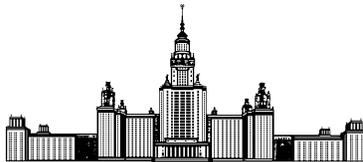


Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова



Факультет Вычислительной Математики и Кибернетики

Кафедра Математических Методов Прогнозирования

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА СТУДЕНТА
417 ГРУППЫ**

**«Компьютерная морфометрия плоских червей планарий на
основе фотоизображений»**

Выполнил:

студент 4 курса 417 группы

Пиджакова Анна Геннадьевна

Научный руководитель:

д.т.н., профессор

Местецкий Леонид Моисеевич

Москва, 2017

Содержание

1	Введение	3
2	Постановка задачи	4
2.1	Содержательная формулировка	4
2.2	Математическая модель	5
3	Метод вычисления морфологической ширины	11
3.1	Предобработка изображений	12
3.2	Построение <i>частной</i> функции морфологической ширины	15
3.3	Вычисление <i>групповой</i> функции морфологической ширины	16
4	Вычислительные эксперименты	16
4.1	Исходные данные и условия эксперимента	16
4.2	Результаты эксперимента	18
4.3	Обсуждение и выводы	19
5	Заключение	20

Аннотация

В данной работе ставится цель построить показатель скорости регенерации плоского червя - планарии в зависимости от окружающей среды. Для решения этой задачи исследованы методы медиального представления объекта на основе скелета и радиальной функции, а также построения морфологического спектра на основе дискового покрытия фигуры.

На основе данного представления создана математическая модель формы решения, позволяющая анализировать скорость регенерации головы плоского червя - планарии. Базируясь на предложенной модели и особенностях задачи предложен новый показатель для оценки этой скорости.

Проведены вычислительные эксперименты, показывающие, что предложенный показатель применим для исследуемой задачи и позволяет уже не третий день уверенно различать контрольную и опытную группы. А также предложены идеи для дальнейшего развития метода, в частности, введение коэффициента сравнительной скорости регенерации.

1 Введение

Планарии – это плоские черви, по краям тела которых находятся реснички, обеспечивающие их движение по поверхности. В основном обитают в пресноводных водоёмах.

Известны тысячи видов планарии, размерами взрослые особи могут быть от нескольких миллиметров до 35 см.

Ресничные плоские черви планарии обладают выдающимися способностями к регенерации - отрастанию утраченных частей тела после поперечной перерезки.

Так, даже при поперечной перерезки в области головы выживают обе части тела планарии: головная часть доразвивает хвостовую, а хвостовая - головной конец. Более того, время восстановления занимает от 10 до 25 дней в зависимости от способа регенерации. Благодаря этому планарии широко используются в качестве подопытного материала в биологических экспериментах. В частности, их используют при изучении биологических основ процесса регенерации, а также процессов пролиферации и дифференцировки клеток, поскольку гены, отвечающие за эти явления у планарий гомологичны подобным генам человека (таких генов сейчас найдено более 30).

Группой биологов было выдвинуто предположение, что благодаря этому свойству планарии её можно использовать как биоиндикатор экологического состояния среды.

Идея состоит в том, чтобы регистрировать изменение скорости регенерации планарий в зависимости от условий среды, в которую они помещены. Для реализации этой идеи разрабатываются методы оценки скорости регенерации по изображениям планарий, полученным в течение всего периода регенерации с помощью фотокамеры [5].

Традиционно количественная оценка степени регенерации осуществляется исследователем на основе визуального анализа. При этом результат сильно зависит от того, как определяется граница между телом и вновь прирастающей областью (бластемой). А выделить точно эту границу сложно даже специалисту. В связи с этим

актуальной задачей является разработка критериев и методов оценки скорости регенерации с помощью инструментов обработки и анализа цифровых изображений в автоматическом режиме.

Основной задачей работы была разработка метода количественной оценки скорости регенерации. Цель такой разработки - повышение точности оценок и сокращение трудозатрат по сравнению с традиционной техникой «ручной» обработки на основе визуального анализа.

2 Постановка задачи

2.1 Содержательная формулировка

Ресничные плоские черви планарии - это классический объект биологии развития. Они обладают выдающимися способностями к регенерации - отрастанию утраченных частей тела после поперечной перерезки. Наблюдение за процессом регенерации осуществляется путем видеорегистрации в поле зрения микроскопа. Произвольно движущихся регенерирующих планарий фотографируют в разные дни после перерезки.

Биологами было выдвинуто предположение, что скорость регенерации планарии зависит от окружающей среды, то есть данный вид червей можно использовать в качестве «быстрого» биоиндикатора качества окружающей среды.

