

# ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МУЛЬТИФРАКТАЛЬНОГО ФОРМАЛИЗМА ДЛЯ ОЦЕНКИ МОРФОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

DOI: 10.17691/stm2023.15.3.04

УДК 616.24–018–073

Поступила 24.10.2022 г.

© **А.М. Игнатова**, д.т.н., старший научный сотрудник<sup>1</sup>; научный сотрудник<sup>2</sup>;  
**М.А. Землянова**, д.м.н., доцент, главный научный сотрудник<sup>2</sup>;  
 профессор кафедры охраны окружающей среды<sup>3</sup>;  
**О.Б. Наймарк**, д.физ.-мат.н., профессор, зав. лабораторией<sup>1</sup>;  
**Н.В. Зайцева**, д.м.н., академик РАН, научный руководитель<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт механики сплошных сред Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, ул. Ленина, 13а, Пермь, 614990;

<sup>2</sup>Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, ул. Монастырская, 82, Пермь, 614045;

<sup>3</sup>Пермский национальный исследовательский политехнический университет, проспект Комсомольский, 29, Пермь, 614990

**Цель исследования** — выявление практических аспектов использования мультифрактального формализма для оценки морфологии биологических тканей.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовали гистологические изображения тканей легких крыс линии Wistar без патологии и с патологическими изменениями, полученными при увеличениях 50, 100, 200. Обработку изображений проводили с применением универсального программного обеспечения ImageJ/Fiji. Для вычисления мультифрактального спектра изображений, обработанных с получением линейного контура, использовали модуль для ImageJ — FracLac. С помощью данного модуля определяли скейлинговую экспоненту (функцию показателя Реньи,  $\tau(q)$ ) и непосредственно спектр сингулярности.

**Результаты.** Для тканей, в которых не обнаружены патологии, спектры сингулярности обладают признаками мультифрактальности. Спектр изображения ткани с патологией смещен влево относительно спектра, характерного для ткани без патологии. Снижение высоты спектра при наличии патологии указывает на «упрощение» альвеолярного рисунка, которое предположительно связано с наличием распространенного васкулита, поскольку из-за него на изображении появляются участки кровоизлияний; это приводит к тому, что контур альвеолярного рисунка выравнивается, сокращается площадь поверхности альвеол и возникают участки, заполненные эритроцитами. На меньших увеличениях изображения с патологией утрачивают признаки мультифрактальности.

**Заключение.** Корректных результатов оценки мультифрактальных спектров гистологических изображений можно достичь при степени увеличения 200 и предварительной обработке с получением линейных контуров. Значительные отличия между морфологическим строением тканей легких с патологией и без нее наблюдаются при сопоставлении высоты, ширины и положения спектра относительно начала координат.

**Ключевые слова:** анализ изображений; гистология; ткань легких; фрактальный анализ; альвеолярный рисунок.

**Как цитировать:** Ignatova A.M., Zemlyanova M.A., Naimark O.B., Zaitseva N.V. Practical aspects of using multifractal formalism to assess the morphology of biological tissues. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(3): 35, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.3.04>

## English

## Practical Aspects of Using Multifractal Formalism to Assess the Morphology of Biological Tissues

**A.M. Ignatova**, DSc, Senior Researcher<sup>1</sup>; Researcher<sup>2</sup>;  
**M.A. Zemlyanova**, MD, DSc, Associate Professor, Chief Researcher<sup>2</sup>; Professor,  
 Department of Environmental Protection<sup>3</sup>;

**Для контактов:** Игнатова Анна Михайловна, e-mail: iamptu@yandex.ru

**O.B. Naimark**, DSc, Professor, Head of the Laboratory<sup>1</sup>;

**N.V. Zaitseva**, MD, DSc, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Adviser<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Continuous Media Mechanics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences — a Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13A Lenina St., Perm, 614990, Russia;

<sup>2</sup>Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, 82 Monastyrskaya St., Perm, 614045, Russia;

<sup>3</sup>Perm National Research Polytechnic University, 29 Komsomolsky Prospekt, Perm, 614990, Russia

**The aim of the study** is to identify practical aspects of using multifractal formalism to assess the morphology of biological tissues.

