



Işıklı Mikroskopik Sistemlerde Sitopatolojik Analiz için Optimum Odaklamaya Sahip 2B ve 3B İmgelerin Üretilmesi

Generation of Optimal Focused 2D and 3D Images for Cytopathological Analysis in Light Microscopic Systems

Hülya Doğan, Elif Baykal ve Murat Ekinci
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Trabzon, Türkiye
{hulya, ebaykal, ekinci}@ktu.edu.tr

Mustafa Emre Ercin ve Şafak Ersöz
Patoloji Bölümü
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Trabzon, Türkiye
{drmustafaemreercin, sersoz}@ktu.edu.tr

Özetçe —Işıklı mikroskopik sistemlerde daha gerçekçi sitopatolojik analizler için patoloğların numunedeki hücrelerin yerlerini ve boyutlarını daha kolay tespit etmelerine yardımcı olan optimum odaklamaya sahip 2B ve 3B görüntüler üretmek istenmektedir. Numunenin 3B yapısını çıkarmak ve optimum odaklamaya sahip 2B imgesini elde etmek için 2B çoklu odaklı imgeleri kullanan çeşitli çalışmalar literatürde uzun yıllardır aktif olarak uygulanmaktadır. Bu çalışmalarda tüm numune ve büyütme objektif çeşitleri için 2B çoklu odaklı imgeler mikroskop platformu Z eksenini üzerinde rastgele belirlenen sabit aralık boyunca hareket ettirilerek elde edilmektedir. Ek olarak, 2B çoklu odaklı imgelerden önemli bilgilerin çıkarılması ve numunenin Z eksenindeki tüm bölgesinin taranması garanti edilememektedir. Literatür araştırmalarının aksine, önerilen çalışmada ışıklı mikroskopik sistemlerdeki sitopatolojik analiz için optimum aralık ve 2B çoklu odaklı imge sayısı belirlenerek optimum odaklamaya sahip 2B ve 3B imgeler üretilmektedir. Önerilen yaklaşım önışlem ve Odaktan Şekil olmak üzere iki ana aşamada gerçekleştirilmektedir. Önerilen yaklaşımın performans analizi için iki farklı referans görüntü gerektirmeyen metrik kullanılmakta ve başarısı nicel ve görsel sonuçlarla ispatlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler—sitopatolojik analiz, odaktan şekil, odaklama derinliği, ışıklı mikroskopik sistem.

Özet—It is desirable for more realistic cytopathological analysis in light microscopic system to generate optimal focused 2D and 3D images, which help pathologists detect the locations and size of the cells in the specimen. Various studies using 2D multi-focus images in order to extract 2D focused images and 3D structure of the specimen have been actively applied in the literature for many years. In these studies, microscope platform is moved along the fixed range determined randomly on the Z axis for all types of specimens and magnification objectives. However, it is not guaranteed that significant information is extracted from the 2D multi-focus images and whole region of the specimen on the Z axis is scanned. Contrary to literature studies, our proposed study generates optimal focused 2D and 3D images for cytopathological analysis in the light microscopic systems by selecting optimal

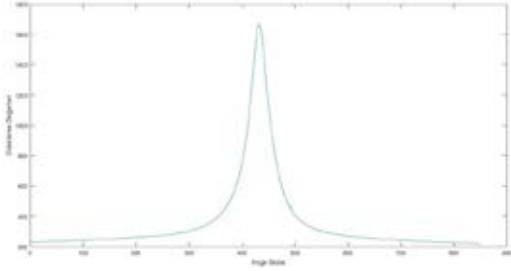
range and the number of 2D multi-focus images. Our approach is performed in two main stage; pre-process and Shape from Focus (SFF). In order to evaluate performance more realistic, two different non-reference quality metrics are used, and the success of proposed approach is proven by both quantitative and visual results.

Keywords—cytopathological analysis, shape from focus, depth of field, light microscopic system.

