

## РАЗРАБОТКА МОДУЛЯ ЧАСТИЧНОЙ АВТОМАТИЗАЦИИ ВЫДЕЛЕНИЯ КОНТУРОВ КЛЕТОК НА ЦИФРОВЫХ МИКРОФОТОГРАФИЯХ ДЛЯ ПРОГРАММНОГО КОМПЛЕКСА FIJ

А.З. ГЛУХОВ<sup>1</sup>, А.В. НИКОЛАЕВА<sup>1</sup>, И.И. СТРЕЛЬНИКОВ<sup>1</sup>, К.В. МУДРЕЦОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Донецкий ботанический сад», Донецк (donetsk-sad@mail.ru)

<sup>2</sup>ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», Донецк (mudretsova@yandex.com)

## THE DEVELOPMENT OF THE FIJI PROGRAM COMPLEX PLUG-IN FOR THE CELLS TRACING PARTIAL AUTOMATION ON DIGITAL MICRO-PHOTOGRAPHS

A.Z. GLUKHOV<sup>1</sup>, A.V. NIKOLAEVA<sup>1</sup>, I.I. STRELNIKOV<sup>1</sup>, K.V. MUDRETSOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>PI «Donetsk Botanical Garden», Donetsk (donetsk-sad@mail.ru)

<sup>2</sup>SEI HPE Donetsk National University (mudretsova@yandex.com)

**Резюме.** В работе представлена общая концепция реализации и схема функционирования программного модуля, ассистирующего пользователю в процессе выделения контуров клеток на цифровых микрофотографиях поперечных срезов листовых пластинок. Модуль реализует функции сохранения информации об изображении, координат опорных точек контура и размеров клеток в базе данных PostgreSQL. В целях стандартизации процесса, модуль содержит ряд инструментов для выделения интересующих частей клеток и формирования опорной сети линий для выделения гомологичных точек контуров. Разработанный модуль позволяет ускорить обработку изображений и добиться высокой consistency данных.

**Ключевые слова:** FIJ, контуры клеток, автоматизация, опорные точки.

**Abstract.** The paper presents a general realization concept and a functional schema of the FIJI plug-in, which assists a user in the process of the cells' silhouettes acquisition on leaf lamina cross-sections micro-photographs. The plug-in implements saving of an image information, silhouettes landmarks coordinates and cell size in PostgreSQL database. In order to standardize the process the plug-in contains a set of instruments for the cell parts selection and for the support lines mesh generation, which help in homologous landmarks registration. Developed plug-in allows to increase an images processing speed and to achieve high data consistency.

**Key words:** FIJI, cells silhouettes, automation, landmarks.

Современные экологические и интродукционные исследования растений редко обходятся без анализа морфолого-анатомической пластичности растений. При этом всё чаще применяются различные методы компьютерной автоматизации процессов сбора биометрических характеристик объектов. В последние годы сформировался новый термин – фенотипирование растений. Этот термин подразумевает стандартизированный, протоколированный, быстрый, обычно автоматизированный (в той или иной степени) процесс получения фенотипической информации о растительном объекте в разных экологических условиях. Возникновение концепции фенотипирования обусловлено, в первую очередь, растущим размером исследуемых выборок (в частности при картировании признаков в системе генотип – фенотип). Немаловажным является растущая озабоченность научного сообщества проблемой воспроизводимости научных опытов, которая требует стандартизации процессов получения и обработки данных [Richards, 2006].

Одной из перспективных тем, разрабатываемых в Государственном учреждении «Донецкий ботанический сад», является исследование приспособительной роли оптических свойств листовых пластинок. Важным параметром, воздействующих на распределение и поглощение световой энергии в толще листа, выступает форма клеток. Наиболее значимое влияние оказывает конфигурация периклинальных поверхностей эпидермальных и палисадных гистологических слоёв [Brodersen, 2010]. Изменяя форму соответствующих участков (в частности кривизну) растение реализует приспособительные реакции по отно-

шению к тем или иным условиям освещения. Несмотря на потенциальную важность этой группы адаптивных реакций, их исследованность остается фрагментарной и не полной.