Существует множество методов биоиндикации. Предложенный метод принципиально отличается тем, что в нем использованы стандартные линейные животные бесполой расы (то есть в них отсутствуют собственные мутации) и стандартные методы получения и количественного анализа изображений [4].

На данный момент существуют методы для качественной оценки параметров регенерации планарий. В ходе работы ставилась цель найти количественный показатель, характеризующий скорость морфогенеза планарии в зависимости от окружающей среды. К этому показателю предъявляются следующие требования:

- Показатель скорости восстановления должен быть чувствителен к различиям в скорости регенерации планарий в разных средах.
- Показатель скорости восстановления также должен быть пригоден для оценки процесса регенерации в ходе массового эксперимента над группой планарий, содержащихся в одной и той же среде. При этом необходимо обеспечить получение средних значений по группе особей, в том числе в случае, когда черви в группе имеют существенно разные размеры.

В ходе экспериментов исследовалась скорость регенерации *опытной* группы, помещенной в раствор пептида в концентрации 10^{-12} , и *контрольной* группы, помещенной в воду.

2.2 Математическая модель

Определения и обозначения

Определение 1. *Фигурой называется замкнутая область, ограниченная конечным числом непересекающихся замкнутых жордановых кривых.*

Определение 2. *Жордановой кривой называется образ непрерывного инъективного отображения окружности или отрезка в пространство.*

Определение 3. *Пустым кругом называется круг, целиком лежащий в фигуре.*

Определение 4. *Максимальным пустым кругом называется пустой круг, не содержащийся ни в одном другом пустом круге.*

Определение 5. *Скелетом фигуры называется множество центров максимальных пустых кругов.*

Определение 6. *Радиальная функция определена в точках скелета и ставит в соответствие точке скелета радиус вписанного круга с центром в этой точке.*

Пример визуализации скелета и радиальной функции можно увидеть на Рис. 1

Определение 7. *Дисковым r -покрытием фигуры называется объединение всех пустых кругов радиуса r [1].*

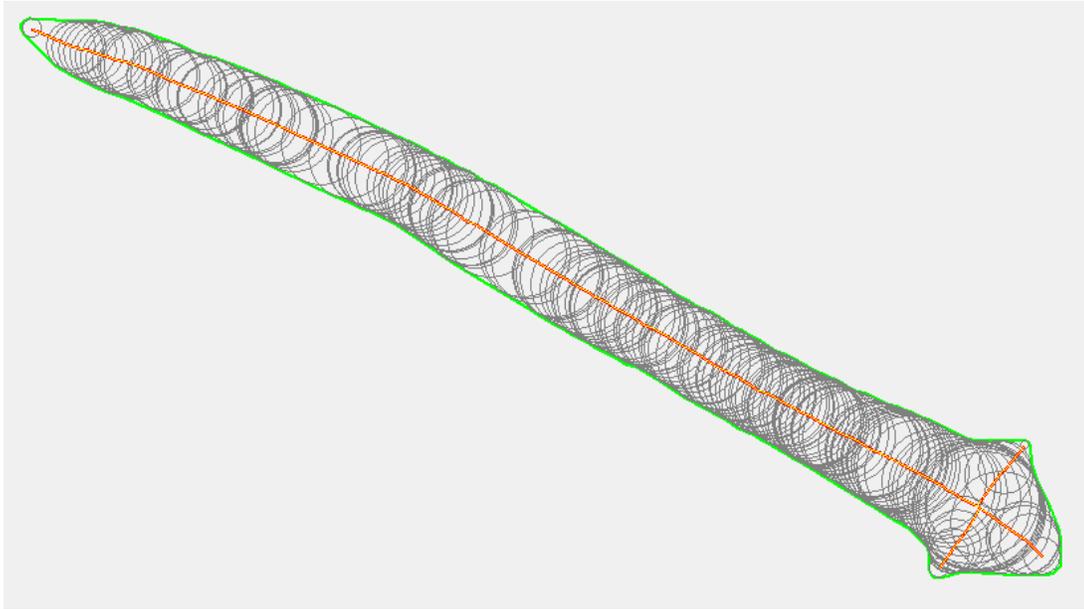


Рис. 1: Визуализация скелета и радиальной функции для планарии

Определение 8. r -площадью фигуры называется площадь её дискового r -покрытия. Обозначим данную величину через S_r .

Исходя из определений 7 и 8 под площадью всей фигуры можно понимать её 0-площадь — S_0 .

Особенности морфогенеза головы планарии

В процессе регенерации планарии форма её тела изменяется. Это изменение выражается в постепенном формировании головы, как показано на Рис. 2



Рис. 2: Процесс регенерации планарии

Необходимо оценить эти изменения формы, которые выражаются в вытягивании и заострении головы, усилении «треугольной» структуры. При этом следует иметь в виду, что абсолютные размеры (площадь проекции) червя не являются постоянными, могут уменьшаться, поскольку в ходе регенерации планарий не кормят и весь процесс восстановления протекает за счет ее внутренних пластических и энергетических ресурсов.

