілів кількості характеристичних значень $\{N(S_4=0)=N_1(0), N_2(0), \dots, N_{m-1}(0); N_m(0)\}$;

• обчислення величини набору статистичних моментів 1-го – 2-го порядків, які характеризують середнє S і дисперсію D розподілів $\{N(S_4=0)=N_1(0), N_2(0), \dots, N_{m-1}(0); N_m(0)\}$.

3. Для одержаних групових множин (середнє S і дисперсія D) визначають середні значення та флуктуації величини статистичних моментів 1-го – 2-го порядків.

4. Для всіх груп біологічних препаратів плівок крові здійснюють перехресний аналіз статистичної достовірності одержаних даних і визначають об'єктивні критерії диференціальної діагностики наявності септичного процесу та ступеня його важкості методом Стокс-поляриметричної флуоресцентної мікроскопії.

Статистичний підхід оцінювання структури вектор-параметричних мап.

Для координатних розподілів кількості характеристичних значень (Φ) четвертого параметру вектора Стокса в площині цифрового флуоресцентного мікроскопічного зображення біологічного препарату обчислювався набір центральних статистичних мо-

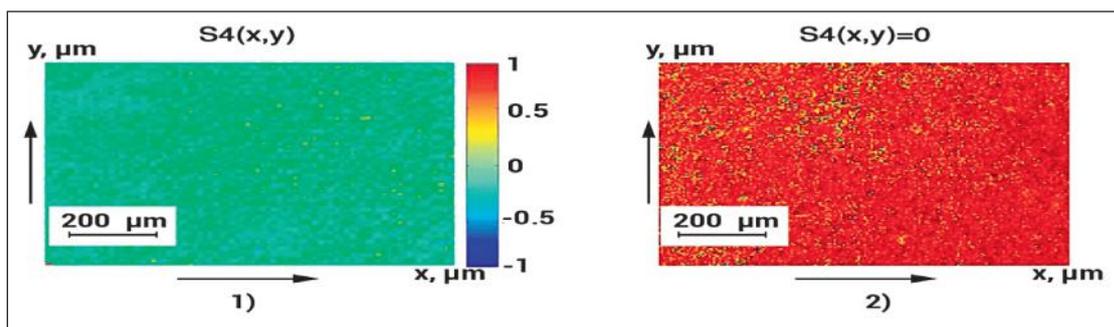


Рисунок 2 – Вектор-параметрична мапа (фрагмент (2)) ПК (фрагмент (1)) флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 1.

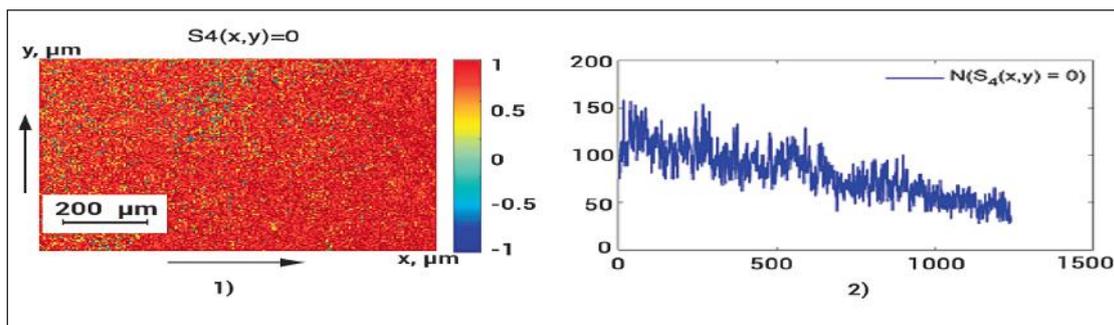


Рисунок 3 – Вектор-параметрична мапа (фрагмент (1)) та розподіл кількості характеристичних значень (фрагмент (2)) ПК в точках флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 1.

