

УДК 57.043:577.1:612.014.464

Н.В. МАРЧЕНКО<sup>1</sup>, Т.С. ДЮБКО<sup>2</sup>, В.С. МАРЧЕНКО<sup>2\*</sup>, А.П. БЕЛОНОЖКО<sup>2</sup>, Т.П. ЛИННИК<sup>2</sup>, Е.А. ЯКОВЛЕВА<sup>2</sup>,  
Н.Н. ЧУБ<sup>2</sup>, М.И. ЕГОРОВ<sup>2</sup>, А.Б. АРТЕМЕНКО<sup>3</sup>

## Применение фрактального анализа при оценке изменения макроструктуры дегидратированных биологических жидкостей

UDC57.043:577.1:612.014.464

N.V. MARCHENKO<sup>1</sup>, T.S. DYUBKO<sup>2</sup>, V.S. MARCHENKO<sup>2\*</sup>, A.P. BELONOZHKO<sup>2</sup>, T.P. LINNIK<sup>2</sup>,  
E.A. YAKOVLEVA<sup>2</sup>, N.N. CHUB<sup>2</sup>, M.I. EGOROV<sup>2</sup>, A.B. ARTEMENKO<sup>3</sup>

## Application of Fractal Analysis to Estimate Macrostructure Change of Dehydrated Biological Fluids

Показано, что фации дегидратированных биологических жидкостей (БЖ) человека и животных (слюна, плазма крови, спермальная плазма, экстракты плаценты и др.) имеют характерную структуру, чувствительны к источнику и способам получения, а также к различным типам физико-химических воздействий как *in vitro*, так и *in vivo*. Предложен способ количественного описания изменений макроструктуры дегидратированных БЖ, основанный на фрактальном анализе изображений фаций. Описан алгоритм программного комплекса для контрастирования морфометрии и расчёта фрактальных размерностей изображений препаратов для микроскопии.

**Ключевые слова:** биологическая жидкость, фации, ритмические холодовые воздействия, замораживание, фрактальная размерность.

Показано, що фазії дегідратованих біологічних рідин (БР) людини та тварин (слина, плазма крові, спермальна плазма, екстракти плаценти тощо) мають характерну структуру, чутливі до джерела і способів одержання, а також до різних типів фізико-хімічних впливів як *in vitro*, так і *in vivo*. Запропоновано спосіб кількісного опису змін макроструктури дегідратованих БР, заснований на фрактальному аналізі зображень фазій. Описано алгоритм програмного комплексу для контрастування морфометрії та розрахунку фрактальних розмірностей зображень препаратів для мікроскопії.

**Ключові слова:** біологічна рідина, фазії, ритмічні холодіві впливи, заморожування, фрактальна розмірність.

It has been shown that the facies of dehydrated biological fluids (BF) of humans and animals (saliva, blood plasma, sperm plasma, placenta extracts et al.) have the characteristic structure, are sensitive to deriving source and methods, as well as to different types of physical-chemical effects not only *in vitro* but also *in vivo*. The method of quantitative description of macrostructural changes of dehydrated BF has been proposed, based on fractal analysis of facies images. The algorithm of software complex for contrasting, morphometry and computation of fractal dimensions for images of the smears for microscopy has been described.

**Key-words:** biological fluid, facies, rhythmic cold effects, freezing, fractal dimension.

В последние годы структурное состояние биологических жидкостей (БЖ) под влиянием физико-химических факторов и при различных патологиях является предметом интенсивных исследований [6, 8, 11, 16]. Существующие методы анализа конформационного состояния макромолекул (ИК-спектроскопия или рентгеноструктурный анализ) позволяют расшифровывать структуру или конформационное состояние высокоочищенных образцов [9], но являются менее информативными при анализе смесей различных белков и других органических молекул. В ряде

Recently the structural condition of biological fluids (BF) under the effect of physical-chemical factors and at different pathologies has been the subject of intensive researches [6, 8, 11, 16]. Their actuality is determined by the fact that the existing methods of analysis of the conformation condition of macromolecules (IR spectroscopy or X-ray crystal structure analysis) enable to determine the structure or conformation condition of the highly purified samples [9], but are less informative when analyzing the mixtures of different proteins and other organic molecules. In some cases for integral characteristic of BF, exposed to

<sup>1</sup>Харьковский национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>3</sup>Институт птицеводства УААН, г.Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>Kharkov National Technical University "Kharkov Polytechnical Institute", Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>3</sup> Institute of Poultry Breeding, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 30-07, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

случаев для интегральной характеристики БЖ, подвергшихся различным типам воздействий, необходимы простые и доступные экспресс-методы. К ним относится метод, позволяющий получить при высыхании раствора БЖ на предметном стекле пленки – фации. Метод основан на самоорганизации компонентов БЖ, представляющих собой изменчивую, высокодинамичную структуру [1, 2], при этом морфологическая картина высохшего образца является специфичной и отражает на макроструктурном уровне межмолекулярные взаимодействия в исследуемом образце. Фации БЖ, содержащих белки, имеют несколько концентрических зон, в которых по краю располагаются белки, а в центре – соли, а также другие минеральные и низкомолекулярные компоненты. Соотношение ширины зон фации в достаточно широком интервале концентраций коррелирует с количеством белков и солей в образце. После испарения из образца свободной (объемной) и части слабо связанной с белками воды по краям фации, в области концентрирования белков, возникают сильные процессы растяжения и сжатия в результате изменения конформационного состояния белков, которые приводят к появлению трещин. Фации плазмы крови здорового человека растрескиваются по радиусам через относительно равные промежутки, края трещин загибаются и образуют характерные аркады [1]. При наличии в БЖ токсических веществ часто наблюдают появление характерных «языков Арнольда» (патологических элементов) в краевой зоне.

Показано, что оксигенирование и озонирование размороженной плазмы крови могут восстанавливать нарушенную структуру фации [16]. Описан метод анализа кристаллизации компонентов ротовой жидкости у больных, страдающих различными формами сахарного диабета [6]. Предпринимаются попытки применять для медицинской диагностики дегидратированные растворы цельной крови [4].

В то же время анализ наблюдаемых изменений в большинстве случаев носит описательный, визуально-логический характер, что не позволяет проводить количественные оценки и компьютеризировать метод. Исследователи часто ограничиваются изучением внешнего вида высохшей капли раствора БЖ под световым микроскопом в сравнении со стандартом [8]. Для широкого применения данного метода с научными и медико-диагностическими целями необходима количественная оценка. В работах [6, 7, 11] анализируется структура фаций с использованием методов математического анализа, кристаллографических подходов [11]. В последнее время при количественной оценке параметров реальных кристал-

different types of effects, the simple and available express-methods are necessary. Among these there is the method enabling to derive the facies at BF solution drying on the object-plate. The method is based on self-organization of BF components, representing the changeable highly dynamic structure, herewith the morphologic picture of the dried sample is specific and indicates intermolecular interactions at macrostructural level in the investigated sample. Facies of BF containing proteins have several concentric zones where the proteins are set on the periphery, and salts are in the middle, as well as other mineral and low molecular components. The ratio of facies zones' width in reasonably wide interval of concentrations is correlated with the proteins' and salts' numbers in the sample. After vaporation out of the sample of free (volumetric) and a part of low-bound water with the proteins on the periphery of facies within the range of protein concentrating the strong processes of extension and pressure are appeared as a result of conformation condition of proteins leading to the appearance of cracks. Blood plasm facies of healthy person are cracked on radiuses in quite equal intervals, the edges of cracks are bended and form characteristic arcades [1]. In the presence of toxic substances in BF the appearance of characteristic "Arnolds' tongues" (pathologic elements) in marginal zone is often observed.