ческих запасов.

Кроме того, размеры зависят от ракурса съёмки. Поэтому достоверным фактором при оценке степени восстановления тела планарии является лишь изменение формы головы. Это изменение выглядит как вытягивание «носика» червя, усиление остроугольной формы этого носика.

Для того чтобы зарегистрировать степень регенерации в форме количественного показателя, нужно построить геометрический критерий, который будет учитывать степень заостренности «носика» планарии.

Предлагаемый показатель – морфологическая ширина, основанная на дисковом r – покрытии.

Рассмотрим модельный пример:

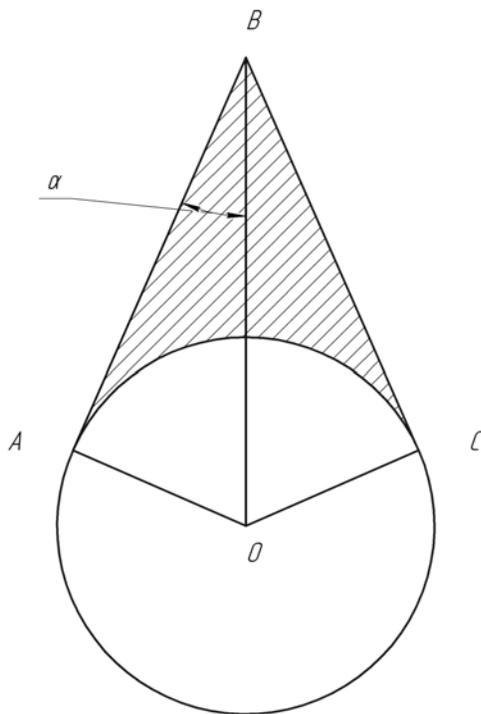


Рис. 3: Иллюстрация модельного примера

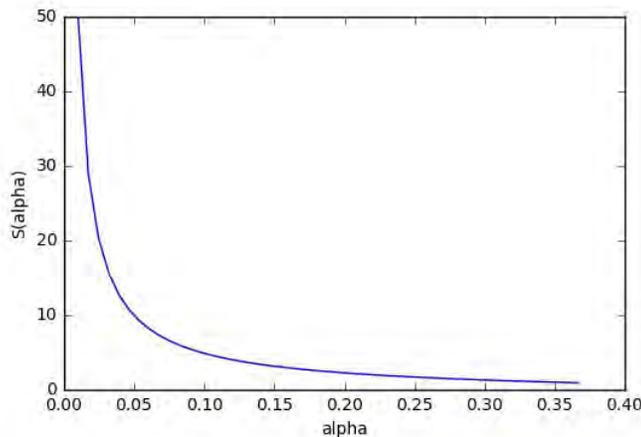
Здесь заштрихованная область соответствует площади «носика» S_{head} .

Определение 9. Под площадью «носика» S_{head} будем понимать площадь области головы, остающуюся после удаления r -покрытия.

Рассмотрим, как эта площадь зависит от угла α , где $\alpha \in [0.01, \frac{\pi}{2} - \epsilon]$ задается в радианах, а значение радиуса r фиксировано.

$$\begin{aligned}
 r &= AO; \\
 S_{AOB}(\alpha) &= \frac{1}{2}r^2 \operatorname{ctg} \alpha; \\
 S_{section}(\alpha) &= r^2 \alpha; \\
 S_{head} &= S_{AOB} - S_{section}; \\
 S_{head}(\alpha) &= r^2 \left(\frac{1}{2} \operatorname{ctg} \alpha - \alpha \right);
 \end{aligned} \tag{1}$$

На заданной области определения $\alpha \in [0.01, \frac{\pi}{4}]$ при $r = 1$ функция имеет вид:



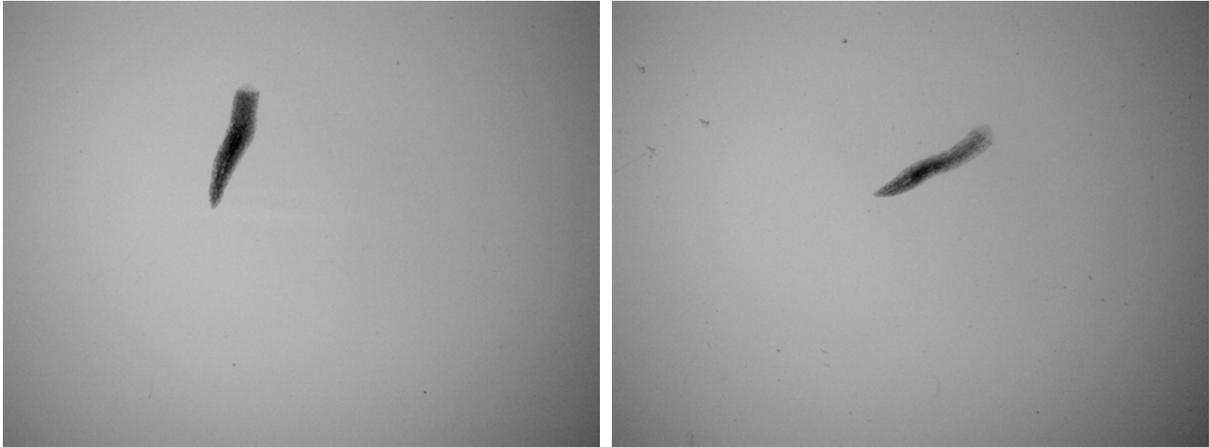
Определение 10. Под морфологической шириной будем понимать функцию зависимости площади носика от радиуса.

Таким образом функция $S_{head}(r)$ при фиксированном r чувствительна к величине угла, образующегося при отрастании головы червя.

Однако общая форма графика этой функции одинакова для разных особей и для разных стадий процесса регенерации.

На Рис. 4 можно видеть фотоизображения особи на 2 и 5 дни.

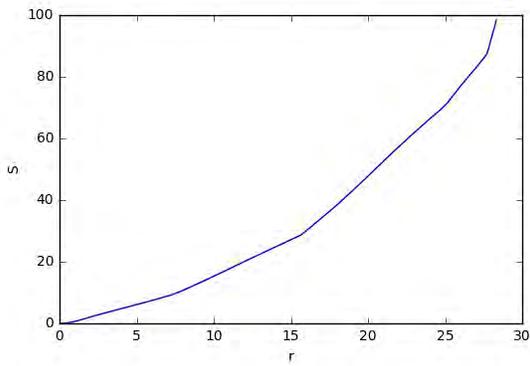
Данным изображениям соответствуют графики, изображенные на Рис. 5:



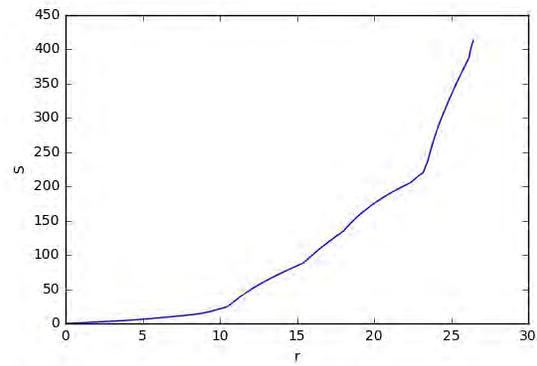
a) 2 день

b) 5 день

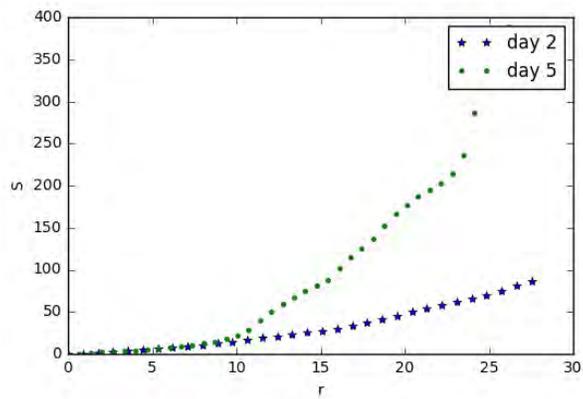
Рис. 4: Пример усиления «треугольной» структуры головы



a) 2 день



b) 5 день



с) совмещенные графики

Рис. 5: Графики морфологического спектра

Из данных графиков можно сделать вывод, что функция – монотонно возрастающая, причем скорость её роста увеличивается с увеличением радиуса вписанного

круга. Однако конкретный вид графика различается как для разных особей, так и для разных моментов морфогенеза. Сравнение графиков между собой позволяет оценивать скорости процесса регенерации.

Нормализация

Для получения достоверных оценок скорости регенерации планарий представляется целесообразным получить оценки морфологического спектра ширины интегрального характера, основанные на данных по большой группе животных. Процесс получения таких обобщенных оценок называется генерализацией и заключается в соединении графиков функций морфологического спектра ширины, полученных для отдельных особей. Поскольку планарии в группах отличаются своими размерами, эти графики также различаются масштабами. Для генерализации необходимо привести их к некоторому стандартному масштабу. Этот процесс называется нормализацией.

