



Sitopatoloji görüntülerinde boya bağımsız çekirdek segmentasyonu: Plevral efüzyonda bir olgu çalışması

Stain independent nuclei segmentation of cytopathology images: A case study in pleural effusion

Elif Baykal Kablan¹, Hulya Dogan¹, Murat Ekinci¹, Mustafa Emre Ercin², Safak Ersoz²

¹Department of Computer Engineering, ²Faculty of Medicine, Department of Pathology

Karadeniz Technical University

Trabzon, Turkey

{ebaykal, hulya, ekinci, drmustafaemreercin, sersoz}@ktu.edu.tr

Özetçe —Dijital patoloji (DP), kanser teşhisi için sitopatoloji görüntülerine görüntü analiz tekniklerinin uygulanmasını mümkün kılan bir teknolojidir. Renk değişimi, farklı boya üreticilerinin değişken kimyasal renklendirilmesi ve boyama prosedüründeki tutarsızlıklar dahil olmak üzere bir dizi faktörün bir sonucu olarak sitopatolojide yaygın bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada, artık öğrenme yaklaşımı kullanılarak yeni bir boya normalizasyonu yaklaşımı önerilmiştir. Önerilen yöntemin performansı, plevral efüzyon (PE) sitopatoloji görüntülerinde çekirdek segmentasyonu probleminde uygulanarak ölçülmüştür. Önerilen yöntem, görüntülerdeki renk değişimlerine karşı hassas olan görüntü analizi tekniklerinin etkinliğini önemli ölçüde artırmıştır.

Anahtar Kelimeler—dijital patoloji, boya normalizasyonu, artık öğrenme, çekirdek segmentasyonu, plevral efüzyon.

Abstract—Digital pathology (DP) is a technology that makes it possible to apply image analysis techniques to cytopathology images for cancer diagnosis. Color variation is a common problem in cytopathology as a result of a number of factors, including variable chemical coloring of different stain manufacturers, and inconsistencies in the staining procedure. In this study, a new stain normalization method is proposed using the residual learning approach. The performance of the proposed method was measured by applying the problem of nuclei segmentation in pleural effusion (PE) cytopathology images. The proposed method has significantly improved the performance of image analysis techniques that are sensitive to color variations.

Keywords—digital pathology, stain normalization, residual learning, nuclei segmentation, pleural effusion.

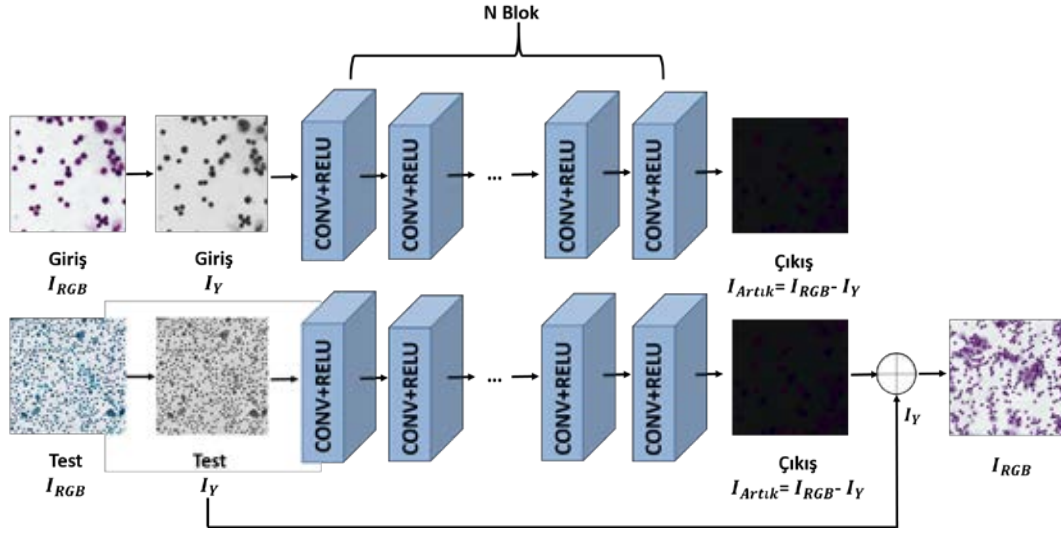
I. GİRİŞ

Dijital patoloji (DP), araştırmacılar ve patologlar arasında mikroskopik tüm slayt görüntülerinin (Whole Slide Images-WSI) elektronik ortama aktarılmasını mümkün kılan bir teknolojidir [1]. DP'nin en önemli avantajı, çekirdek / hücre algılama, sayımı, segmentasyonu ve sınıflandırma amacıyla dijital slaytlara görüntü analiz tekniklerinin uygulanmasını

mümkün kılmasıdır [2]. Sitopatoloji, mikroskop altında slaytların hücresel düzeyde uzman bir patolog tarafından incelenmesidir ve sıklıkla bir tarama aracı olarak kullanılmaktadır. Kanser tanısı için yapılan mikroskopik inceleme, elle yapılan bir boyama prosedürünü içermektedir. Papanicolaou (PAP) ve Giemsa, sitopatolojide hücresel düzeyde değerlendirme için en yaygın kullanılan boyama prosedürleridir. Bununla birlikte, bu boyama prosedürleri pahalı olmalarının yanı sıra, çok adımlı ve zaman alıcıdır.