I. GİRİŞ

Sitopatolojik analiz süreci bireylerden çeşitli yöntemlerle alınan hücrelerin mikroskop ile incelenmesi olarak tanımlanmakta ve patoloğlar tarafından el-göz koordinasyonu ile gerçekleştirilmektedir [1]. Işıklı mikroskopik sistemlerde mikron seviyede incelenen numunelerin optimum odaklamaya sahip 2B ve 3B imgeleri numune üzerindeki hücrelerin yapısı daha belirgin hale getirmekte ve birbirlerinden ayırt edilmesi sürecinin kolaylaştırılması sağlamaktadır. Bu nedenle, segmentasyon ve hücrelerin tespiti için uygulanan görüntü işleme yöntemlerinin başarıları pozitif olarak artmaktadır.

Işıklı mikroskopik sistemlerde 2B çoklu odaklı imgeler kullanarak numunenin optimum odaklamaya sahip 2B ve 3B imgelerini çıkartmak literatürde uzun yıllardır aktif olarak çalışılan alanlardan biridir. Literatürdeki çalışmalar ışıklı mikroskopik sistemlerde numunenin optimum odaklanmış 2B imgesinin ve 3B yapısının çıkarılması için en çok tercih edilen yöntemin Odaktan Şekil olduğunu göstermektedir [2]. Klasik Odaktan Şekil yaklaşımlarında aynı görüş alanına ve farklı odaklamalara sahip 2B görüntülerden oluşan imge dizisi oluşturulurken Z ekseninde rastgele bir noktadan başlanmakta ve rastgele başlangıç ve bitiş noktası olan aralık boyunca tarama gerçekleştirilmektedir [2,3]. Literatür çalışmalarında imge dizisi oluşturulurken 2B çoklu odaklı imgelerin sayısı



Şekil 1: Rastgele belirlenen aralıktaki imge dizisinin odaklama değerleri

incelenen numunenin türüne ve kullanılan mikroskop objektifinin büyüklüğüne göre değişmemektedir. Ancak numuneden kritik odaklama bilgilerinin çıkarılması sürecinde Z ekseninde taranan aralığın başlangıç ve bitiş konumlarının, imge dizisindeki 2B görüntü sayısının etkili olduğu görülmektedir. Odaktan Şekil yaklaşımında daha detaylı ve optimum odaklamaya sahip 2B ve 3B imgeler elde etmek için numunenin Z ekseninde 3B yapısının tam taranması garanti edilmelidir. Optimum odaklanmış 2B ve 3B imge elde etme süreçlerinde numunenin 3B yapısının tam olarak taranmamasının, aynı görüş alanına ve farklı odaklamalara sahip 2B imgelerin sayısı ve taranan aralığın etkisini göstermek için mikroskop platformu rastgele belirlenen aralıkta hareket ettirilerek toplam 1000 görüntüden oluşan imge dizisi oluşturulmuştur. Bu 2B imgelerin odaklama değerleri Varyans otomatik odaklama fonksiyonu kullanılarak hesaplanmış ve Şekil 1'de gösterilmiştir. Odaktan Şekil yaklaşımı Şekil 1'deki tüm imgeleri kullanarak Şekil 2a ve 2b'deki 2B ve 3B imgeleri üretmiştir. Şekil 2a'da görüldüğü gibi görüntülenen alandaki numunenin üç boyutlu yapısı Z ekseninde 400 ile 450 indisleri arasına yayılmıştır. Başlangıç ve bitiş noktaları arasındaki aralığın geniş olduğu durumlarda numunenin üç boyutlu yapısının dışında kalan 2B imgeler kullanılmış ve numunenin gerçek üç boyutlu yapısı etrafında aykırı değerlerin ve varyasyonların oluştuğu gözlemlenmiştir. Başlangıç ve bitiş noktalarının numuneden kritik odaklama bilgilerini elde etme sürecindeki etkisini göstermek için Şekil 1'deki imge dizisinden rastgele olarak farklı başlangıç ve bitiş noktaları belirlenmiştir. Başlangıç noktası 150 ve bitiş noktası 400 indisleri arasındaki aralık alınarak elde edilen 2B ve 3B imgeler Şekil 2c ve 2d'de gösterilmiştir. Tüm numune alanı Z ekseninde taranmadığında görüntüleneni numune alanının odaklama bilgileri tamamiyle elde edilememiştir. Yetersiz 2B çoklu odaklı imgelerin kullanımından dolayı sonuç görüntülerde bozukluklar ve gürültü oluşmuştur.