It has been shown that oxygenation and ozonation of frozen plasma of blood may reconstruct the broken structure of facies [16]. The method of crystallization analysis of oral fluid components in the patients affected with different forms of Diabetes mellitus has been described [6]. Efforts are done to use dehydrated solutions of whole blood for the medical diagnostics [4].

At the same time the analysis of observed damages generally has a descriptive visually logic character, that does not enable to derive the quantitative specifications and computerize the method. Investigators are often limited with external view for studying of dried drop solution of BF under light microscope in comparison with the standard [8]. For a wide use of this method with scientific and medical-diagnostic aims the quantitative specification is necessary. In papers [6, 7, 11] the facies structure is analyzed with use of mathematics analysis methods and crystallographic approaches [11]. Recently at quantitative specification of real crystals parameters (they usually have very high deviations from a normal Euclidean polyhedrons form) they find utmost idea use of fractal geometry. The measure characterizing the deviation of filling extent with crystal in comparison with ideal crystal is its fractal dimension.

The research aim is a development of the quantitative description method of macrostructural

лов (они часто имеют очень сильные отклонения от правильной формы евклидовых многогранников) находят всё большее применение идеи фрактальной геометрии. Мерой, характеризующей отклонение степени заполнения кристаллом пространства по сравнению с идеальным кристаллом, является его фрактальная размерность.

Цель работы – разработка метода количественного описания изменений макроструктуры дегидратированных БЖ, основанного на компьютерном анализе изображений фаций и вычислении их фрактальных размерностей.

### Материалы и методы

Образцы слюны и мочи получали от пациентов, находящихся на амбулаторном лечении в Институте озонотерапии и медоборудования (г. Харьков).

Из плаценты рожениц получали: а – свежие водно-солевые экстракты; б – водно-солевые экстракты по методу Филатова (с предварительной выдержкой при температуре 4°C в течение 5 дней); в – экстракты, полученные по методу Филатова и подвергнутые автоклавированию при 125°C (40 мин). Фолликулярную жидкость брали от пациенток методом пункции [5].

Спермальную плазму собак получали из объединенных 1-й и 2-й, а также из отдельно полученной 3-й фракции спермы здоровых кобелей породы «ротвейлер». Спермальную плазму птиц (Институт птицеводства УААН, с. Борки) получали из 15 объединенных образцов спермы здоровых петухов породы «род-айланд» и 20 объединенных образцов спермы индюков. Плазму от клеток отделяли центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин. Опытные образцы спермальной плазмы собак и птиц замораживали до -20°C в морозильной камере «Минск» и до -196°C погружением в жидкий азот, хранили в течение месяца при этих же температурах, а затем размораживали на водяной бане при 37°C.

Сыворотку получали из крови крыс после ритмических холодových воздействий (РХВ) разной длительности (10, 20 и 65 мин), осуществляемых с помощью промышленного гипотермогенератора [12]. При этом животных, помещенных в контейнеры объемом 2 л, обдували потоком холодного воздуха с температурой 10°C, частотой 0,1 Гц.

Фации исследуемых образцов получали нанесением на предметное стекло 5-6 капель (по 5 мкл) анализируемого раствора каждого вида БЖ и высушиванием на воздухе при комнатной температуре (20°C) в течение 24 ч [2].

Все исследования проведены в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2004, Украина)

damages of dehydrated BF based on computer analysis of facies image and calculation of their fractal dimensions.

### Materials and methods

Samples of saliva and urine obtained from the patients been at ambulatory medical care at the Institute of Ozone Therapy and Medical Equipment of Kharkov.

From parturient placenta there were obtained: a – fresh water-saline extracts; b – water-saline extracts obtained by Filatov's method (with pre-exposure at 4°C for 5 days); c – extracts obtained by Filatov's method and put to autoclaving at 125°C for 40 min. Follicular fluid as punctured from the patients [5].

Canine sperm plasma was obtained from total 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> as well as from singly obtained 3<sup>rd</sup> fraction of healthy canine sperm of Rottweiler breed. Bird's sperm plasma (Institute of poultry breeding, Borki) obtained from 15 total samples of healthy fowl sperm of Rhode-Island breed and 20 total samples of turkey sperm. Plasma from the cells was taken out with centrifugation at 1000 g for 10 min. Experimental samples of dogs' and birds' sperm plasma were frozen to -20°C in "Minsk" freezing chamber and up to -196°C by plunging into liquid nitrogen were stored for a month at these temperatures and then were thawed on water bath at 37°C.

Serum was obtained from rats blood after rhythmic cold effects (RCE) of different time (10, 20 and 65 min), realized with industrial hypothermogenator [12]. Herewith the animals, placed into 2 l containers were blew over with flux of cold air with 10°C, 0.1 Hz frequency.

The facies of investigated samples were obtained with applying (by 5 µl) on object-plate of 5-6 drops of analyzed solution of each kind of BF and drying on air at 20°C room temperature for 24 hrs [2].

All experiments were carried out according to "General ethical principles of experiments in animals" certified by the II National congress for bioethics (2004, Kiev, Ukraine) and confined with regulations of "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985).

For mathematical processing of the images of dried drops with MBI-15 light microscope, equipped with Panasonic WV-CP470 telecamera, were entered and saved as bmp format. For each facies image in MS Power Point environment we choose the trajectory and transfer time along monitor screen for analyzed facies area image. Using a Techsmith Snagit 5.2.0 software of moving image capturing we have developed the video file with such parameters: density is 50 frames per second, size of scanner frame is 0.1 of scanned image, which we saved in bmp format with Virtualdub 1.6. Facies analyzed image was broken up

и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Для математической обработки изображения высохших капель с помощью светового микроскопа МБИ-15, оснащенного телекамерой Panasonic WV-CP470, вводили в компьютер и сохраняли в формате bmp. Для каждого изображения фации в среде MS Power Point выбирали траекторию и время перемещения по экрану монитора изображения анализируемой области фации. Используя программу захвата движущегося изображения Techsmith Snagit 5.2.0, создавали видеофайл с параметрами: частота – 50 кадров в секунду, размер сканирующего кадра – 0,1 сканируемого изображения, который сохраняли в формате bmp с помощью программы Virtualdub 1.6. Анализируемое изображение фации разбивалось на  $n$  кадров ( $n = 600–1000$ ), каждый из которых с помощью разработанного нами программного комплекса FRAM переводили в цифровые матрицы. Используя известный математический аппарат [3, 10, 13–15], стандарты и принципы построения алгоритмов программ для анализа изображений [15] рассчитывали морфометрические параметры, фрактальные размерности и статистические показатели.