В процессе рекогносцировочных работ по определению формы клеток растений, развивающихся в разных условиях освещения, выявился ряд методологических трудностей. Прежде всего, отсутствие стандартизованных методов для оценки и дальнейшего статистического анализа формы клеток. Перспективным выглядит решение этого вопроса в рамках концепции «современной морфометрии». Этот подход основан на математическом представлении формы объекта через описание взаимной конфигурации опорных точек на его контуре. Группа методов позволяет получать сравнимые количественные метрики для форм гомологичных объектов (в частности клеток), которые подходят для дальнейшего статистического анализа [Glukhov, Strel'nikov, 2014]. Задача подготовки данных, при этом, заключается в выделении опорных точек на контуре объекта и определении их взаимного положения в прямоугольной системе координат. Очевидно, что для этого требуется обработка цифровых изображений микропрепаратов срезов листа компьютерными методами. В рамках работы, программным обеспечением для работы с изображениями выбрано FIJI [Schindelin et al., 2015].

Вторая методологическая проблема – плохая воспроизводимость измерений, производимых разными исследователями. Причина кроется в субъективности восприятия границ объектов с плавными очертаниями. Например, на 2-х мерном изображении среза столбчатой клетки мезофилла требуется выбрать «верхнюю» выпуклую стенку и отметить 5 равноудалённых точек вдоль её контура. Точки перехода вертикальных стенок в горизонтальные визуально выделяются достаточно хорошо. Расстановка же равноудалённых точек вызывает большие затруднения, особенно если изображение клетки наклонено относительно горизонтали. Разные исследователи располагают эти точки по-разному, что ставит под вопрос выводы, сделанные на базе таких измерений. Решением данной ситуации может быть частичная автоматизация процесса регистрации контуров клеток с формированием опорных сеток для выделения интересующих точек.

В связи с вышесказанным, целью работы стало разработать модуль для программного комплекса FIJI, который обеспечит автоматизацию процессов сохранения информации средствами базы данных и будет содержать набор инструментов, стандартизирующих процесс выделения опорных точек на контурах отдельных клеток.

Задачи, которые должен решать модуль: обеспечить сохранение и организацию данных о микрофотографиях и координатах выделенных точек. Реализовывать инструменты для выделения частей изображения, с автоматическим увеличением и поворотом участка до вертикального положения. Отображать опорную сетку, над выделенным участком клетки для облегчения и стандартизации выбора равноудалённых точек контура. Содержать команды для увеличения контраста и резкости изображения.

Поставленные задачи решали встроенными в FIJI средствами разработки модулей. Рабочим языком программирования выбран Python 2.5 (с использованием Java библиотек). Средством хранения информации выбрана база данных PostgreSQL 9.6. Базовый входной формат изображений – Zeiss AxioVision ZVI. По сути, разрабатываемый модуль является приложением с многооконным графическим интерфейсом пользователя, запускаемым из основного окна FIJI.

Логическая структура работы модуля содержит три иерархические ступени: проект → изображение → измерение (точки). Базовым элементом, являются проекты. В предлагаемой логике, один проект соответствует одному виду растения. Все последующие сохраняемые данные отказываются привязанными к конкретному проекту. В начале работы пользователь может создать новый проект или выбрать уже существующий. При создании проекта, модуль запрашивает у пользователя его название и папку на жёстком диске, в которой будут храниться файлы. Проект содержит набор обрабатываемых изображений (файлы автоматически сортируются в структуру папок на жёстком диске). После выбора

проекта пользователь может добавить новое изображение к проекту или продолжить работу с ранее добавленными. Для нового изображения задается тип листа (в текущей реализации доступные типы – световой, теневой, неопределённый). Кроме того, пользователь должен прочертить осевую линию, проходящую вдоль изображения среза. В дальнейшем эта линия служит основой для выравнивания наклонных изображений.

Далее, следует этап определения точек контуров или размеров клеток. Для этого, модуль открывает новое окно управления. Из него доступен ряд вспомогательных функций. 1. Начертить случайную линию. По нажатию на кнопку функции, на изображении прочерчивается линия, перпендикулярная к осевой линии в случайной точке. Эта линия служит для случайного (лишнего субъективности) выбора клетки на изображении. 2. Повернуть на 180°. Используется, если изображение содержит перевернутый срез. 3. Увеличить контраст. Функция проводит увеличение контрастности с величиной сатурации 0,3%. Может быть повторена многократно. 4. Повышение резкости. 5. Разложение цветного изображения на цветовые каналы и обратно. 6. Отобразить ранее обработанные клетки.