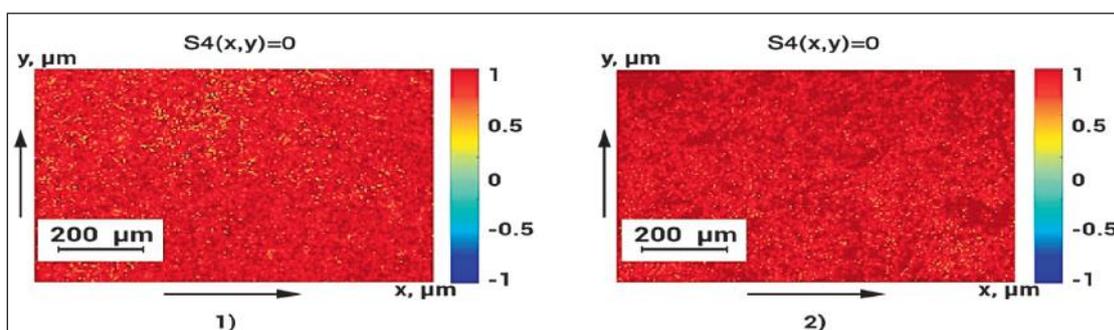


Рисунок 4 – Вектор-параметричні мапи (фрагменти (2),(3)) ПК (фрагмент (1)) флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 2.1 (фрагмент (2)) і групи 2.2 (фрагмент (2)).

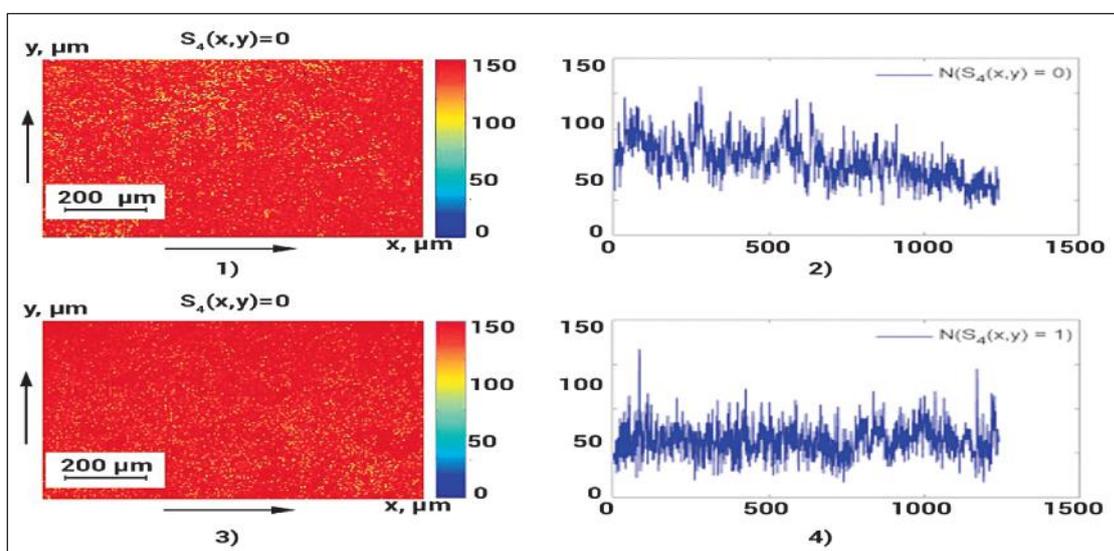


Рисунок 5 – Вектор-параметричні мапи (фрагменти (1),(3)) та розподіли кількості характеристичних значень (фрагменти (2),(4)) ПК в точках флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 2.1 (фрагменти (1),(2)) і групи 2.2 (фрагменти (3),(4)).