**Materials and Methods.** The objects of the study were histological images of lung tissues of Wistar rats without pathology and with detected pathological changes, obtained at 50×, 100×, 200× magnifications. Image processing was carried out using the ImageJ/Fiji universal software. The multifractal spectrum of the images, processed to obtain a linear contour, was calculated with the use of FracLac — a module for ImageJ. This module was used to determine the scaling exponent (the function of the Rényi exponent,  $\tau(q)$ ) and the singularity spectrum itself.

**Results.** The singularity spectra for tissues with no pathology have signs of multifractality. The image spectrum of tissue with pathology is shifted to the left relative to the spectrum characteristic of tissue without pathology. A decrease in the spectral height in the presence of pathology indicates a “simplification” of the alveolar pattern, which is presumably associated with the presence of widespread vasculitis, since it causes areas of hemorrhage to appear on the image; this leads to leveling the contour of the alveolar pattern, reducing the surface area of the alveoli and emerging areas inflamed by erythrocytes. At lower magnification, images with pathology lose signs of multifractality.

**Conclusion.** Correct results of assessing multifractal spectra of histological images can be achieved at 200× magnification and preprocessing to obtain linear contours. Significant differences between the morphological structure of lung tissues with and without pathology are observed when comparing the height, width, and position of the spectrum relative to the origin.

**Key words:** image analysis; histology; lung tissue; fractal analysis; alveolar pattern.

## Введение

В классическом представлении гистологический анализ не предполагает получения исчисляемых показателей, однако в последнее время в дополнение к нему для получения количественных характеристик все чаще используют анализ изображений [1–3]. Количественные характеристики позволяют сопоставлять результаты большого числа экспериментов и применять их для моделирования [4–5]. При количественной оценке морфологии биологических тканей возникает проблема определения оценочных критериев. В настоящее время в научной и клинической практике для анализа гистологических изображений используют различные параметры, в частности степень дифференциации тканей на основании оценочной шкалы D. Gleason [6]. Данный подход и прочие близкие к нему применимы только для оценки специфических патологий, например новообразований, и не позволяют диагностировать и классифицировать другие изменения. В ряде работ [7–9] при исследовании неопухолевых патологий обсуждаются критерии для изучения изображений биологических тканей средствами анализа изображений. Отмечается, что для оценки организации нейронов применима фрактальная размерность, а для описания альвеолярного рисунка — показатели дендритной геометрии.

Зачастую структура гистологических изображений не может быть описана одним фрактальным множеством. Она представляет собой комплекс нескольких фракталов, накладываемых друг на друга, каждый из которых имеет свою собственную размерность [10]. Подобная

многофрактальная природа гистологических изображений обусловлена тем, что биологические процессы развиваются по степенным законам и, следовательно, их фазовые портреты характеризуются неоднородным распределением некоторой меры, которое может быть описано с использованием не одной, а нескольких шкал (масштабов) [7]. Именно поэтому перспективным методом получения характеристик изображения является мультифрактальный формализм [11–13].

В качестве универсального оценочного подхода предлагается использовать характеристики мультифрактального спектра изображений биологических тканей [8].

Прямое вычисление мультифрактального спектра гистологических изображений, как правило, малоэффективно из-за наличия артефактов, которые могут привести к недостоверному результату, поэтому применение мультифрактального формализма требует специализированной подготовки изображений. Актуален поиск методических подходов по использованию мультифрактального анализа изображений применительно к оценке морфологии биологических тканей и объектов.

**Цель исследования** — выявление практических аспектов использования мультифрактального формализма для оценки морфологии биологических тканей.

## Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали гистологические изображения тканей легких крыс линии Wistar без патологии и с выявленными патологи-

ческими изменениями (рис. 1), полученные при увеличениях 50, 100, 200.

Гистологический материал был получен от экспериментов, условия которых соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123), и этического комитета Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения.

В исследовании рассматривали изображения тканей легких с установленной гиперплазией лимфоидной ткани, ассоциированной со стенкой бронхов, и примесью эозинофилов и распространенным васкулитом, интерстициальной пневмонией и альвеолярным отеком легкого.