После необходимых трансформаций пользователь может выделить клетку для дальнейшей обработки. По нажатию на кнопку функции инициируется инструмент выделения прямоугольником по трём точкам. Пользователь должен щелчками мыши на изображении последовательно выбрать левый нижний, правый нижний и правый верхний угол прямоугольника вокруг интересующей клетки. После этого модуль создаст новое окно с увеличенным изображением выделенного прямоугольника, выровненного по вертикали. Далее возможен выбор варианта обработки – выделение опорных точек контура или измерение длины и ширины клетки.

Выделение точек контура проводится для клеток столбчатого мезофилла или эпидермиса. Основная цель – выделить по 7 равноудалённых точек на верхней и нижней стенках клеток (первая и последняя точки – место перехода горизонтальных стенок в вертикальные). В рамках исследования подразумевается, что вертикальные стенки прямые или могут быть аппроксимированными к прямым. Собственно процедура заключается в выделении, сначала, верхней периклиальной стенки. Пользователь должен отметить точки перехода горизонтальной стенки в вертикальные (горизонтальные границы) и вершину выпуклости (вертикальную границу). Для этого, также, используется инструмент выделения по трём точкам, но при перемещении курсора, отображаются параллельные линии, помогающие в определении границ периклиальной стенки. Выделенная область вновь отображается в новом окне, увеличивается и выравнивается по вертикали. Поверх участка наносятся вспомогательные линии. Одна горизонтальная линия, проходящая через горизонтальные границы. И пять равноудалённых линий, перпендикулярных первой. Задача пользователя отметить указателем мыши точки пересечения вертикальных линий с контуром клеточной стенки. Полученные точки вместе с точками горизонтальных границ и являются целевыми опорными метками. Далее, изображение выбранной клетки автоматически поворачивается на 180° и процедура повторяется для нижней периклиальной стенки (которая становится верхней на изображении). После проведения манипуляций и выделения всех точек, пользователь должен указать гистологический слой, к которому относится данная клетка, и подтвердить сохранение. После этого, данные автоматически сохраняются в базу данных с учётом структуры проекта. Важно, что система отслеживает все манипуляции, включая вырезки, повороты и выравнивания, и трансформирует полученные координаты точек соответствующим образом. В результате, координаты точек соответствуют пространству исходного изображения, что практически не реализуемо при чисто ручной обработке.

Длина и ширина, в рамках исследования, определяются для клеток губчатого мезофилла. Измерение размеров проводится на увеличенном изображении выбранной клетки. Пользователь должен отметить две точки вдоль визуальной самой длинной оси клетки. После этого, при перемещении мыши, через точку курсора будет отрисовываться



К настоящему моменту модуль находится в стадии тестирования и доводки. Уже сейчас можно констатировать, что его использование значительно ускоряет процесс выделения опорных точек или измерения размеров. По сути, весь процесс обработки контуров одной клетки требует от пользователя всего 19 щелчков мышью. Все остальные процедуры, включая повороты изображений, масштабирование и сохранение данных выполняются модулем автоматически. Унификация действий, гарантированная выровненность объектов по вертикали и использование опорных вспомогательных линий делает процедуру сбора данных более воспроизводимой. Автоматическое сохранение информации и управление расположением файлов обеспечивает консистентность данных и минимизирует роль человеческого фактора при проведении измерений.

### ЛИТЕРАТУРА

- Brodersen C.R., Vogelmann T.C.** 2010. Do changes in light direction affect absorption profiles in leaves? *Functional Plant Biology*. 37(5): 159–64.
- Cordón G.B., Lagorio M.G.** 2007. Optical properties of the adaxial and abaxial faces of leaves. Chlorophyll fluorescence, absorption and scattering coefficients. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 6(8): 873–882.
- Glukhov A.Z., Strel'nikov I.I.** 2014. Lamina shape variability in species of the genus *Ficus* L. in different ecological conditions. *Contemp. Probl. Ecol.* 7(2): 210–220.
- Richards C.L., Bossdorf O., Muth N.Z., Gurevitch J., Pigliucci M.** 2006. Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters*. 9(8): 981–993.
- Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., Eliceiri K.W.** 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*. 82(7–8): 518–29.