Программный комплекс FRAM имеет модульную структуру, блок-схема алгоритма которого приведена на рис. 1.

Фрактальный анализ каждого кадра (модуль 12) начинали с загрузки изображения в рабочую область программного комплекса (модуль 13). Входное изображение представлялось в виде матрицы  $I$ , размером  $m \times n$ , где  $m$  – число строк,  $n$  – число столбцов дискретного поля зрения – кадра  $V$ . Область  $V$  можно рассматривать как растр, матрицу  $I$  – как неотрицательную целочисленную функцию на растре. Значение  $I(i, j)$  равно яркости в точке  $(i, j) \in V$ ,  $0 \leq I(i, j) \leq I_{\max}$ ,  $i = 0, 1, \dots, m-1$ ,  $j = 0, 1, \dots, n-1$ . Здесь  $I_{\max}$  – максимальное целочисленное значение яркости. Функцию  $I(i, j)$  называют цифровым изображением на растре  $V$ .

В среде FRAM автоматически строится гистограмма яркости изображения и рассчитываются его обобщенные параметры (минимальная и максимальная яркость, уровень адаптации и контрастность). Контрастность изображения:

$$K = \sum_{i=0}^{255} \left| \frac{L_i^2 - L_0^2}{L_i^2 + L_0^2} \right| p(L_i), \quad (1)$$

где  $L_i$  – яркость (от 0 до 255);  $L_0$  – уровень адаптации, численно равный математическому ожиданию, определяемому по гистограмме яркостей изображения.

into  $n$  frames ( $n = 600–1000$ ), each of those were transformed to numeral matrices due to developed by us FRAM program complex. Using the known mathematical apparatus [3, 10, 13–15], standards and principles of constructing the program algorithms for image analysis [15], morphometric parameters, fractal dimensions and statistical indices.

FRAM software complex has a modular structure, the flow diagram of algorithm was given in Fig. 1.

Fractal analysis of each frame (12 module) was started from loading the image into operating area of software complex (13 module). Entry image was presented as  $I$  matrix, of  $m \times n$  size, where  $m$  is the number of lines;  $n$  – number of columns of discrete vision field, frame  $V$ .  $V$  area may be considered as the raster,  $I$  matrix as non-negative integral function on the raster. Value  $I(i, j)$  equal brightness in point  $(i, j) \in V$ ,  $0 \leq I(i, j) \leq I_{\max}$ ,  $i = 0, 1, \dots, m-1$ ,  $j = 0, 1, \dots, n-1$ . Here  $I_{\max}$  – maximum integral value of brightness. Function  $I(i, j)$  is qualified as digital image on  $V$  raster.

In FRAM area histogram of image brightness is plotted automatically and its total parameters are calculated (minimum and maximum brightness, adaptation level and contrast ratio). Contrast ratio of image:

$$K = \sum_{i=0}^{255} \left| \frac{L_i^2 - L_0^2}{L_i^2 + L_0^2} \right| p(L_i), \quad (1)$$

where  $L_i$  – brightness (from 0 up to 255);  $L_0$  – adaptation level of numerically equal to mathematical expectation determined by histogram of image brightness.

Further work of software complex consists in the selection of method and formulas for calculation of fractal dimensions (15-17 modules) for data sizes of “window” and “step” of scanning (18 module). At this moment in software complex the “prism” method [15, 17], calculation of  $D$  fractal dimension,  $D_1$  information dimension and  $D_2$  correlation dimension have been realized.

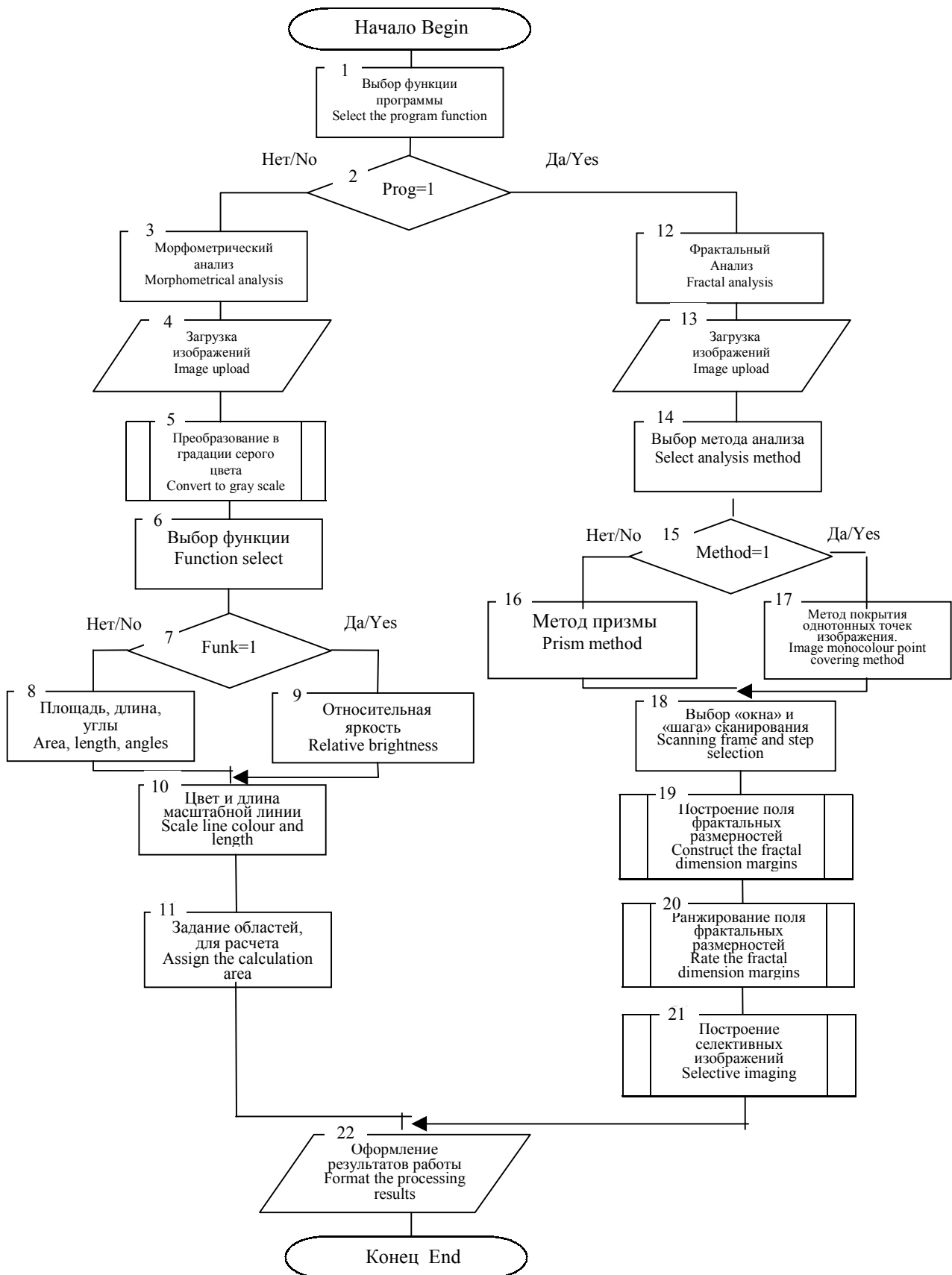
$D$  value characterizes the filling volume, where the physical system (in this work this is facies) exists:

$$D = -\lim_{l \rightarrow 0} \frac{\ln N(l)}{\ln l}, \quad (2)$$

where  $N$  – cells number of different sizes (with  $l$  side), which is necessary for covering of the investigated range (facies areas).