Изображения получены с помощью микроскопии препаратов тканей легких. Для их приготовления органы фиксировали в 10% водном нейтральном растворе формалина и после обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, затем пропитывали хлороформом и парафином и заливали гомогенизированной парафиновой средой Гистомикс (BioVitrum, Россия). Гистосрезы толщиной 4 мкм получали на санном микротоме модели JUNG SM2000R (Leica Microsystems, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином. Осмотр и получение изображений морфологического строения тканей проводили на светооптическом микроскопе Axiostar (Carl Zeiss, Германия).

В работе [14] отмечается, что одним из возмож-

ных средств минимизации влияния артефактов при анализе изображений являются бинаризация, выделение контура и его скелетонизация. Обработку изображений выполняли с применением универсального программного обеспечения ImageJ/Fiji (программное обеспечение с открытым кодом, разработчик — Wayne Rasband, National Institutes of Health (США)).

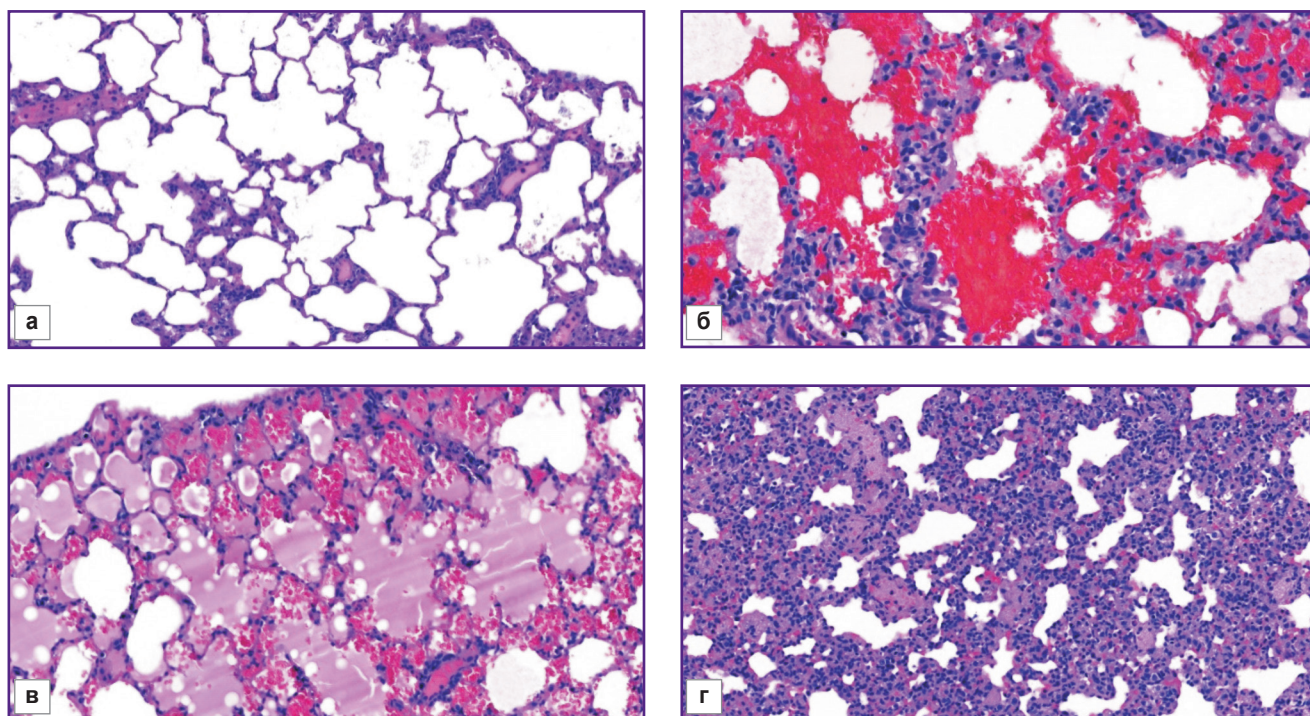
Перед мультифрактальным анализом изображения переводили в полутоновые черно-белые, а затем — в двухцветные методом бинаризации с пороговым значением, равным 220 (рис. 2, а).