Literatür çalışmalarında da belirtildiği gibi Odaktan Şekil yaklaşımında odaklama derinliğinin dikkate alınmadığı ve numunenin alanının Z ekseninde tam taranmadığı durumlarda elde edilen 2B ve 3B imgelerde gürültü ve aykırı değerler oluşmaktadır. Çalışmamız ışıklı mikroskopik sistemlerde sitopatolojik analiz için optimum odaklamaya sahip 2B ve 3B imgeler üretmeyi amaçlamaktadır.

II. ÖNERİLEN YAKLAŞIM

Önerilen yaklaşım önışlem ve Odaktan Şekil olmak üzere iki ana aşamadan oluşmaktadır.

A. Önışlem

Önışlem aşamasında, optimum odaklamaya sahip 2B ve 3B imgelerin oluşturulması sürecinde kullanılan 2B çoklu odaklı imgelerin sayısı ve taranan aralık incelenen numune türüne ve objektif büyüklüğüne göre kestirilmektedir. Şekil 1'deki imgelerin odaklama değerlerinde ve Şekil 2a'da gösterilen 3B yapısında, numunenin bütün üç boyutlu yapısının en odaklanmış 2B imgenin etrafına yayıldığı ve odaklama bakımından zengin olan imgelerin odaklama değeri maksimum olan imgeye yakın konumda oldukları görülmektedir. Numunenin Z ekseninde tüm alanının taranması ve odaklama bakımından tüm bilgilerin elde edilmesi için maksimum odaklama değerine sahip olan imge ve yakın konumdaki imgelerin kestirilmesi garanti edilmelidir. Bu amaçla çalışmada en yüksek odaklama değerine sahip olan imge referans kabul edilmektedir. Referans imgenin bulunması için Z ekseninde herhangi bir rastgele noktadan başlanarak mikroskop platformu hareket ettirilmekte ve otomatik odaklama işlemi gerçekleştirilmektedir. Z ekseninde rastgele konumdan başlanıldığı için Odaktan Şekil yaklaşımında etkili olan tüm numune alanının tarandığı garanti edilemez. Bu yüzden başlangıç noktasını belirlemek için mikroskop platformu zıt yönde hareket ettirilmektedir. Platform hareketi sırasında noktalar arasındaki eğimlerin farkı belirli bir eşik değeri (φ) ile karşılaştırılmakta ve başlangıç noktası (x_i) Denklem (1) kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$\left| \frac{f_i - f_{i+1}}{x_i - x_{i+1}} - \frac{f_{i+1} - f_{i+2}}{x_{i+1} - x_{i+2}} \right| \leq \varphi \quad (1)$$

Denklem (1)'de f_i , f_{i+1} ve f_{i+2} değerleri x_i , x_{i+1} ve x_{i+2} indisli imgelerin odaklama değerlerini temsil etmektedir.

Bitiş noktası Şekil 3'te gösterildiği gibi başlangıç ve referans noktaları arasındaki uzaklık (Δt) kullanılarak hesaplanmaktadır.

Bundan sonraki adımda referans nokta merkez alınarak Şekil 4'te görüldüğü gibi imge dizisi üzerinde farklı uzaklıklara sahip aralıklar tanımlanmaktadır. Aralıkları belirli bir matematiksel modele göre tanımlamak için Gauss (Normal) Dağılımı kullanılmakta ve önceki adımda oluşturulan imge dizisindeki görüntülerin odaklama değerlerine bu dağılım uydurulmaktadır.

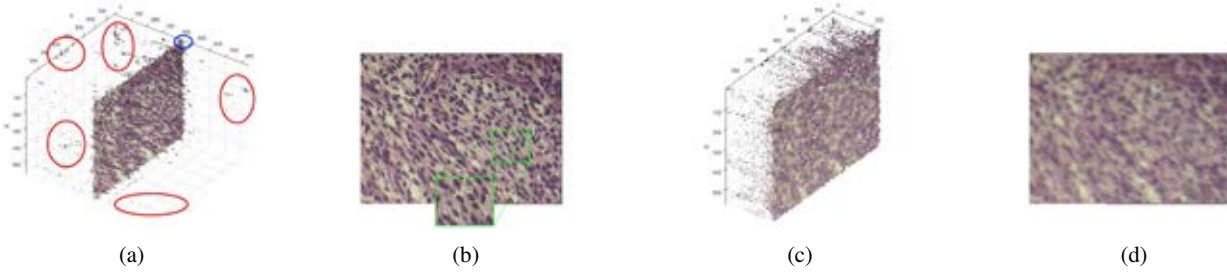
Test Dizisi	Objektif	İS	RGİ	SS
1.	10X	1047	524	247.2983
2.	10X	1053	527	269.6680