$D_1$  value called as information dimension is shown as information, which is necessary for determining of point location in cell increase when approaching the cell size  $\varepsilon$  to 0:

$$D_1 = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\sum_{i=1}^{N(\varepsilon)} p_i \ln p_i}{\ln \varepsilon}, \quad (3)$$



**Рис. 1.** Блок-схема алгоритма программного комплекса FRAM для анализа и морфометрии микроскопических изображений биопрепаратов.

**Fig. 1.** The diagram flow of FRAM software complex algorithm for analysis and morphometry of microscopic images of biological products.

Дальнейшая работа программного комплекса заключается в выборе метода и формул расчета фрактальных размерностей (модули 15-17) для заданных размеров «окна» и «шага» сканирования (модуль 18). В программном комплексе в настоящий момент реализованы метод «призмы» [15, 17], расчет фрактальной размерности  $D$ , информационной размерности  $D_1$  и корреляционной размерности  $D_2$ .

Величина  $D$  характеризует степень заполнения пространства, в котором существует физическая система (в данной работе фация),

$$D = -\lim_{l \rightarrow 0} \frac{\ln N(l)}{\ln l}, \quad (2)$$

где  $N$  – количество ячеек разных размеров (со стороной  $l$ ), необходимое для покрытия изучаемого множества (области фации).

Величина  $D_1$ , называемая информационной размерностью, показывает, как информация, необходимая для определения местоположения точки в ячейке, возрастает при стремлении размера ячейки  $\varepsilon$  к 0:

$$D_1 = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\sum_{i=1}^{N(\varepsilon)} p_i \ln p_i}{\ln \varepsilon}, \quad (3)$$

Величина  $D_2$ , называемая корреляционной размерностью, является оценкой вероятности того, что две случайные точки множества находятся в одной ячейке  $\varepsilon$ :

$$D_2 = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln \sum_{i=1}^{N(\varepsilon)} p_i^2}{\ln \varepsilon}. \quad (4)$$

После выбора методов и формул расчета  $D$  строили поле фрактальных размерностей (ПФР) (модуль 19), процесс формирования которого показан на рис. 2.

При построении ПФР сканируют изображение  $I(i, j)$  «окном»  $W$ , размером  $a \times b$  пикселей с шагом перемещения  $s$ . На каждом шаге определяют фрактальные размерности  $D_{i,j}$  в «окне»  $W$  и записывают в матрицу  $D$ , которую называют ПФР.

Анализ ПФР может осуществляться автоматически с помощью методов сегментации (модуль 20), к которым относится реализованный в программе метод «к-дерева» [15]. Для сегментации ПФР определяют диапазон изменения фрактальных размерностей ( $\Delta D = D_{\max} - D_{\min}$ ). Затем производят построение первого уровня «к-дерева». При этом весь диапазон значений фрактальных размерностей  $\Delta D$  разбивают на  $k$  поддиапазонов первого уровня разбиения ( $\Delta D_1, \Delta D_2, \dots, \Delta D_k$ ), значения фрактальных размер-

$D_2$  value called as correlation of dimension is the estimation of probability about the fact that two random points of the range are in the same  $\varepsilon$  cell:

$$D_2 = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln \sum_{i=1}^{N(\varepsilon)} p_i^2}{\ln \varepsilon}. \quad (4)$$

After selection of the methods and formulas of  $D$  calculating we plotted the margin of fractal dimensions (MFD) (19 module) which process of formation has been shown in Fig.2.

When plotting MFD  $I(i, j)$  the image was scanned with  $W$  “window”,  $a \times b$  pixels’ size with  $s$  step of moving. At each step  $D_{i,j}$  fractal dimensions were determined in  $W$  “window” and were entered in  $D$  matrix, which is called as MFD.

MFD analysis may be automatically realized with segmentation methods (20 module) “k-tree” method realized in the program [15]. For segmentation of MFD the damage range of ( $\Delta D = D_{\max} - D_{\min}$ ) fractal dimensions were determined. Then the plotting of the first level of “k-tree” was made. At this all value range of  $\Delta D$  fractal dimensions were divided into  $k$  subranges of the first level of quantisation ( $\Delta D_1, \Delta D_2, \dots, \Delta D_k$ ), the value of fractal dimensions are round off to the first decimal place, the subrange extent will be equal to 0.1. For each subrange of the first level of quantisation the selective images were plotted (21<sup>st</sup> module). Then the subrange was selected with containing maximal clusters’ number of fractal dimensions. Initial values of fractal dimensions of MFD were round off to the second decimal place but analyzed subrange of the first level was divided into 10 subranges of the second level of ( $\Delta D_{11}, \Delta D_{12}, \dots, \Delta D_{1k}$ ), quantisation at this extent of subrange of the second level will be equal to 0.01. Image segmentations are repeated according to determining (rounding off) efficiency of fractal dimensions and desired degree of detailing. “K-tree” method for image segmentation enables to point out the clusters with the same dimension and to contrast

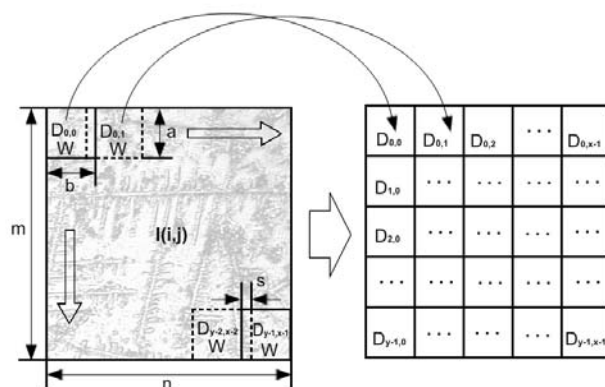


Рис. 2. Схема процесса построения ПФР.

Fig.2. Diagram of plotting MFD process.

ностей округляют до первого знака после запятой, протяженность поддиапазона будет равна 0,1. Для каждого поддиапазона первого уровня разбиения  $\Delta D_1, \Delta D_2, \dots, \Delta D_k$  строят селективные изображения (модуль 21). Затем выбирают поддиапазон, содержащий максимальное количество кластеров фрактальных размерностей. Исходные значения фрактальных размерностей ПФР округляют до второго знака после запятой, а анализируемый поддиапазон первого уровня разбивают на 10 поддиапазонов второго уровня разбиения  $\Delta D_{11}, \Delta D_{12}, \dots, \Delta D_{1k}$ , при этом протяженность поддиапазона второго уровня равна 0,01. Сегментации изображения повторяются в зависимости от точности определения (округления) фрактальных размерностей и необходимой степени детализации. Метод «к-дерева» для сегментации изображений позволяет выделять кластеры с одинаковой размерностью, контрастировать изображения и находить визуально не определяемые особенности.