Для бинарных изображений оценивали величину лакуарности. Данный показатель является мерой неоднородности заполнения пространства паттерном (узором), который в данном случае представляет собой альвеолярный узор. Возрастание показателя величины лакуарности указывает на увеличение числа хаотичных провалов в паттерне.

В данном исследовании мерой лакуарности ( $L$ ) является изменение плотности изображения при сканировании сеткой с ячейками различных размеров (использовали квадратные ячейки размером от 1 до 60 пикселей). Для расчета лакуарности применяется следующая формула:

$$L=(\sigma/\mu)^2,$$

где  $\sigma$  — стандартное отклонение количества пикселей (для бинарного изображения) фрактального агрегата в ячейках сетки заданного размера;  $\mu$  — среднее значение массы агрегата или среднее число пикселей в ячейках заданного размера.



**Рис. 1. Ткань легких крыс линии Wistar:**

а — без патологии;  $\times 200$ ; б — с гиперплазией лимфоидной ткани, ассоциированной со стенкой бронхов, и распространенным васкулитом;  $\times 200$ ; в — с альвеолярным отеком легких; г — с интерстициальной пневмонией;  $\times 200$

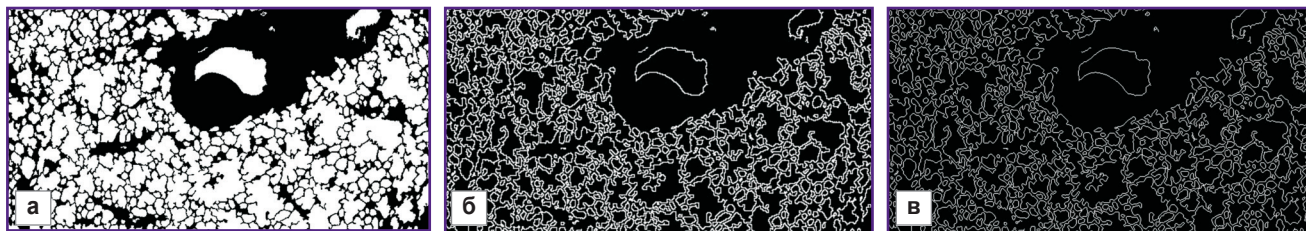


Рис. 2. Изображения тканей легких крыс линии Wistar, подготовленные для анализа: а — результат бинаризации, б — результат выделения контура, в — результат скелетонизации контура

Лакунарность определяли по наклону регрессионной линии в координатах  $\varepsilon/L$  ( $\varepsilon$  — размер ячейки сетки в долях от размера растра) и по диапазону значений  $L$  для  $\varepsilon=0,01\div 0,6$ . При построении графиков лакунарность рассчитывали по формуле

$$L=(\sigma/\mu)^2+1,$$

где 1 используется для равномерного отображения графика при нулевом стандартном отклонении ( $\sigma=0$ ).

У полученных бинарных изображений выделен контур с помощью функции outline (рис. 2, б), а затем проведена его скелетонизация (рис. 2, в). В результате обработки изображения тканей легких представляли собой изображения двойного линейного контура альвеолярного узора, которые использовались для получения мультифрактального спектра. Для вычисления мультифрактального спектра изображений, обработанных с получением линейного контура, использовали модуль для ImageJ — FraCLac. С помощью данного модуля устанавливали скейлинговую экспоненту (функцию показателя Реньи,  $\tau(q)$ ) и непосредственно спектр сингулярности. Для спектра

сингулярности определяли следующие параметры: ширину и высоту спектра; ширину и высоту правой и левой ветвей [15].

### Результаты и обсуждение

Результаты оценки лакунарности альвеолярного узора представлены на рис. 3 и в табл. 1. На рис. 4 показаны спектры сингулярности, характерные для обработанных изображений гистологических тканей легких; характеристики спектров приведены в табл. 2.