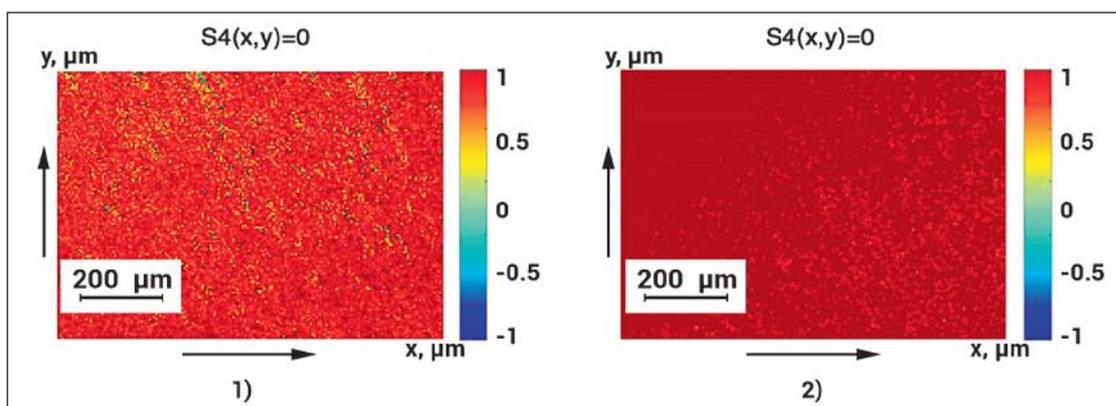


Рисунок 6 – Вектор-параметричні мапи (фрагменти (2),(3)) ПК (фрагмент (1)) флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 3.1 (фрагмент (2)) і групи 3.2 (фрагмент (2)).

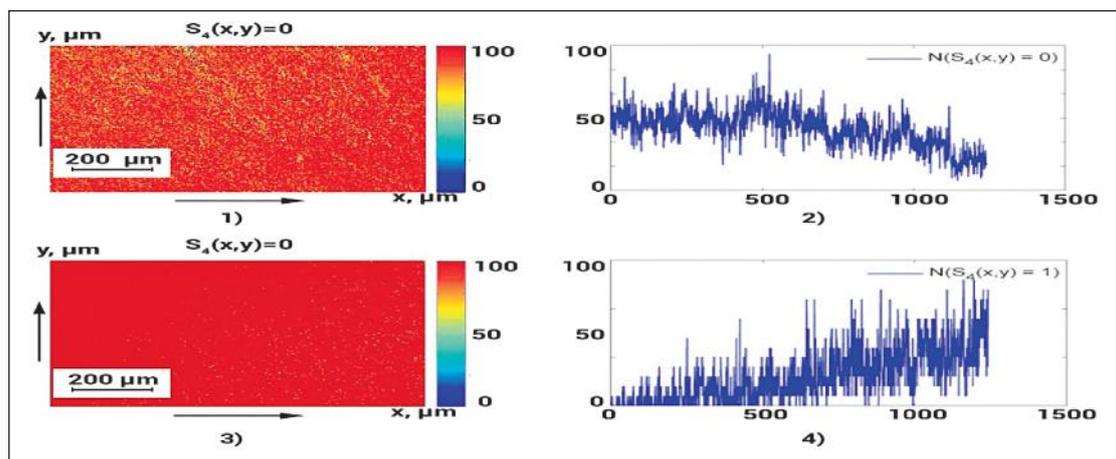


Рисунок 7 – Вектор-параметричні мапи (фрагменти (1),(3)) та розподіли кількості характерних значень (фрагменти (2),(4)) ПК в точках флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 3.1 (фрагменти (1),(2)) і групи 3.2 (фрагменти (3),(4)).

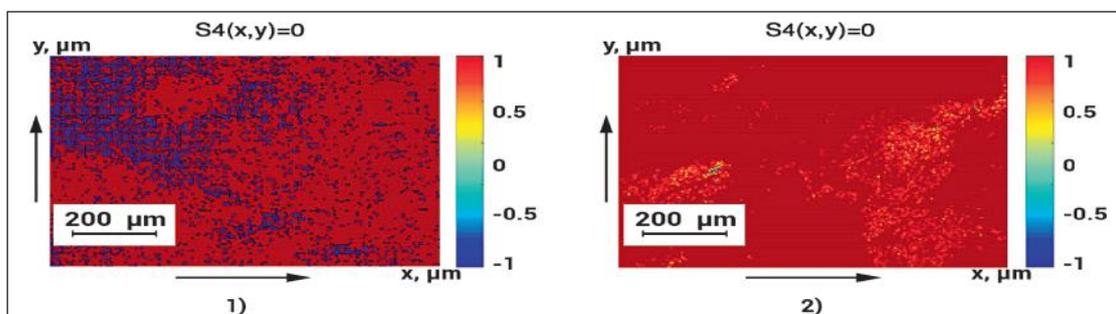


Рисунок 8 – Вектор-параметричні мапи (фрагменти (2),(3)) ПК (фрагмент (1)) флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 4.1 (фрагмент (2)) і групи 4.2 (фрагмент (2)).