Селективные изображения, соответствующие различным уровням «к-дерева» и диапазонам фрактальных размерностей, выводят в отдельные окна программного комплекса в виде изображения, предусмотрен их морфометрический анализ (модули 3–11). Все изображения сохраняются в отдельных файлах (модуль 22), могут быть скопированы для использования в текстовых и графических редакторах и применяться для построения 3D-моделей.

### Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 3–6, морфологические характеристики фаций дегидратированных БЖ человека и животных (слюны, мочи, фолликулярной жидкости, спермальной плазмы животных, экстрактов плаценты, плазмы крови крыс), являясь специфичными для данного образца, существенно зависят не только от источника, но и от способа получения и обработки. Фации ЭП, полученные из свежесыводенной плаценты (рис. 4, а) и по методу Филатова, подобны по своему внешнему виду. В то же время фация ЭП (рис. 4,

images and find out visually not determinable properties.

Selective images associated to different levels of “k-tree” and fractal dimensions ranges were displayed in single windows of software complex as image its morphometric analysis (3<sup>rd</sup>–11<sup>th</sup> modules) has been provided. All images were saved into single files (22 module) and could be copied for use as text and graphics and used for 3D modeling.

### Results and discussion

Figures 3–6 demonstrate the morphologic characteristics of facies of dehydrated biological fluids (BF) of humans and animals (saliva, urine, follicular fluid, sperm plasma of animals, placenta extracts, blood plasma of rats) being specific for data sample essentially depend not only on the source, but on producing method and treatment. EP facies derived from freshly isolated placenta (Fig. 4, a) and the one by Filatov’s method are similar to their external view. At that time EP facies (Fig. 4, b) derived by Filatov’s method has thicker edges and smaller crystals in central zone that points to the utmost content of proteins in the sample. On the contrary, into composition of autoclaved and filtered EPs the high molecular proteins are not included, and low molecular peptides, nucleotides and salts dominate. One can see this because of plain edge of facies and large crucial crystals in its center (Fig. 4, c).

Different regimens of low-temperature treatment and storage affect morphologic properties of dried samples of BF facies. In Fig. 5 the facies of sperm plasma of animals slowly frozen up to  $-20^{\circ}\text{C}$  and quickly frozen with different rates stored at equal temperatures have been shown. One may see that slow freezing and further storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  render maximal effect on macrostructure of all thawed samples without distinction of animal species. Appearance of facies, quickly frozen and stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ , approaches to the control samples specimen. Macrostructure of dehydrated BF provides a high sensibility not only to physical-chemical *in vitro* effect, but also at the level of the whole organism. Fig.6 shows the effect of RCE 10, 20 and 65 min time on macrostruc-

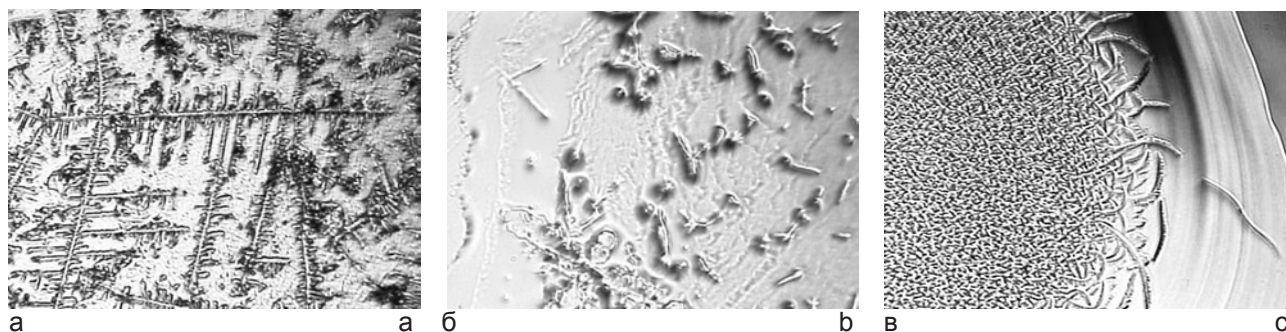
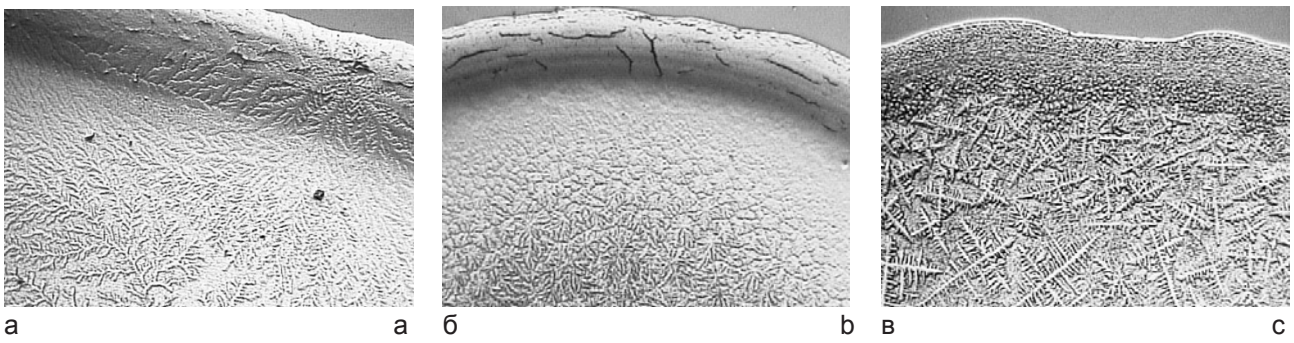


Рис. 3. Вид фаций слюны (а); мочи (б); фолликулярной жидкости (в) человека. Увеличение: (а) и (б) 40; (в) 15.

Fig. 3. Image of saliva facies (a), urine (b) and human follicular fluid (c). Magnification: (a) and (b) 40; (c) 15.