Для тканей с патологией показатель лакунарности паттерна альвеолярного узора был ниже, чем для тканей без патологий. Локальное возрастание показателя лакунарности в диапазоне значений  $\varepsilon=0,4\div 0,5$  связано, по всей видимости, с физиологической особенностью тканей, а именно с появлением в альвеолярном рисунке кровеносных сосудов. В наибольшей степени по показателю лакунарности идентифицируется альвеолярный отек. Для изображений тканей с патологией при увеличении 50 и 100 показатель лакунарности близок к нулю, что в совокупности с линейным характером зависимости скейлинговых экспонент для данных изображений (рис. 5) является признаком монофрактальности. При увеличении 200 спектр сингулярности для тканей с патологией, напротив, обладает выраженными признаками мультифрактальности, однако характеристика спектра отличается от аналогичных показателей, свойственных тканям без морфологических патологий. Так, в присутствии патологии высота спектра была ниже на 0,2; ширина спектра — больше на 0,3; при этом соотношение между показателями ширины правой и левой ветвей оставалось аналогичным тому, что наблюдалось для тканей без патологий.

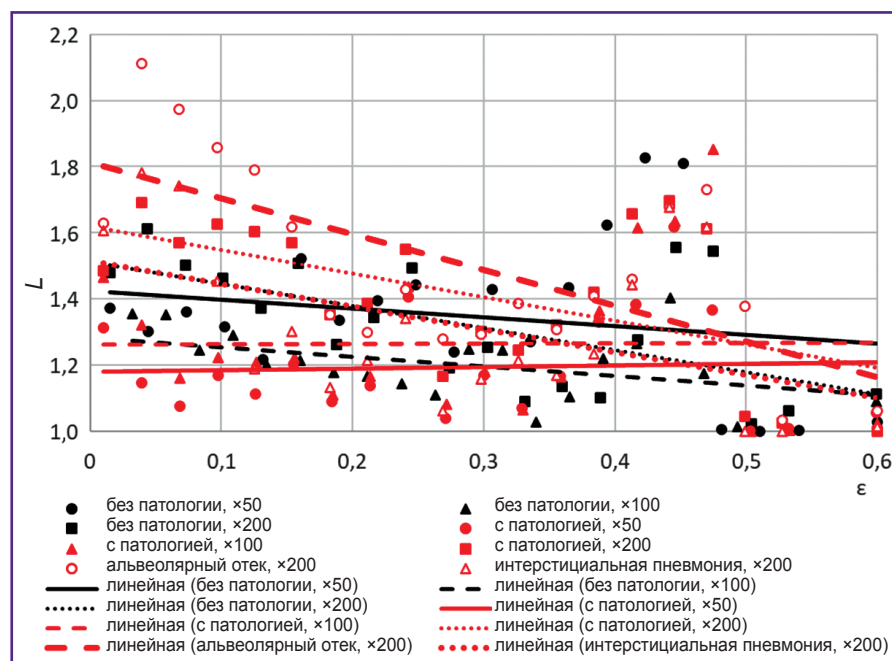


Рис. 3. Функции лакулярности изображений

Для тканей, в которых не обнаружены патологии, спектры сингулярности обладают при-

Таблица 1

Характеристика лакунарности паттерна альвеолярного узора

Характеристика изображения	Характеристика лакунарности		
	Коэффициент наклона линейной регрессии	Минимальное значение	Максимальное значение
<b>Без патологии</b>			
×50	-0,26	1,0	1,83
×100	-0,29	1,01	1,40
×200	-0,66	1,02	1,66
<b>С патологией</b>			
×50	0,04	1,0	1,61
×100	0,01	1,0	1,85
×200	-0,71	1,0	1,69
Альвеолярный отек, ×200	-1,08	1,03	2,11
Интерстициальная пневмония, ×200	-0,69	1,0	1,78