Tablo I: Test Dizileri için Önışlem Aşamasının Sonuçları

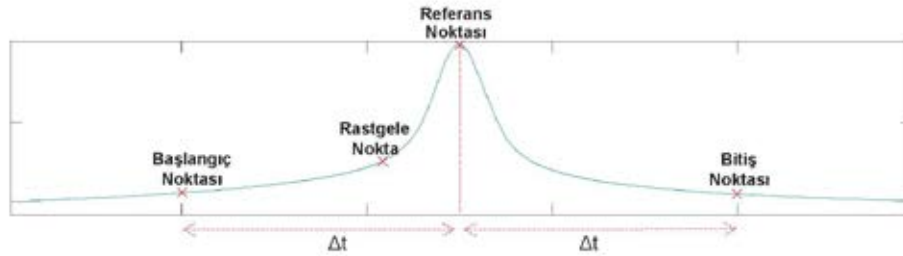
B. Odaktan Şekil

Odaklama derinliğine dayanan Odaktan Şekil farklı bölgeleri odaklanmış imge dizisinden her pikselin derinliğini (3B yapısı) ve optimum odaklamaya sahip 2B görüntüyü elde etmeyi amaçlayan pasif bir yaklaşımdır. Bu aşamada gerçekleştirilen işlem adımları şu şekildedir:

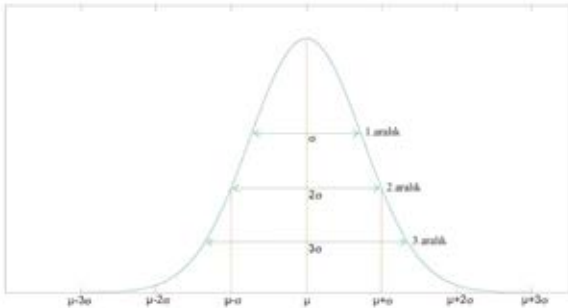
1) *İmge Dizisindeki Görüntü Piksellerinin Odaklama Bilgilerinin Hesaplanması:* Odaklama operatörleri kullanılarak imge dizisindeki her piksel için odaklama bilgisi hesaplanmakta ve her görüntü için odaklama değerlerinden oluşan



Şekil 2: İmge dizisinin tümü kullanılarak elde edilmiş 3B (a) ve 2B (b) imgeler, imge dizisinin 150 – 400 indisleri arasındaki aralık kullanılarak elde edilmiş 3B (c) ve 2B (d) imgeler



Şekil 3: Otomatik Odaklama ile başlangıç, referans ve bitiş noktalarının belirlenmesi



Şekil 4: Farklı uzaklıklara sahip aralıklar

Test Dizisi	Aralık	Baş. Noktası	Bit. Noktası	İS
1.	σ	400	648	248
	2σ	277	771	494
	3σ	153	895	742
2.	σ	392	662	270
	2σ	257	797	540
	3σ	122	932	810

Tablo II: Test Dizileri için Belirlenen Aralıklar

odaklama dizisi elde edilmektedir. Piksellerin odaklama seviyelerini hesaplamak için literatürde birçok operatör önerilmiştir [2-4]. Önerilen operatörler gradyan tabanlı (eşiklenmiş gradyan, tenengrad, karesel gradyan ve brenner), laplacian tabanlı (laplacian enerjisi ve modifiye edilmiş laplacian), dalgacık tabanlı (dalgacık katsayıları toplamı ve dalgacık katsayıları