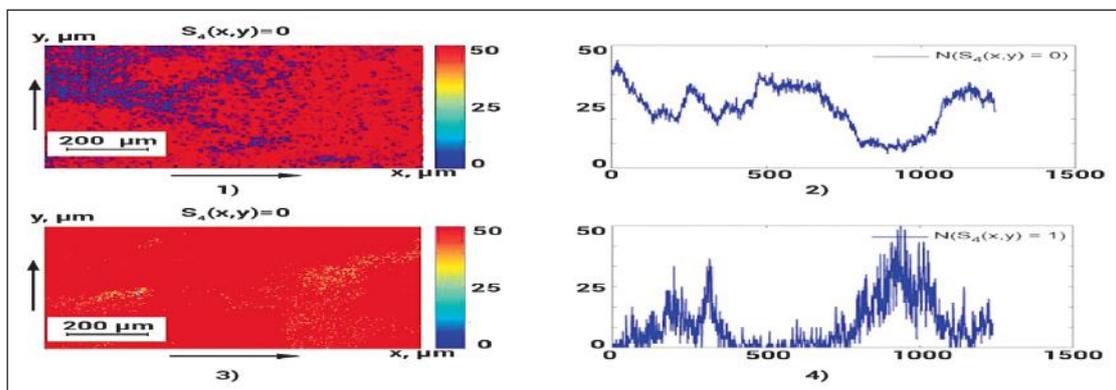


Рисунок 9 – Вектор-параметричні мапи (фрагменти (1),(3)) та розподіли кількості характерних значень (фрагменти (2),(4)) ПК в точках флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 4.1 (фрагменти (1),(2)) і групи 4.2 (фрагменти (3),(4)).

Таблиця 1 – Статистичні параметри вектор-параметричних мап флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки

Групи	Група 1	Група 2		Група 3	
	Інтактні (n=39)	Сепсис (легка) (n=39)		Сепсис (середня) (n=39)	
Тривалість	0 год.	2.1 (12 год.)	2.2 (48 год.)	3.1 (12 год.)	3.2 (48 год.)
Середнє, S	101,3±2,67	75,2±1,45	56,9±1,04	44,7±0,81	28,1±0,62
Дисперсія, D	25,8±0,54	19,6±0,49	13,4±0,32	8,7±0,26	6,2±0,21
	Групи	Група 4			
		Сепсис (легка) (n=39)			
Тривалість		4.1 (12 год.)	4.2 (48 год.)		
Середнє, S		15,3±2,41	12,2±2,38		
Дисперсія, D		4,1±0,66	3,3±0,51		

ментів 1-го – 2-го порядків (S – середнє, D – дисперсія) за аналітичними алгоритмами, формули та структура яких представлені в циклі наукових публікацій [6, 7].

Результати дослідження та їх обговорення.

На серії фрагментів **рис. 2 – рис. 3** представлені вектор-параметричні мапи і розподіли кількості характеристичних значень ПК, які визначені для цифрових флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з контрольної групи 1 інтактних тварин.

Рис.4. – рис. 5 ілюструють дані Сток-поляриметричної мікроскопії – вектор-параметричні мапи і розподіли кількості характеристичних значень ПК цифрових флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 2.1 ((1),(2)) і групи 2.2 ((3),(4)).

На **рис.6 – рис. 7** представлені вектор-параметричні мапи (**рис. 6**) і розподіли кількості характеристичних значень ПК (**рис. 7**), які визначені для цифрових флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 3.1 (фрагменти (1),(2)) і групи 3.2 (фрагменти (3),(4)).