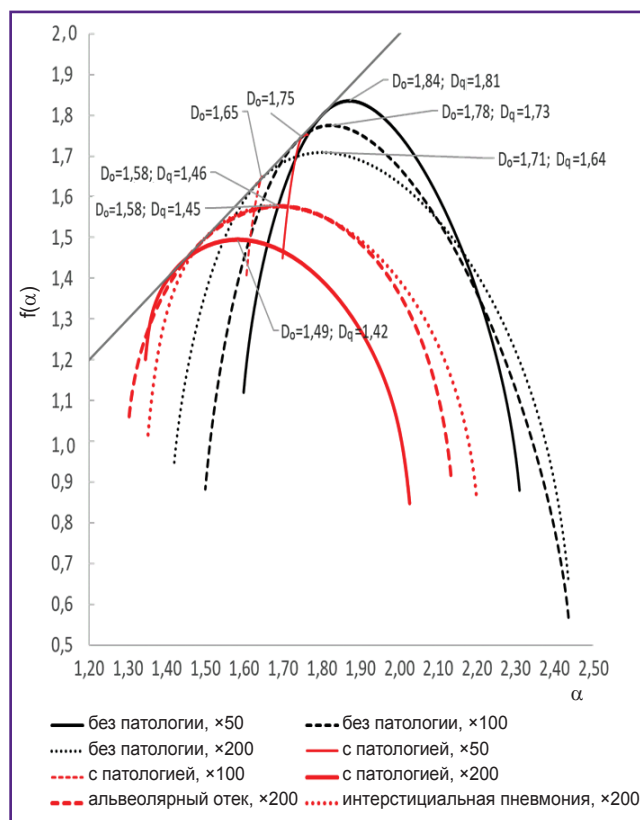


Рис. 4. Спектры сингулярности изображений  $D_0$  — монофрактальная размерность,  $D_q$  — информационная размерность

знаками мультифрактальности независимо от того, при каких увеличениях были получены изображения. Однако по мере возрастания степени увеличения гистологических изображений параметры спектров

Таблица 2

Характеристика мультифрактальных спектров гистологических изображений

Характеристика изображения	Характеристика спектра					
	ширина спектра, $\alpha_{max} - \alpha_{min}$	высота спектра, $f(\alpha_0)$	ширина правой ветви, $\alpha_{max} - \alpha_0$	высота правой ветви, $f(\alpha_0) - f(\alpha_{max})$	ширина левой ветви, $\alpha_0 - \alpha_{min}$	высота левой ветви, $f(\alpha_0) - f(\alpha_{min})$
<b>Без патологии</b>						
×50	0,71	1,83	0,44	0,95	0,27	0,71
×100	0,93	1,77	0,61	1,20	1,32	0,89
×200	1,01	1,70	0,63	1,04	0,38	0,77
<b>С патологией</b>						
×50	Монофрактальный паттерн					
×100	Монофрактальный паттерн					
×200	0,68	1,49	0,44	0,64	0,24	0,29
Альвеолярный отек, ×200	0,83	1,57	0,44	0,65	0,38	0,52
Интерстициальная пневмония, ×200	0,84	1,57	0,51	0,70	0,33	0,56

изменяются, а именно равномерно увеличивается ширина спектра и снижается его высота; при этом соотношения показателей правой и левой ветвей сохраняются. При увеличении 200 высота правой и левой ветвей незначительно сокращается относительно аналогичных показателей, наблюдаемых при увеличении 100. Эти изменения спектров при возрастании увеличения соответствуют уменьшению количества альвеол в поле зрения и более отчетливому контуру альвеолярного рисунка.

В целом спектр изображения ткани с патологией смещен влево относительно спектра, характерного для ткани без патологии. Последнее в совокупности с гистологическим анализом указывает на растущее доминирование лимфоидной ткани, свойственное ее патологической гиперплазии.

Уменьшение ширины спектра сингулярности, характерное для изображений с патологией, указывает на более равномерное распределение структурных составляющих такой ткани, чем ткани без патологии, т.е. периодичность (ритм) паттерна альвеолярного узора нарушается; применительно к легочной ткани это указывает на сокращение альвеолярных просветов. Снижение высоты спектра при наличии патологии указывает на «упрощение» альвеолярного рисунка, которое предположительно связано с наличием распространенного васкулита, так как из-за него на изображении появляются участки кровоизлияний. Это приводит к выравниванию контура альвеолярного