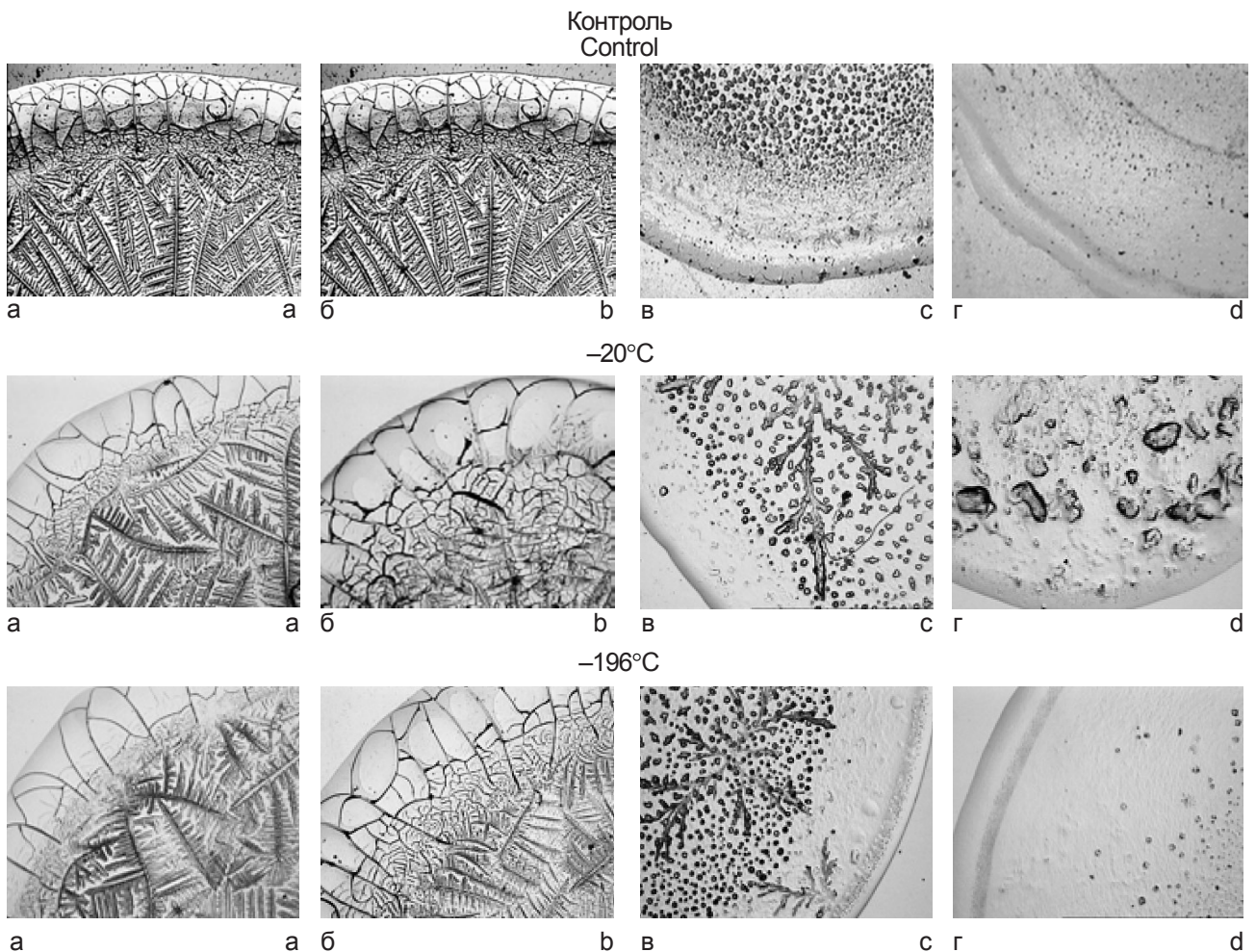
**Рис. 4.** Влияние способов получения экстрактов плаценты на их фации: а – свежевыделенного; б – по Филатову; в – автоклавированного. Увеличение 15.

**Fig. 4.** Effect of the methods of placenta extracts deriving on their facies: a – freshly isolated; b – by Filatov's method; c – autoclaved. Magnification 15.

б), полученная по методу Филатова, имеет более толстые края и более мелкие кристаллы в центральной зоне, что отражает большее содержание в образце белков. Напротив, в состав автоклавированного и профильтрованного ЭП не входят высокомолекулярные белки, преобладают низкомолекулярные пептиды, нуклеотиды и соли. Это

structure of dehydrated blood serum of rats. It is seen that RCE of different length renders various effects on structure of intermolecular interactions in rat's blood serum which may be associated with the compensatory effect of different adaptive mechanisms.

Since during facies' formation, there are physical processes, resulting in formation of fractally organized



**Рис. 5.** Фации спермальной плазмы собаки 1 и 2-й фракций (а) и 3-й фракции (б); спермальной плазмы петуха (в); индюка (г) в норме, а также после замораживания спермальной плазмы до  $-20$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  и хранения при соответствующих температурах в течение 1 месяца. Увеличение 15.

**Fig. 5.** Facies of sperm plasma of dog (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> fractions) (a) and 3<sup>rd</sup> fraction (b) sperm plasma of flow (c), turkey (d) normal and after freezing of sperm plasma down to  $-20$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  and storage at corresponding temperatures for 1 month. Magnification 15.



видно по плоскому краю фации и крупным крестообразным кристаллам в ее центре (рис. 4, в).

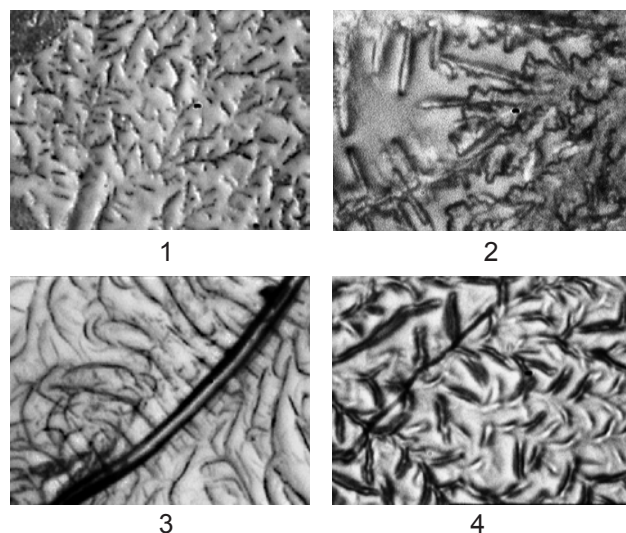
На морфологические свойства высушенных образцов фаций БЖ влияют разные режимы низкотемпературной обработки и хранения. На рис. 5 показаны фации спермальной плазмы животных, медленно замороженные до  $-20^{\circ}\text{C}$  и быстро замороженные с различными скоростями и хранившиеся при соответствующих температурах. Можно видеть, что медленное замораживание и последующее хранение при  $-20^{\circ}\text{C}$  оказывают наибольшее влияние на макроструктуру всех размороженных образцов, вне зависимости от вида животного. Вид фаций, быстро замороженных и хранившихся при  $-196^{\circ}\text{C}$ , приближается к виду контрольных образцов. Макроструктура дегидратированных БЖ проявляет высокую чувствительность не только к физико-химическим воздействиям *in vitro*, но и на уровне целого организма. На рис. 6 показано влияние РХВ длительностью 10, 20 и 65 мин на макроструктуру дегидратированной сыворотки крови крыс. Видно, что РХВ различной длительности оказывают разное влияние на структуру межмолекулярных взаимодействий в сыворотке крови крыс, которые могут быть связаны с компенсаторным эффектом различных адаптационных механизмов.

Поскольку при формировании фаций протекают физические процессы, приводящие к образованию фрактально организованных структур, для количественной оценки может быть применен фрактальный анализ [10, 12].

Результаты фрактального анализа фаций БЖ приведены в табл. 1–3. Можно сделать вывод, что параметр D достаточно чувствителен к изменению макроструктуры разных БЖ, полученных разными способами и подвергнутых воздействиям как *in vitro*, так и *in vivo*.