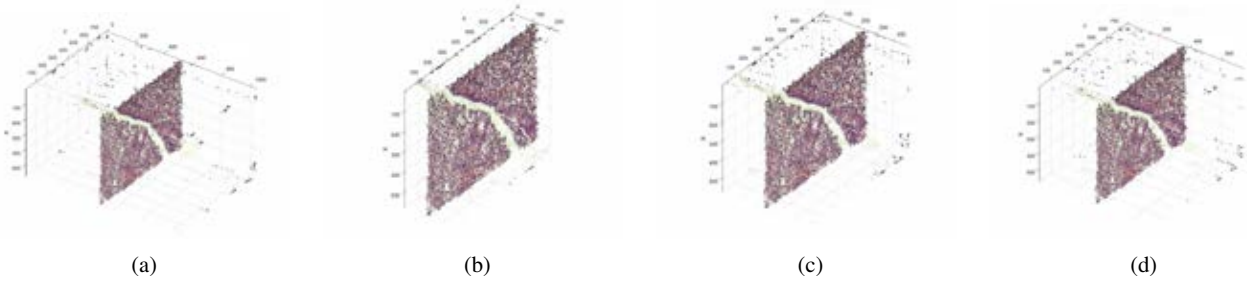
varyansı), istatistik tabanlı (varyans ve normalize varyans), ayrık kosinüs dönüşümü tabanlı (ayrık kosinüs enerji oranı ve ayrık kosinüs azaltılmış enerji oranı) ve diğer operatörler (otokorelasyon ve ayrık fourier dönüşümü) olmak üzere altı gruba ayrılmaktadırlar.

2) *Maksimum Odaklama Değerine Sahip Pikselin Belirlenmesi*: Her piksel koordinatı için odaklama vektörü oluşturulmaktadır. Elde edilen odaklama vektöründen maksimum değere sahip olan görüntü seçilerek optimum odaklamaya sahip 2B ve 3B imgeler çıkarılmaktadır.

III. DENEYSEL SONUÇLAR

Çalışmada kullanılan veri tabanı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarında sitopatolojik analiz için hazırlanan numunelerden oluşturulmuştur. Veri setindeki mikroskobik görüntüler ışıklı mikroskop altında 10X büyütme objektifi ile taranarak elde edilmiş ve 800x600 çözünürlüğünde kaydedilmiştir. Mikroskop platformunun Z ekseninde hareketini gerçekleştiren motorunun adım büyüklüğü 0,00675 mikrometredir.

Önerilen çalışmamızın önışlem aşamasında, otomatik odaklama ile elde edilen 2B çoklu odaklı imgelerin sayısının, referans görüntünün indislerinin ve imge dizisindeki odaklama değerlerinin standart sapmasının görüntülen bölgeye göre değiştiğini kanıtlamak amaçlanmaktadır. Bu nedenle, numunenin farklı bölgelerinden alınan toplam 2 test dizisi oluşturulmuş ve otomatik odaklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sürecinde imgelerin odaklama bilgilerini elde etmek için Varyans fonksiyonu kullanılmıştır. Otomatik odaklama rastgele noktadan başlanarak gerçekleştirilmiştir. Referans nokta



Şekil 5: 1. Test dizisinin tüm imgeleri (a), (σ) aralığındaki imgeleri (b), (2σ) aralığındaki imgeleri (c) ve (3σ) aralığındaki imgeleri (d) kullanılarak elde edilmiş 3B imgeler

Test Dizileri	tüm imgeler		aralık (σ)		aralık (2σ)		aralık (3σ)	
	KM	BM	KM	BM	KM	BM	KM	BM
1.	3.3435	0.2311	2.7132	0.2532	3.0132	0.2436	3.1293	0.2375
2.	2.8101	0.2956	2.5403	0.3256	2.6413	0.3111	2.7215	0.3001

Tablo III: Test Dizileri için Kalite Metriklerinin Sonuçları

belirlendikten sonra başlangıç noktası (x_i) Denklem (1) kullanılarak hesaplanmıştır. Denklem (1)'deki optimum eşikleme değeri 0.01 olarak belirlenmiştir. Test dizileri için elde edilmiş 2B çoklu odaklı imgelerin sayısı (IS), referans görüntü indisi (RGI) ve standart sapma (SS) sonuçları Tablo I'de verilmiştir. Hesaplanan sonuçlara göre numune üzerinde görüntülenen bölgenin taranan aralığı ve 2B çoklu odaklı imge sayısını etkilediği ispatlanmıştır. Önerilen önışlem aşamasının ikinci adımında test dizilerin odaklama değerlerine Gauss dağılımı uygulanmış ve farklı aralıklar ($\sigma - 2\sigma - 3\sigma$) belirlenmiştir. Test dizileri için farklı başlangıç ve bitiş noktalarına sahip aralıklar Tablo II'de gösterilmiştir.