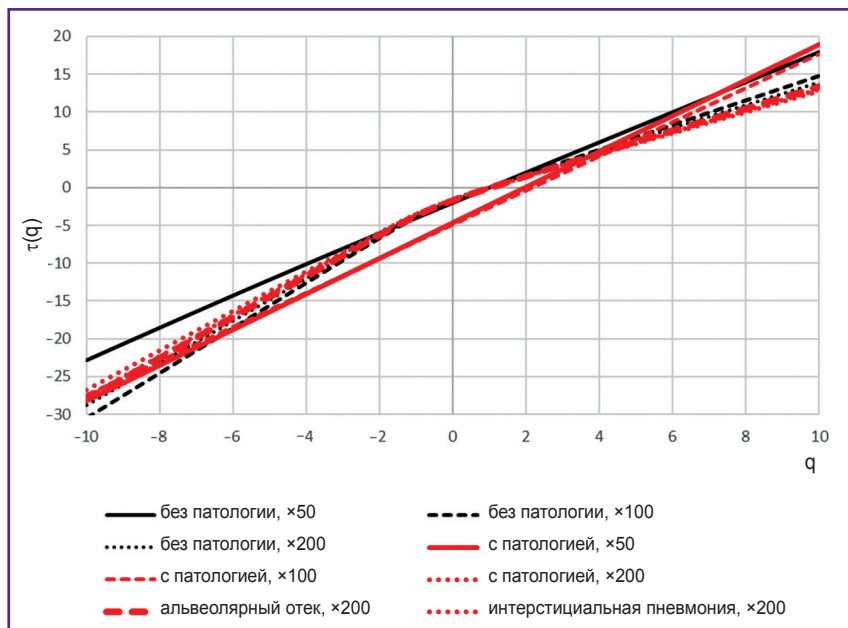


Рис. 5. Скейлинговые экспоненты изображений

рисунка, площадь поверхности альвеол сокращается и возникают участки, заполненные эритроцитами.

Наиболее примечательно, что на меньших увеличениях изображения с патологией утрачивают признаки мультифрактальности. Предположительно отсутствие признаков мультифрактальности также связано с тем, что из-за общей отечности и очагового распределения эритроцитов контуры узора сглаживаются. В связи с этим характерные детали проявляются только при большем увеличении.

Спектры сингулярности изображений отдельных патологических проявлений, а именно альвеолярного отека и интерстициальной пневмонии, при увеличении 200 близки к спектру, характерному для патологических изменений в целом. Они имеют такую же высоту и практически равную ширину, которая, однако, больше, чем для патологических изменений в целом, что связано с нарушением чередования альвеолярных пространств в паттерне узора, характерного для тканей легких. Спектр, наблюдаемый при альвеолярном отеке, в наибольшей степени смещен влево, что подтверждает предположение о доминировании патологического компонента в структуре ткани.

### Заключение

Предложены методические подходы к использованию мультифрактального формализма для оценки морфологии биологических тканей. Установлено, что корректных результатов оценки мультифрактальных спектров гистологических изображений можно достичь при степени увеличения 200 и предварительной обработке с получением линейных контуров. Оценочными критериями при количественной характеристике биологических тканей методом мультифрактального анализа служат статистические характеристики спектра

сингулярности. Значительные отличия между морфологическим строением тканей легких с патологией и без нее фиксируются при сопоставлении высоты, ширины и положения спектра относительно начала координат. Лакунарность не является универсальным оценочным критерием.

**Финансирование.** Работа выполнена без отдельного финансирования.

**Конфликт интересов** отсутствует.

### Литература/References

1. Huang H.K. Biomedical image processing. *Crit Rev Bioeng* 1981; 5(3): 185–271.
2. Chung Y., Shin S., Shim H., Sohn J.Y., Lee D.E., Lee H., Eom H.S., Kim K.G., Kong S.Y. Development of an automated image analyzer for microvessel density measurement in bone marrow biopsies. *Ann Lab Med* 2020; 40(4): 312–316, <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.4.312>.
3. Zhang Y., Xie M., Xue R., Tang Q., Zhu X., Wang J., Yang H., Ma C. A novel cell morphology analyzer application in head and neck cancer. *Int J Gen Med* 2021; 14: 9307–9314, <https://doi.org/10.2147/ijgm.s341420>.
4. Albers J., Pacilé S., Markus M.A., Wiart M., Vande Velde G., Tromba G., Dullin C. X-ray-based 3D virtual histology-adding the next dimension to histological analysis. *Mol Imaging Biol* 2018; 20(5): 732–741, <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1246-3>.
5. Соколова Н.А., Орел В.Э., Гусынин А.В., Селезнева А.А., Колесник С.В. Алгоритм компьютеризованного анализа изображений гистологических препаратов. *Проблемы информационных технологий* 2012; 11: 129–139. Sokolova N.A., Orel V.E., Gusynin A.V., Selezneva A.A., Kolesnik S.V. Algorithm for image computerization analysis of histological specimens. *Problemi informacijnih tehnologij* 2012; 11: 129–139.
6. Горбань Н.А., Кудайбергенова А.Г. Современные