Определение 11. *Под нормализацией графика по радиусу будем понимать «вытягивание» графика по оси x до заданного значения радиуса R_{max} .*

То есть из первоначального графика $S_{head}(r)$, заданного на $r \in [0, r_{max}]$ получаем преобразованный график

$$\begin{aligned} r' &= r * k; \\ S'_{head}(r') &= S_{head}(r) * k^2 \end{aligned} \tag{2}$$

, где $r' \in [0, R_{max}]$, $k = \frac{R_{max}}{r_{max}}$.

Здесь коэффициент k^2 объясняется тем, что площадь квадратично зависит от радиуса окружности.

Графики функции строятся для каждого червя индивидуально и отличаются масштабами, в первую очередь, из-за различия в размерах червей. Поскольку аргументом функции морфологической ширины является радиус круга, вписанного в силуэт планарии, получается, что для червей, имеющих больший размер, область значений аргумента больше, чем для червей меньшего размера. Соответствующим образом для больших особей увеличивается и область значений функции.

Групповая функция

Пусть группа экспериментальных животных состоит из m особей и для каждой особи получена функция морфологического спектра ширины $S_{head}^i(r), i = 1, \dots, m$, заданная на отрезке $[0, r_{max}^i]$, где r_{max}^i - радиус максимального вписанного круга.

Полученные функции функции $S_{head}^i(r)$ будем называть *частными функциями морфологической ширины*.

Определим $R_{max} = \max(r_{max}^i), i = 1, \dots, m$. Произведем нормализацию всех имеющихся графиков и получим преобразованные графики $S_{head}^{i'}, i = 1, \dots, m$, заданные на $r \in [0, R_{max}]$. Полученные после нормализации функции имеют одинаковые диапазоны значений аргумента и согласованные по масштабу области значений функции. Учитывая эти особенности можно произвести усреднение по группе.

Определение 12. *Под усреднением по группе будем понимать среднее арифметическое между функциями, имеющими одинаковый диапазон значений аргументов и согласованные по масштабу области значений функции.*

$$S_{head}(r) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m S_{head}^{i'}(r) \quad (3)$$

Получившаяся после усреднения функция и будет называться *групповой функцией морфологической ширины*.

3 Метод вычисления морфологической ширины

Для построения описанного в предыдущем пункте показателя по заданным изображениям планарий необходимо выполнение следующих этапов работы для групп экспериментальных особей для каждого из заданных дней:

1. Предобработка изображений:
 - (а) сегментация;
 - (б) получение медиального представления планарии в виде непрерывного скелета и радиальной функции;

- (с) выделение области интереса — головы планарии.
- 2. Построение *частных* функций морфологической ширины:
 - (а) нахождение для каждой особи радиуса максимального вписанного круга.
 - (б) построение функции морфологической ширины для каждой особи;
- 3. Вычисление *групповой* функции морфологической ширины:
 - (а) Нормализация всех графиков.
 - (б) Усреднение графиков по группе.

3.1 Предобработка изображений

Сегментация

Определение 13. *Под сегментацией понимается отделение объекта от фона[3].*

Для заданных изображений сегментация производилась с помощью адаптивной бинаризации. То есть пороговое значение вычислялось как взвешенная сумма значений окрестности пиксела, где веса представляют собой гауссовское окно. В ходе экспериментов подбирался наилучший размер области, по которой вычислялся порог адаптивной бинаризации.

Ниже предоставлены примеры исходного (а) и бинаризованного (б) изображений:



а) исходное изображение



б) бинаризованное изображение

Рис. 6: Пример бинаризации изображения

Получение медиального представления планарии

Для получения медиального представления планарии необходимо по бинаризованному изображению построить скелет и радиальную функцию.

Для построения скелета удобнее работать не с самим бинарным объектом, а с его аппроксимацией многоугольной фигурой [2].

Определение 14. *Многоугольной фигурой называется фигура, у которой граница состоит из замкнутых ломаных линий.*

Границу многоугольной фигуры можно представить как объединение конечного числа подмножеств, называемых сайтами: сайтов-точек (вершины фигуры) и сайтов-сегментов (стороны фигуры без концевых точек).

Скелет многоугольной фигуры имеет вид геометрического графа, рёбрами которого являются отрезки прямых линий и квадратичных парабол, а вершинами – концевые точки рёбер (Рис. 7). Каждое ребро представляет собой связное множество точек-центров вписанных кругов, касающихся одной и той же пары сайтов, называемых образующими сайтами ребра. Если это пара однотипных сайтов (два сайта-точки или два сайта-сегмента), то ребро имеет форму прямолинейного отрезка. Если же сайты разнотипные (сайт-точка и сайт-сегмент), то ребро представляет собой отрезок квадратичной параболы.