Önışlem aşamasından sonra belirlenen tüm aralıklar için Odaktan Şekil yaklaşımı kullanılarak 2B ve 3B imgeler üretilmiştir. Piksellerin odaklama bilgilerini hesaplamak için Tenengrad operatörü kullanılmıştır. Mikroskopik sistemlerde referans olarak kabul edilebilecek 2B ve 3B imge bulunmamaktadır. Bunun için Odaktan Şekil yaklaşımında optimum aralığı belirlemek için referans imge gerektirmeyen kalite metriklerinden olan Kurtosis [5] ve Blur metrik [5] kullanılmıştır. Optimum aralık için Kurtosis metriği sonucunun düşük, Blur metriği sonucunun yüksek olması beklenmektedir. 1. Test dizisinin tümü, (σ), (2σ) ve (3σ) aralıklarındaki imgeleri kullanılarak elde edilmiş 3B görsel sonuçlar Şekil 5'te gösterilmiştir. Görsel sonuçlarda görüldüğü gibi (σ) aralığındaki 2B çoklu odaklı imgeler ile oluşturulan 3B imge diğerlerinden daha düşük aykırılık durumu ve bulanıklığa sahiptir.

Test dizileri için kalite metriklerinin sonuçları Tablo III'de gösterilmiştir. Optimum aralığın belirlenmesi için toplam 4 adet 2B imge sahip oldukları varyasyonlara (KM) ve bulanıklıklara (BM) göre karşılaştırılmıştır. Kalite metrikleri sonuçlarına göre varyasyon ve bulanıklık miktarı numunenin görüntülenen alanına göre değişmektedir. Aralık (σ)'daki 2B çoklu odaklı imgeler kullanılarak elde edilmiş 2B imgeler daha az varyasyon ve bulanıklığa sahiptir.

IV. DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada, ışıklı mikroskopik sistemlerde sitopatolojik analiz için optimum odaklı 2B ve 3B imgeler üreten yeni bir yaklaşım geliştirmiştir. 2B çoklu odaklı imgeleri elde etmek için Z ekseninde sabit aralık tarayan literatür çalışmalarının aksine, çalışmamızda Z ekseninde optimum aralık seçilmektedir. Optimum aralığı belirlemek için elde edilen 2B görüntüler sahip oldukları varyasyon (KM) ve bulanıklıklarına (BM) göre karşılaştırılmıştır. Kalite metriklerinin sonuçlarına göre, varyasyon ve bulanıklığın görüntülenen alana göre değiştiği görülmektedir. (σ) aralığındaki 2B çoklu odaklı imgelerin kullanılarak elde edildiği 2B ve 3B imgelerde daha az varyasyon ve bulanıklığın olduğu görülmüş ve Odaktan Şekil yaklaşımları için optimum aralık (σ) olarak belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 117E961 nolu TÜBİTAK projesinin desteği altında KTÜ Bilgisayarlar Görü ve Örüntü Tanıma Laboratuvarınca yürütülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] E. Schneider, A. A. Bell, D. Meyer-Ebrecht, A. Böcking, T. Aach, "Computer-aided cytological cancer diagnosis: cell type classification as a step towards fully automatic cancer diagnostics on cytopathological specimens of serous effusions," Medical Imaging 2007: Computer-Aided Diagnosis, Vol. 6514, International Society for Optics and Photonics, 2007, p.450 65140G.
- [2] S. Pertuz, D. Puig, M. A. Garcia, "Analysis of focus measure operators for shape-from-focus," Pattern Recognition 46 (5), 2013, pp. 1415-1432.
- [3] S. K. Nayar, "Shape from focus system," Proceedings 1992 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 1992, pp. 302-308.
- [4] X. Xia, Y. Yao, J. Liang, S. Fang, Z. Yang, D. Cui, "Evaluation of focus measures for the autofocus of line scan cameras," Optik - International Journal for Light and Electron Optics, 127 (19), 2016, pp. 7762-7775.
- [5] S. Li, Z. Yang, H. Li, "Statistical evaluation of no-reference image quality assessment metrics for remote sensing images," ISPRS International Journal of Geo-Information, 6 (5).