Для описания фрактальных структур, встречающихся на микромасштабах, широко используют понятие кластер – скопление близко расположенных, тесно связанных друг с другом частиц любой природы (атомов, молекул, ионов, ультрадисперсных частиц). В последнее время термин кластер распространяется и на системы, состоящие из большого количества связанных макроскопических частиц.

Введено также понятие фрактального кластера, под которым понимают структуру, образующуюся в результате ассоциации частиц при условии диффузного характера их движения [13]. Особенностью фрактального кластера является то, что средняя плотность частиц в нём падает по мере удаления от образующего центра. Размерность кластера не зависит ни от его формы, ни от типа упаковки в нём частиц. Она лишь служит количественной характеристикой того, как кластер за-



**Рис. 6.** Влияние РХВ (*in vivo*) различной продолжительности на структуру фаций сыворотки крови крыс: 1 – контроль; 2 – 10 мин; 3 – 20 мин; 4 – 65 мин. Увеличение 60.

**Fig. 6.** Effect of RCE (*in vivo*) of different term on facies structure of rat's blood serum: 1 – control; 2 – 10 min; 3 – 20 min; 4 – 65 min. Magnification 60.

structures for quantitative estimation, the fractal analysis may be used [10, 12].

The results of fractal analysis of BF facies are shown in Tables 1–3. It could be concluded that D parameter is rather sensitive to macrostructure damage of different BF obtained with various methods and exposed not only *in vitro*, but also *in vivo*.

For the describing of fractal structure found in microscales there is widely used the term of cluster, i.e., accumulation of closely located tightly bound with each other particles of any origin (atoms, molecules, ions, ultra disperse particles). Recently the term of cluster has been extended also to the systems, comprising a big number of bound microscopic particles.

**Таблица 1.** Влияние различных способов получения экстрактов плаценты на фрактальную размерность их фаций

**Table 1.** Effect of different deriving methods of placenta extracts on fractal dimension of their facies

Способы получения экстрактов плаценты Deriving methods of placenta extracts	Фрактальная размерность Fractal dimension	Достоверность различия относительно свежее выделенного Significance of difference in respect of freshly isolated
Свежее выделенный Freshly isolated	1,23±0,03	–
По Филатову By Filatov's method	1,29±0,05	<0,05
Автоклавированный Autoclaved	1,39±0,05	<0,01

**Таблица 2.** Влияние ритмических холодных воздействий *in vivo* на фрактальную размерность фаций сыворотки крови крыс

**Table 2.** Effect of rhythmic cold effects *in vivo* on fractal dimension of facies of rat's blood serum

Продолжительность РХВ Term of RCE	Фрактальная размерность Fractal dimension	Достоверность различия относительно контроля Significance of difference in respect of control
Контроль Control	1,21±0,03	—
10 мин РХВ 10 min of RCE	1,26±0,03	< 0,05
20 мин РХВ 20 min of RCE	1,16±0,02	< 0,05
65 мин РХВ 65 min of RCE	1,30±0,03	< 0,01

полняет занимаемое им пространство. Такая фрактальная система обладает свойством статистического самоподобия. Построенный по случайному закону фрактальный кластер имеет внутренний порядок, одной из количественных характеристик которого является его размерность. Разработано множество модельных механизмов формирования фрактальных кластеров.

В настоящее время обобщены результаты многочисленных экспериментов, в которых выявлялись закономерности фрактальной природы реальных объектов на основе модельных механизмов: модель агрегации, ограниченной диффузией, модель, ограниченной диффузией кластерной агрегации, и модель кластер-кластерной агрегации [13, 14]. Многие реальные физические процессы, в том числе кристаллизация жидкости на подложке, хорошо описываются этими моделями [13]. Фрактальные идеи с успехом применяются и для описания протекания (перколяции) жидкостей через пористые среды [14]. Модель перколяции с вытеснением также приемлема для описания структурирования фации, если в неньютоновской биохимической жидкости сформируются слои разной реологии.

The definition of fractal cluster has been also introduced, which is understood as the structure, forming as a result of association of the particles under the condition of diffusive character of their movement [13]. The peculiarity of fractal cluster is the fact that an average density of particles in it decreases with the moving away from forming center. The dimension of cluster does not depend either on its form, or the type of packing of the particles in it. This serves as the quantitative evaluation of the fact how is the cluster fills in the space, taken by it. This fractal system has the property of statistical self-similarity. Build on accidental principle the fractal cluster has an inner order, one of quantitative characteristic of which is its dimensions. There are developed many model mechanisms of forming the fractal clusters.

Now the results of many experiments have been summarized, in which the rules of fractal nature of real objects were disclosed on model mechanisms base: aggregation model limited with diffusion, model limited with diffusion of cluster aggregation and model of cluster-cluster aggregation [13-14]. Many real physical processes, including fluid crystallization on embedding, are well described with these models. Fractal ideas are successfully used for describing of

**Таблица 3.** Влияние замораживания и хранения при низких температурах спермальной плазмы животных на фрактальную размерность фаций

**Table 3.** Effect of freezing and storage at low-temperatures of sperm plasma of animals on fractal dimension of facies

Температура хранения, °C Storage temperature, °C	Фрактальная размерность Fractal dimension	Процент от контрольных значений Percent from the control values	Достоверность различия относительно контроля Significance of difference in respect of control
Собака (фракции 1 + 2) Dog (1 + 2 fraction)			
Контроль Control	1,39±0,023	100	—
– 20	1,55±0,034	112	<0,05
– 196	1,48±0,033	107	<0,05
Петух Fowl			
Контроль Control	1,33±0,04	100	—
– 20	1,38±0,05	104	<0,05
– 196	1,12±0,04	84	<0,01
Индюк Turkey			
Контроль Control	1,24±0,04	100	—
– 20	1,30±0,03	105	<0,05
– 196	1,11±0,03	90	<0,05

Рассчитанные нами фрактальные размерности фаций позволяют соотнести их численные значения с модельными, а значит понять механизмы влияния изученных факторов на физико-химическое состояние БЖ.

## Выводы

Математический анализ изображений фаций БЖ позволяет объективизировать метод и количественно оценивать изменения структуры БЖ на макроуровне. Вместе с традиционными морфологическими исследованиями описанный подход оказывается продуктивным как для оценки влияния различных физико-химических факторов на образцы, так и при разработке компьютерных экспресс-методов медицинской диагностики. Перспективно создание компьютерной базы данных для накопления и систематизации материала.