представления о системе градации Глисона. *Онкоурология* 2010; 6(1): 69–75.

Gorban N.A., Kudaibergenova A.G. Current views of the Gleason grading system. *Onkourologia* 2010; 6(1): 69–75.

7. Шуплецов Ю.В. Прямое вычисление мультифрактального спектра для изображений биомедицинских препаратов. *Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена* 2015; 173: 88–96.

Shupletsov Yu.V. Direct calculation of the multifractal spectrum for images of biomedical drugs. *Izvestia Rossijskogo gosudarstvennogo pedagogiceskogo universiteta im. A.I. Gercena* 2015; 173: 88–96.

8. Ampilova N.B., Soloviev I.P., Shupletsov Y.V. Multifractal spectrum as a classification sign for biomedical preparations images. In: *Proceedings of 7<sup>th</sup> International Conference on Communications, Electromagnetics and Medical Applications*. Athens: Electrical and Computer Engineering; 2013; p. 98–101.

9. Majeed H., Sridharan S., Mir M., Ma L., Min E., Jung W., Popescu G. Quantitative phase imaging for medical diagnosis. *J Biophotonics* 2017; 10(2): 177–205, <https://doi.org/10.1002/jbio.201600113>.

10. Наймарк О.Б., Никитюк А.С., Небогатиков В.О., Гришко В.В. Оценка нелинейной динамики поврежденности клеточных структур как перспективный метод персонализированной онкодиагностики. *Альманах клинической медицины* 2018; 46(8): 742–747, <https://doi.org/10.18786/2072-0505-201846-8-742-747>.

Naimark O.B., Nikityuk A.S., Nebogatikov V.O., Grishko V.V.

Assessment of nonlinear dynamics of cellular structure damage as a promising method of personalized oncodiagnostics. *Al'manah kliniceskoj mediciny* 2018; 46(8): 742–747, <https://doi.org/10.18786/2072-0505-201846-8-742-747>.

11. Гелашвили Д.Б., Иудин Д.И., Розенберг Г.С., Якимов В.Н., Солнцев Л.А. *Фракталы и мультифракталы в биоэкологии*. Нижний Новгород: Издательство Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского; 2013; 370 с.

Gelashvili D.B., Iudin D.I., Rozenberg G.S., Yakimov V.N., Solntsev L.A. *Fraktaly i mul'tifraktaly v bioekologii* [Fractals and multifractals in bioecology]. Nizhny Novgorod: Izdatel'stvo Nizhegorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo; 2013; 370 p.

12. Божокин С.В., Паршин Д.А. *Фракталы и мультифракталы*. Москва–Ижевск: НИЦ; 2001; 128 с.

Bozhokin S.V., Parshin D.A. *Fraktaly i mul'tifraktaly* [Fractals and multifractals]. Moscow–Izhevsk: NITs, 2001; 128 p.

13. Мандельброт Б. *Фрактальная геометрия природы*. М: Институт компьютерных исследований; 2002; 656 с.

Mandelbrot B. *Fraktal'naya geometriya prirody* [Fractal geometry of nature]. Moscow: Institut komp'yuternykh issledovaniy; 2002; 656 p.

14. Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Ignatova A.M., Stepankov M.S. Morphological changes in lung tissues of mice caused by exposure to nano-sized particles of nickel oxide. *Nanotechnol Russ* 2018; 13(7–8): 393–399.

15. Ampilova N., Soloviev I. Application of fractal and multifractal analysis algorithms to image segmentation and classification. *WSEAS Trans Biol Biomed* 2016; 13(3): 14–21.