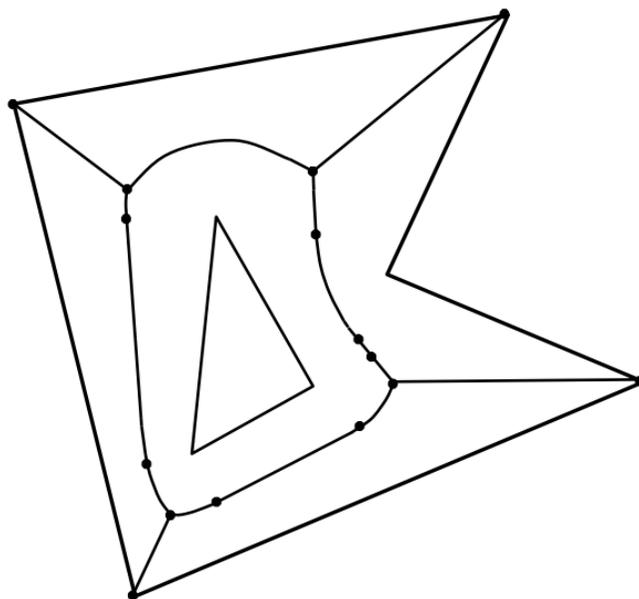


Рис. 7: Скелет многоугольника

Построение скелета многоугольной фигуры осуществляется с помощью высокоэффективных алгоритмов вычислительной геометрии[2]

Пример медиального представления для изображения планарии можно видеть на Рис. 8



Рис. 8: Медиальное представление планарии

Выделение области интереса

В решаемой задаче нас интересует исключительно область головы(причины этого указаны в пункте описания математической модели). Таким образом необходимо на изображении и в медиальном представлении выделить область интереса.

Важно правильно выбрать место отсечения. То есть радиус в месте отсечения должен превышать существенно значимый размер круга. Под существенно значимым размером понимается величина радиуса, равная примерно 80% от максимального пустого круга.

Кроме этого для удобства вычисления необходимо производить разрез, пересекая только центральные ребра. Это объясняется удобством последующих вычислений морфологической ширины.

В данной работе выделение производится вручную с помощью прописанного интерфейса. На Рис. 9 область выделена зеленой рамкой.

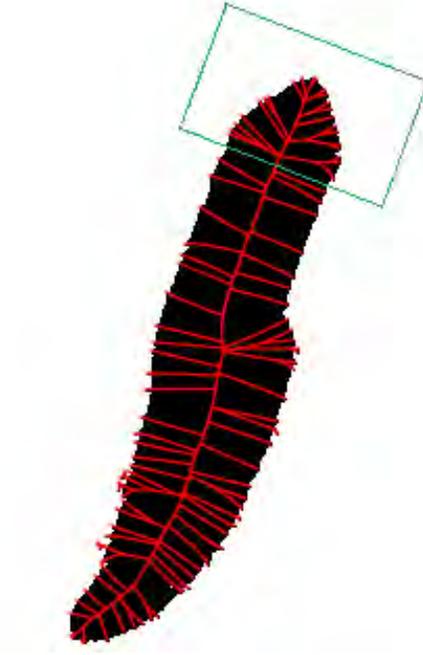


Рис. 9: Выделение области интереса

3.2 Построение *частной* функции морфологической ширины

Нахождение для каждой особи радиуса максимального вписанного круга

Для этого необходимо произвести несколько шагов:

1. Выделить подграф в скелете, соответствующий области интереса.
2. Найти максимальное значение радиальной функции для этого подскелета r_{max} .

Построение морфологического спектра для каждой особи

Для построения морфологического спектра заданной области для каждой особи необходимо выполнение следующих шагов [1]:

1. Выделенный в предыдущем пункте подграф разбить на множество ребер.
2. С помощью геометрических алгоритмов [1] построить множество $S_{disk} = \{S_r | r \in [0, r_{max}]\}$, где r_{max} найдено в предыдущем пункте, а r берется с некоторым изначально заданным шагом δ_r .