На серії фрагментів **рис. 8 – рис. 9** представлені вектор-параметричні мапи (**рис. 8**) і розподіли кількості характеристичних значень ПК (**рис. 9**), які визначені для цифрових флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів з групи 4.1 (фрагменти (1),(2)) і групи 4.2 (фрагменти (3),(4)).

Порівняльний аналіз результатів поляризаційної вектор-параметричної мікроскопії (**таблиця 1**) полікристалічної складової гістологічних зрізів селезінки виявив:

- наявність розподілів характеристичних значень ПК, які сформовані механізмами оптичної анізотропії зразків з усіх груп;

Таблиця 2 – Ефективність статистичної диференціації вектор-параметричних мап флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки

Групи	Статистична достовірність, p						
	"1-2,3,4" $P_{1(2,3,4)}$	"2-3" P_{23}	"2-4" P_{24}	"3-4" P_{34}	"2.1-2.2" $P_{2(12)}$	"3.1-3.2" $P_{3(12)}$	"4.1-4.2" $P_{4(12)}$
Середнє, S	P<0,05						P>0,05
Дисперсія, D	P<0,05						P>0,05

- залежність структури розподілів величини кількості значень параметру ПК (фрагменти (2),(4)) в точках цифрових флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки від стану щурів – здорових та септично уражених;

- залежність від ступеня важкості септичного процесу середнього та діапазону розкиду кількості характеристичних значень ПК у поляризаційно-відфільтрованих флуоресцентних мікроскопічних зображеннях (фрагменти (2),(4)), відповідно).

З порівняльного аналізу (**таблиця 2**) значень набору статистичних моментів 1-го – 2-го порядків, які характеризують гістограми розподілів фаз у точках флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки виявлено:

1. Центральний статистичний момент 1-го порядку (середнє S):

- середньогрупова величина S у межах сукупності репрезентативних вибірок "група 1 – група 4" зменшується від 101,3 до 12,2;

- міжгрупові відмінності – статистично достовірні ($P_{1-4}, P_{2-3}, P_{3-4}, P_{2-4} < 0,05$);
- внутрішньо групові відмінності для групи 4 – статистично недостовірні ($p > 0,05$).

2. Центральний статистичний момент 2-го порядку (дисперсія D):

- середньогрупова величина дисперсії D у межах сукупності репрезентативних вибірок "група 1 – група 4" зменшується у межах від 25,8 до 3,3;

- міжгрупові відмінності – для всіх груп статистично достовірні ($P_{1-4}, P_{2-3}, P_{3-4}, P_{2-4} < 0,05$);
- внутрішньо групові відмінності для групи 4 – статистично недостовірні ($p > 0,05$).

Висновки.

1. Експериментально апробовано оптичне розташування системи Сток-поляриметричного картографування з вектор-параметричним аналізом флуоресцентних мікроскопічних зображень плівок крові лабораторних щурів.

2. Одержано альбом вектор-параметричних поляризаційних мап і розподілів кількості характеристичних значень параметру кристалізації у точках цифрового флуоресцентного мікроскопічного зображення полікристалічних плівок крові щурів з контрольної групи 1 та дослідних груп 2 – 4 з різною важкістю септичної патології.

3. Визначено статистичну достовірність диференціації вектор-параметричних мап флуоресцентного мікроскопічного зображення полікристалічних плівок крові щурів з контрольної групи 1 та дослідних груп 2 – 4 з різною важкістю септичної патології.

4. Знайдено найбільш діагностично-чутливі статистичні критерії диференціації вектор-параметричних поляризаційних мап флуоресцентного мікроскопічного зображення полікристалічних плівок крові щурів з контрольної групи 1 та дослідних груп 2 – 4 з різною важкістю септичної патології.

5. Визначено операційні характеристики діагностичної сили методу Стокс-поляриметричної мікроскопії полікристалічних плівок крові щурів контрольної та дослідної груп.

6. Установлено збалансована точність:

- ◆ диференціації здорових і хворих на сепсис щурів;
- ◆ міжгрупової диференціації ступеня важкості септичного процесу хворих щурів;
- ◆ внутрішньогрупової диференціації хворих на сепсис щурів.

Перспективи подальших досліджень.