## Литература

1. Белова Л.М., Потехина Ю.П. Исследование конформационных изменений молекулы альбумина в различных условиях методом клиновидной дегидратации (сообщение 1) // Нижегород. мед. журнал.– 2003.– №3-4.– С. 8-12.
2. Белова Л.М., Конторщикова К.Н., Потехина Ю.П. Изменение некоторых параметров человеческого альбумина под действием озонированного или оксигенированного раствора // Нижегород. мед. журнал. Приложение. Озонотерапия.– 2003.– С. 45-46.
3. Божокин С.В., Паршин Д.А. Фракталы и мультифракталы.– Ижевск, 2001.– 128 с.
4. Головки Т.Ю. Особенности структуризации компонентов биологических жидкостей при их дегидратации // Матеріали Міжнарод. наук.-практ. конф. „Наукові дослідження – теорія та експеримент 2005”.– Полтава, 2005.– С. 8-10.
5. Грищенко В.И., Яковлева Е.А., Петренко А.Ю., Никитченко Ю.В. Состояние свободнорадикального окисления фолликулярной жидкости яичника человека после длительного криоконсервирования // Международ. мед. журнал.– 2005.– №1.– С. 86-90.
6. Денисов А.Б., Барер Г.М., Селифанова Е.И. Особенности кристаллизации компонентов ротовой жидкости у больных сахарным диабетом в случае отсутствия кристаллических структур // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 2005.– Т. 140, №7.– С. 114-116.
7. Дюбка Т.С. Спектрофлуориметрическая характеристика влияния способов получения и хранения на экстракты плаценты // Материалы Всеукр. научно-практ. конф. “Лекарства – человеку”.– Харьков, 2004.– С. 53-55.
8. Дюбка Т.С., Белоношко А.П., Ромоданова Э.А. Влияние способов получения на макроструктуру экстрактов плаценты // Сучасні проблеми науки та освіти: Матеріали 6-ї Міжнарод. міждисциплінарної наук.-практ. конф.– Харків, 2005.– С. 74.
9. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия: Пер. с англ.– М.: Мир, 1984.– Т. 2.– 496 с.
10. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы.– М., 2002.– 656 с.
11. Мартусевич А.К. О клинико-физиологическом значении исследования кристаллизации биологических сред организма человека // Вестник молодых ученых. Физиология и медицина: Сб. материалов. – СПб, 2005.– С. 74.

fluids flowing (percolation) through the porous media. Percolation model with pushing out is also acceptable for describing the structuring of facies if layers of different rheology are formed in non-Newton's biochemical fluid.

Fractal dimensions of facies calculated by us enable to compare their numerical values with model ones, and, it means, to realize the mechanisms of effect of studied factors on physico-chemical BF condition.

## Conclusions

Mathematical analysis of images of BF facies enables to objectify the method and to assess quantitatively by the damages of BF structure on macrolayer. The described approach with traditional morphologic investigations is productive not only for the estimation of effect of different physical-chemical factors on samples but also when developing the computer express-methods for medical diagnostic. The building of computer database is prospective for generation and systemization of information.

## References

1. Belova L.M., Potekhina Yu.P. Research of conformational changes of albumin molecules in different conditions with the method of cone-like dehydration (information 1)// Nizhegorodskiy meditsynskiy zhurnal.– 2003.– N3-4.– P. 8-12.
2. Belova L.M., Kontorschikova K.N., Potekhina Yu.P. Change of some parameters of human albumin under the effect of ozonized and oxygenated solution// Nizhegorodskiy meditsynskiy zhurnal. Supplement: Ozonotherapy.– 2003.– P. 45-46.
3. Bozhokin S.V., Parshin D.A. Fractals and multi-fractals.– Izhevsk, 2001.– P. 128.
4. Golovko T.Yu. Structuring peculiarities of biological fluids' components at their dehydration. Materials, international scientific practical conference “Scientific research theory and experiment 2005”. – Poltava, 2005.– P. 8-10.
5. Grischenko V.I., Yakovleva E.A., Petrenko A.Yu., Nikitchenko Yu.V. Condition of free radical oxygenation of follicular fluid of human ovary after long-term cryopreservation// Mezhdunar. Med. Zhurn.– 2005.– N1.– P. 86-90.
6. Denisov A.B., Barer G.M., Selifanova E.I. Peculiarities of components' crystallization of oral liquor in patients with Diabetes mellitus with the absence of crystal structures// Bull. Experim. Biol. Med.– 2005.– Vol.140, N7.– P. 114-116.
7. Dyubko T.S. Spectrofluorimetric characteristic effect of deriving and storage methods on placenta extracts// Proceeding of Scientific&Practical All-Ukrainian Conference “Drugs for Human”.– Kharkov, 2004.– P. 53-55.
8. Dyubko T.S., Belonozhko A.P., Romodanova E.A. Effect of deriving methods on macrostructure of placenta extracts// Modern Problems of Science and Education: Proceedings of the 6-th International interdisciplinary Scientific&Practical Conference.– Kharkov, 2005.– P. 74.
9. Cantor Ch., Shimmel P. Biophysical chemistry: Translated from English.– Moscow: Mir, 1984.– Vol. 2.– 496 p.
10. Mandelbrot B. Fractal geometry of nature.– Moscow, 2002.– P. 656.
11. Martusevich A.K. About clinical-physiological significance of research of human biological media crystallization // Vestnik molodykh uchenykh. Physiology and medicine: Collection of papers.– St-Petersburg, 2005.– P. 74.

12. *Марченко В.С., Грищенко В.И., Бабийчук В.Г. и др.* К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 6. Фрактальная геометрия функциональной архитектоники ультраструктурных элементов синаптического аппарата центральной терморегуляции при гипотермии и гибернации // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 6-20.
13. *Смирнов Б.М.* Физика фрактальных кластеров.– М.: Наука, 1991.– 136 с.
14. *Федер Е.* Фракталы.– М.: Мир, 1991.– 254 с.
15. *Фрактальный анализ процессов, структур и сигналов.* Коллективная монография / Под ред. Р.Э. Пащенко.– Харьков, 2006.– 348 с.
16. *Щербатюк Т.Г., Потехина Ю.П., Парфенова И.Е.* Изменения структуры дегидратированной плазмы при озонировании // Нижегород. мед. журнал. Приложение. Озонотерапия, 2003.– С. 49-51.
17. *Clarke K.C.* Computation of the fractal dimension of topographic surfase using the triangular prism surface area method // Computers & Geosciences.– 1986.– Vol. 12, N5.– P. 713-722.
12. *Marchenko V.S., Grischenko V.I., Babiychuk V.G. et al.* To the conception of existoencephalic system of cooled brain. Part 6. Fractal geometry of functional architecture of ultrastructural elements of central thermoregulation synaptic apparatus under hypothermia and hibernation// Problems of Cryobiology.– 2003.– N3.– P. 6-20.
13. *Smirnov B.M.* Physics of fractal clusters.– Moscow: Nauka, 1991.– P. 136.
14. *Feder E.* Fractals.– Moscow: Mir,1991.– P. 254.
15. *Fractal analysis of processes, structures and signals.* Ed. by Paschenko R.E.– Kharkov, 2006.– 348 p.
16. *Scherbatyuk T.G., Potekhina Yu.P., Parfenova I.E.* Structure changes of dehydrated plasma at ozonation // Nizhegorodskiy meditsynskiy zhurnal. Supplement: Ozonotherapy, 2003.– P. 49-51.
17. *Clarke K.C.* Computation of the fractal dimension of topographic surfase using the triangular prism surface area method // Computers & Geosciences.– 1986.– Vol. 12, N5.– P. 713-722.

*Accepted in 18.10.2005*

*Поступила 18.10.2005*