3. На основе множества S_{disk} вычислить морфологический спектр $S_{head}^{i'}(r)$

3.3 Вычисление *групповой* функции морфологической ширины

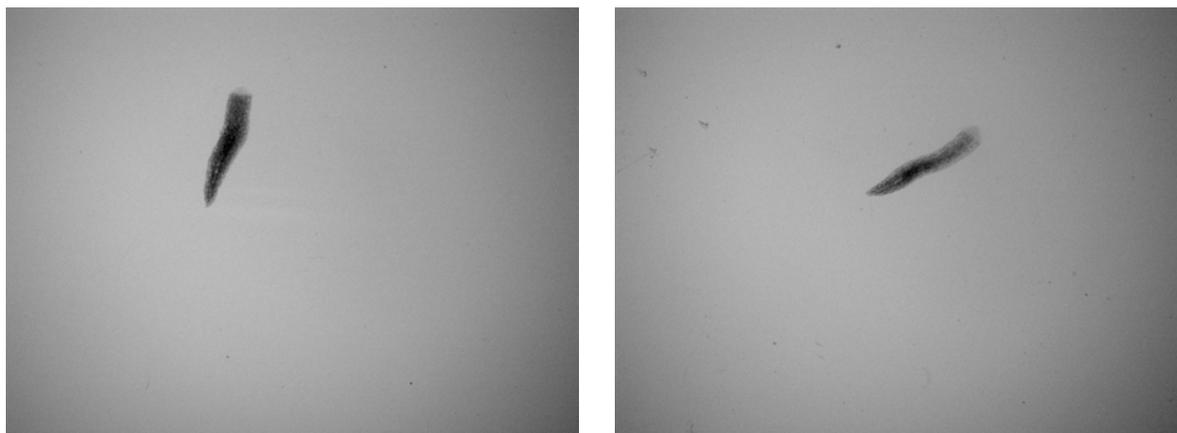
Вычисление *групповой* функции морфологической ширины по формулам (2) и (3) описанным в математической модели.

4 Вычислительные эксперименты

4.1 Исходные данные и условия эксперимента

Исходные данные

Для оценки пушинской лабораторией были предоставлены наборы изображений для *подопытной* группы, помещенной в раствор пептида в концентрации 10^{-12} , и *контрольной* группы, помещенной в воду, сделанные на протяжении недели. Для каждого дня сделаны фотографии для 20 - 30 особей.



2 день

5 день

Рис. 10: Пример исходных данных

Сегментация

Все изображения проходили бинаризацию.

На Рис. 11 можно видеть пример полученных бинаризованных данных



Рис. 11: Пример бинаризованных изображений

Описание выборки

Для дальнейшей работы была сгруппирована подвыборка объектов.

Графики строились только для 3, 5 и 7 дней. Для каждого дня выбирались не все особи, а только часть. Это объясняется тем, что среди фотографий, полученных в процессе наблюдения, не все оказались пригодными для получения требуемых оценок. Поэтому в расчетах производился отбор фотографий приемлемого качества.

В таблице приведены данные о количестве планарий в каждой группе и количестве отобранных фотографий по группам и по дням. Здесь графы «к» и «о» относятся к контрольной и подопытной группам соответственно.

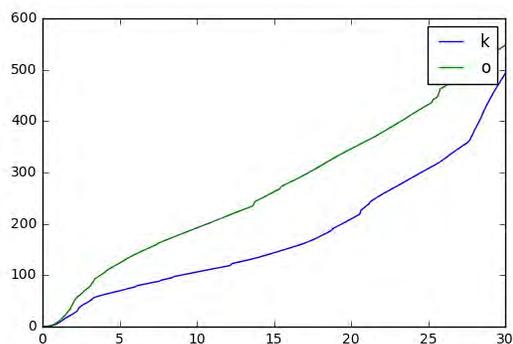
номер дня	3		5		7	
	к	о	к	о	к	о
Всего в группе	28	29	27	28	25	25
Всего в выборке	18	19	16	13	12	12

Таблица 1:

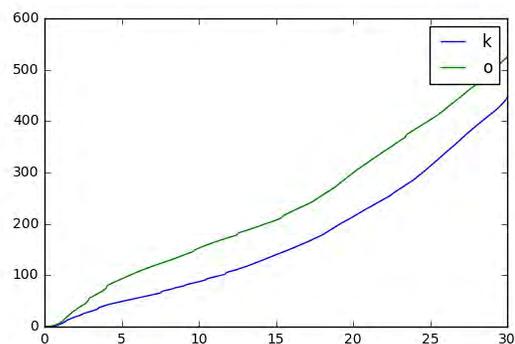
4.2 Результаты эксперимента

В результате применения алгоритма, описанного ранее, получились графики морфологического спектра для 3, 5, 7 дней для контрольной и подопытной групп.

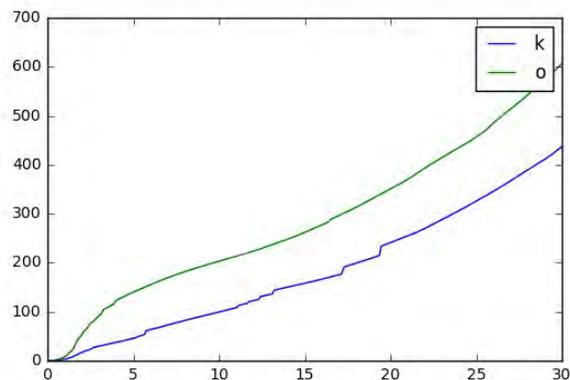
Опытная группа описывается зелеными кривыми, контрольная группа – синими. Сравнительный анализ этих диаграмм позволяет сделать выводы относительно скоростей регенерации планарий в группах.