Перспективним, на наш погляд, буде дослідження спрямоване на розробку принципів диференціальної діагностики ступеня важкості септичного процесу шляхом використання цифрової методики вектор-параметричного поляризаційного картографування флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів внутрішніх органів лабораторних щурів.

References / Література

1. Desiateryk VI, Polovyi VP. Vnutrishnoocherevynna infektsiia ta perytonit. Chernivtsi: Meduniversytet; 2019. 218 s. [in Ukrainian].
2. Polovyi VP, Boiko VV, Sydorchuk RI. Perytonit – odvichna problema nevidkladnoi khirurgii. Chernivtsi: Meduniversytet; 2012. 376 s. [in Ukrainian].
3. Boldingh QJ, de Vries FE, Boermeester MA. Abdominal sepsis. Curr Opin Crit Care. 2017 Apr;23(2):159-166.
4. Hecker A, Reichert M, Reuß CJ, Schmoch T, Riedel JG, Schneck E, et al. Intra-abdominal sepsis: new definitions and current clinical standards. Langenbecks Arch Surg. 2019 May;404(3):257-271.
5. Sartelli M, Chichom-Mefire A, Labricciosa FM, Hardcastle T, Abu-Zidan FM, Adesunkanmi AK, et al. The management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections. World J Emerg Surg. 2017;12:29.
6. Blot S, Antonelli M, Arvaniti K, Blot K, Creagh-Brown B, de Lange D, et al. Epidemiology of intra-abdominal infection and sepsis in critically ill patients: "AbSeS", a multinational observational cohort study and ESICM Trials Group Project. Intensive Care Med. 2019 Dec;45(12):1703-1717.
7. Clements TW, Tolonen M, Ball CG, Kirkpatrick AW. Secondary Peritonitis and Intra-Abdominal Sepsis: An Increasingly Global Disease in Search of Better Systemic Therapies. Scand J Surg. 2021 Jun;110(2):139-149.
8. Raillanu S, Solovey Yu, Polovyi V, Dubolazov A, Ushenko Yu, Soltys, I, et al. Vector-parametric structure of polarization images of networks of biological crystals for differential diagnosis of inflammatory processes. Proc. SPIE Applications of Digital Image Processing XLIII. 2020;115102M:1-9.
9. Solovei YuM, Polovyi VP, Solovei MM, Solovei VM, vynakhidnyky; Solovei YuM, Polovyi VP, Solovei MM, Solovei VM, patentovlasnyky. Sposib vektor-parametrychno fluoryscentno poliaryzatsiinoho vyznachennia stupenia vazhkosti abdominalnoho sepsysu. Patent Ukrainy na korysnu model № 150796. 2022 Kvit 16. [in Ukrainian].

ВИКОРИСТАННЯ ВЕКТОР – ПАРАМЕТРИЧНОЇ ФЛУОРЕСЦЕНТНО ПОЛЯРИЗАЦІЙНОЇ МІКРОСКОПІЇ ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРІЗІВ СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ З АБДОМІНАЛЬНИМ СЕПСИСОМ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Соловей Ю. М., Польовий В. П., Соловей М. М.