3 день



5 день



7 день

Рис. 12: Результирующие графики

Полученные групповые функции морфологической ширины открывают возможность для анализа динамики регенерации планарий в каждой группе и для сравнения этой динамики в разных группах.

4.3 Обсуждение и выводы

1. Скорости регенерации в опытной группе выше, чем в контрольной. Это утверждение следует из очевидного наблюдения, что зеленые кривые лежат выше синих для всех трех дней. Более высокое положение кривой соответствует большей площади носика при заданном размере вписанного круга. А площадь носика тем больше, чем этот носик более вытянут, что в свою очередь связано с более продвинутым процессом регенерации. Таким образом, монотонность функции свидетельствует о вытягивании носика планарии, т.е. об изменении его формы по мере регенерации в сторону более «остроугольного» вида.
2. Из предыдущего пункта можно сделать биологический вывод о том, что пептид стимулирует регенерацию планарий.
3. Процесс регенерации адекватно отражается на изменении графиков морфологической ширины. Однако кривые одного цвета, полученные для более позднего этапа регенерации, не обязательно мажорируют такие же кривые для более ранних этапов. В рассмотренном примере кривые для пятого дня лежат не выше кривых для третьего дня. Этот эффект можно объяснить тем обстоятельством, что регенерация планарий происходит с изменением формы тела и малом изменении общего объема тела.
4. Непосредственная количественная оценка скорости регенерации может быть получена на основе значений функции морфологической ширины в какие-то фиксированные дни для заданных значений радиуса вписанного круга. Пример такой количественной оценки представлен в таблице 2

Здесь под величиной $V(r, t)$ понимается общий коэффициент сравнительной скорости регенерации.

$$V(r, t) = \frac{S_{head,t}^{(o)}(r)}{S_{head,t}^{(k)}(r)}$$

, где $S_{head,t}^{(k)}(r)$ и $S_{head,t}^{(o)}(r)$ соответствуют групповой функции морфологической ширины для t -го дня для контрольной и подопытной групп соответственно.

Следует отметить, что наибольшего доверия заслуживают значения коэффициентов при $r = 20$. Это объясняется тем, что при малых размерах вписанного круга

Номер дня(t)	3			5			7		
Исследуемый радиус (r)	10	20	30	10	20	30	10	20	30
Опытная группа	192	346	549	152	300	526	203	351	609
Контрольная группа	106	209	498	87	200	447	99	241	438
$V(r, t)$	1.81	1.66	1.10	1.74	1.50	1.18	2.05	1.45	1.39

Таблица 2:

часто проявляется шумовое влияние неровностей границы силуэта планарии, что снижает точность расчетов. А при больших размерах круга, когда его размеры приближаются к размеру головы, может возникнуть краевой эффект, вызванный элементами границы силуэта, не относящимися к заостренному «носику» головы планарии.

5 Заключение

- Исследованы методы медиального представления объекта на основе скелета и радиальной функции, а также построения морфологического спектра на основе дискового покрытия фигуры.
- Создана математическая модель формы силуэта планарии, позволяющая анализировать скорость регенерации головы плоского червя - планарии.
- Предложен новый показатель для оценки этой скорости.
- Проведены вычислительные эксперименты, показывающие, что предложенный показатель применим для исследуемой задачи и позволяет уже на третий день уверенно различать контрольную и опытную группы.
- Предложены идеи для дальнейшего развития метода, в частности, введение коэффициента сравнительной скорости регенерации.

Список литературы

- [1] Н.А. Ломов, Л.М. Местецкий. Площадь дискового покрытия – дескриптор формы изображения. // Компьютерная оптика, 2016. Т. 40
- [2] Л.М. Местецкий. Непрерывная морфология бинарных изображений: фигуры, скелеты, циркуляры. // ФИЗМАТЛИТ, 2009.
- [3] Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображения. // Техносфера, 2005.
- [4] Х.П. Тирас, К.Б. Асланиди. Тест-система для доклинического исследования медицинской и экологической безопасности на основе регенерации планарий. // ТулГУ, 2013. стр. 63.
- [5] Т. Пичугина. В Пуцино спасение от рака ищут в червяках. // 2016.
<http://serp.mk.ru/articles/2016/04/06/v-pushhino-spasenie-ot-raka-ishhut-v-chervyakakh.html>.