Резюме. В умовах експерименту на 273 нелінійних білих щурах моделювали абдомінальний сепсис різного ступеню тяжкості: легкий, середній та важкий перебіг. Контрольною групою слугували інтактні тварини. Проводили забір внутрішніх органів та готували гістологічні зрізи селезінки на 12, 48 та 78 години експерименту. Проводили опромінювання паралельним пучком синього лазера. Досліджували структуру полікристалічної складової біологічних препаратів гістологічних зрізів селезінки диференціальної діагностиці ступеня важкості септичного стану методом цифрової Стокс-поляриметричної флуоресцентної мікроскопії. Експериментально апробовано оптичне розташування системи Стокс-поляриметричного картографування з вектор-параметричним аналізом флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки лабораторних щурів. Одержано альбом вектор-параметричних поляризаційних мап і розподілів кількості характеристичних значень параметру кристалізації у точках цифрового флуоресцентного мікроскопічного зображення гістологічних зрізів селезінки з контрольної групи 1 та дослідних груп 2 – 4 з різною важкістю септичної патології. Визначено статистичну достовірність диференціації вектор-параметричних мап флуоресцентного мікроскопічного зображення гістологічних зрізів селезінки з контрольної групи 1 та дослідних груп 2 – 4 з різною важкістю септичної патології. Знайдено найбільш діагностично-чутливі статистичні критерії диференціації вектор-параметричних поляризаційних мап флуоресцентного мікроскопічного зображення гістологічних зрізів селезінки щурів з контрольної групи 1 та дослідних груп 2 – 4 з різною важкістю септичної патології. Визначено операційні характеристики діагностичної сили методу Стокс-поляриметричної мікроскопії флуоресцентних мікроскопічних зображень гістологічних зрізів селезінки щурів контрольної та дослідної груп. Установлено збалансована точність: диференціації здорових і хворих на сепсис щурів; міжгрупової диференціації ступеня важкості септичного процесу хворих щурів; внутрішньогрупової диференціації хворих на сепсис щурів.

Ключові слова: абдомінальний сепсис, селезінка, флуоресцентна мікроскопія, Стокс вектор.

THE USE OF VECTOR – PARAMETRIC FLUORESCENCE POLARIZATION MICROSCOPY OF HISTOLOGICAL SECTIONS OF SPLEEN OF RATS WITH ABDOMINAL SEPSIS IN EXPERIMENT

Solovey Y. M., Polevoy V. P., Solovey M. M.

Abstract. In the experiment, abdominal sepsis of varying severity was modeled on 273 nonlinear white rats: mild, moderate and severe course. Intact animals served as a control group. Internal organs were taken and histological sections of the spleen were prepared at 12, 48 and 78 hours of the experiment. Investigated the structure of the polycrystalline component of biological preparations of histological sections of the spleen differential diagnosis of the severity of septic condition by digital Stokes polarimetric fluorescence microscopy. Experimentally tested the optical arrangement of the Stokes polarimetric mapping system with vector-parametric analysis of fluorescence microscopic images of histological sections of the spleen of laboratory rats. An album of vector-parametric polarization maps and distributions of the number of characteristic values of the crystallization parameter at the

points of digital fluorescence microscopic images of histological sections of the spleen from control group 1 and experimental groups 2 – 4 with different severity of septic pathology was obtained. The statistical reliability of differentiation of vector-parametric maps of fluorescent microscopic images of histological sections of the spleen from control group 1 and experimental groups 2 – 4 with different severity of septic pathology was determined. The most diagnostically sensitive statistical criteria for the differentiation of vector-parametric polarization maps of fluorescence microscopic images of histological sections of the spleen of rats from control group 1 and experimental groups 2 – 4 with different severity of septic pathology were found. The operational characteristics of the diagnostic power of the method of Stokes polarimetric microscopy of fluorescence microscopic images of histological sections of the spleen of rats of control and experimental groups were determined. The balanced accuracy of: differentiation of healthy and septic rats; intergroup differentiation of the severity of the septic process of sick rats; intragroup differentiation of septic rats was established.

Key words: abdominal sepsis, spleen, fluorescence microscopy, Stokes vector.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Solovey Y. M.: [0000-0002-0269-6967](https://orcid.org/0000-0002-0269-6967)^{ABCD}

Polevoy V. P.: [0000-0002-4345-9802](https://orcid.org/0000-0002-4345-9802)^{EF}

Solovey M. M.: [0000-0003-0137-7531](https://orcid.org/0000-0003-0137-7531)^{BC}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The Authors declare no conflict of interest / Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Solovey Yuriy Mykolayovych / Соловей Юрій Миколайович

Bukovinian State Medical University / Буковинський державний медичний університет

Ukraine, 58000, Chernivtsi, 2 Teatralna sq / Адреса: Україна, 58000, м. Чернівці, Театральна пл. 2

Tel.: +380680913632 / Тел.: +380680913632

E-mail: aspirant-surgeon@ukr.net

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 15.06.2022 / Стаття надійшла 15.06.2022 року
Accepted 14.11.2022 / Стаття прийнята до друку 14.11.2022 року