Renk değişimi, farklı boya üreticilerinin değişken kimyasal renklendirmesi, manuel boyama prosedüründeki tutarsızlıklar da dahil olmak üzere bir dizi faktörün bir sonucu olarak dijital sitopatolojide sık görülen bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Patologlar bu zorlukların üstesinden gelme kabiliyetine sahiptir ve çoğu zaman tanısal karar vermede zorluk çekmezler. Öte yandan, bilgisayar destekli tanı (Computer Aided Diagnosis-CAD) sistemleri, özellikle de çekirdek segmentasyonu için danışmanlık öğrenme / sınıflandırma yöntemleri görüntülerin renk ve yoğunluklarındaki değişimlerden önemli derecede etkilenmektedir [3]. Örneğin, yöntem çekirdek algılama amacıyla tek bir boya üzerinde eğitilmişse, boyadaki küçük bir değişim bile çok sayıda hataya yol açmaktadır. Hücre görünümündeki bu farklılıklar, son zamanlardaki çalışmaların görüntü analiz yöntemlerinin performansını artırmak için boya normalizasyonu yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanmasına yol açmıştır [3], [4].

Literatürde mevcut boya normalizasyonu yöntemleri iki kategoriye ayrılmaktadır: boya spesifik renk dekonvolüsyonu ve şablon renk eşleştirme. Renk dekonvolüsyonu, her boyayı bağımsız olarak ayırma ve normalizasyonu fikrine dayanmaktadır. Normalizasyon uygulanmış renk kanalları daha sonra orijinal renkli görüntüyü yeniden oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu nedenle, tüm slayt görüntülerinde bulunan her boya için referans boya vektörünün önceden bilinmesini gerektirmektedir. Ruifrok ve ark. [5] bu ön bilgiyi, renk dekonvolüsyon vektörlerini tahmin etmek için temsili örnek vektörlerini manuel olarak seçerek tanıtmıştır. Bu yarı otomatik işlem, büyük veri kümelerine uygulanmayı zorlaştırmıştır. Ayrıca yöntemin renk matrisinin güvenilir ve kesin



Şekil 1: Önerilen boya normalizasyon yönteminin genel mimarisini. Mavi kutular her bir artık bloğu temsil etmektedir. Her bir artık blok 1 adet konvolüsyon (CONV) ve 1 adet doğrultulmuş lineer birim (ReLU) katmanından oluşmaktadır.

bir şekilde belirlenebildiği zaman iyi çalıştığı gösterilmiştir. Öte yandan, bu yöntemlerin yarı otomatik olması nedeniyle, boyaların otomatik çıkarılması için daha sonra birçok yöntem önerilmiştir [6], [7]. Bu yöntemler daha iyi boya tahmini elde etmelerine rağmen, görüntü renk bilgisi ile sınırlıdır [8]. Bu özellik, WSI'da ciddi boyama varyasyonları meydana geldiğinde, boya dekonvolüsyonu yaklaşımlarında eksikliklere neden olmaktadır.

Şablon renk eşleştirme amacıyla önerilen yaklaşımlar, bir kaynak görüntünün ortalamasını ve standart sapmasını bir şablon görüntüyle hizalamaya dayanmaktadır. Reinhard ve ark. [9] Lab renk uzayının her kanalına tekdüze dağılım sağlamak için bir dizi lineer dönüşüm kullanmışlardır. Bununla birlikte, her kanal için tek bir dönüşüm fonksiyonunun kullanımı pratikte nadiren yeterli olmaktadır ve standardizasyon sürecinde boya bileşenlerinin yanlış renk eşlemesine yol açmaktadır. Bu sorun farklı dönüşüm sınıflarına [7], [8] veya farklı doku sınıflarına [10] ayrı ayrı dönüştürülerek çözülmüştür. [10]'da önerilen yaklaşımın uygulanabilirliği, mutlaka tüm olası doku sınıflarını içeren görüntü bloklarıyla sınırlı olmuştur. [8]'de önerilen algoritmanın performansı da görüntüdeki farklı boya sınıflarının miktarında önemli bir dengesizlik olduğunda düşmektedir. Bunun temel nedeni, kullanılan boya sınıflandırma yaklaşımının doğruluğunun farklı boya bileşenlerinin miktarı arasındaki dengesizlik arttıkça azalmasıdır.

Son yıllarda, CAD sistemlerin dijital patolojideki performansı, özellikle derin öğrenme yöntemleri ile önemli ölçüde iyileştirilmiştir. Her ne kadar bu gibi karmaşık modeller numunelerdeki renk varyasyonlarının varlığında karmaşık segmentasyon veya sınıflandırma görevlerini öğrenebilse de, son zamanlarda yapılan çalışmalar boya normalizasyonu ile performans artışı sağlanacağını göstermiştir. Bu çalışmada, artık öğrenme kullanılarak boya normalizasyonu için yeni bir yöntem önerilmiştir. Önerilen yöntemin performansı, çoklu boya bulunan plevral efüzyon (PE) sitopatolojik

görüntülerinde çekirdek segmentasyonu problemini ele alarak ölçülmüştür. Çalışmada çekirdek segmentasyonu amacıyla tamamen konvolüsyonel ağ (Fully Convolutional Network-FCN) mimarisi [11] kullanılmıştır.

II. ÖNERİLEN YÖNTEM

A. Artık Öğrenme

Artık birimleri olan derin artık ağlar, ImageNet [12], [13] ve MS COCO [14] yarışmaları gibi çeşitli büyük ölçekli görüntü tanıma problemlerinde yüksek doğruluk göstermiştir. Artık birimler sinyallerin doğrudan bir bloktan diğer bloklara yayılmasına izin verebilmektedir. Genel olarak, artık birim aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$x_{l+1} = x_l + F(x_l, W_l) \quad (1)$$

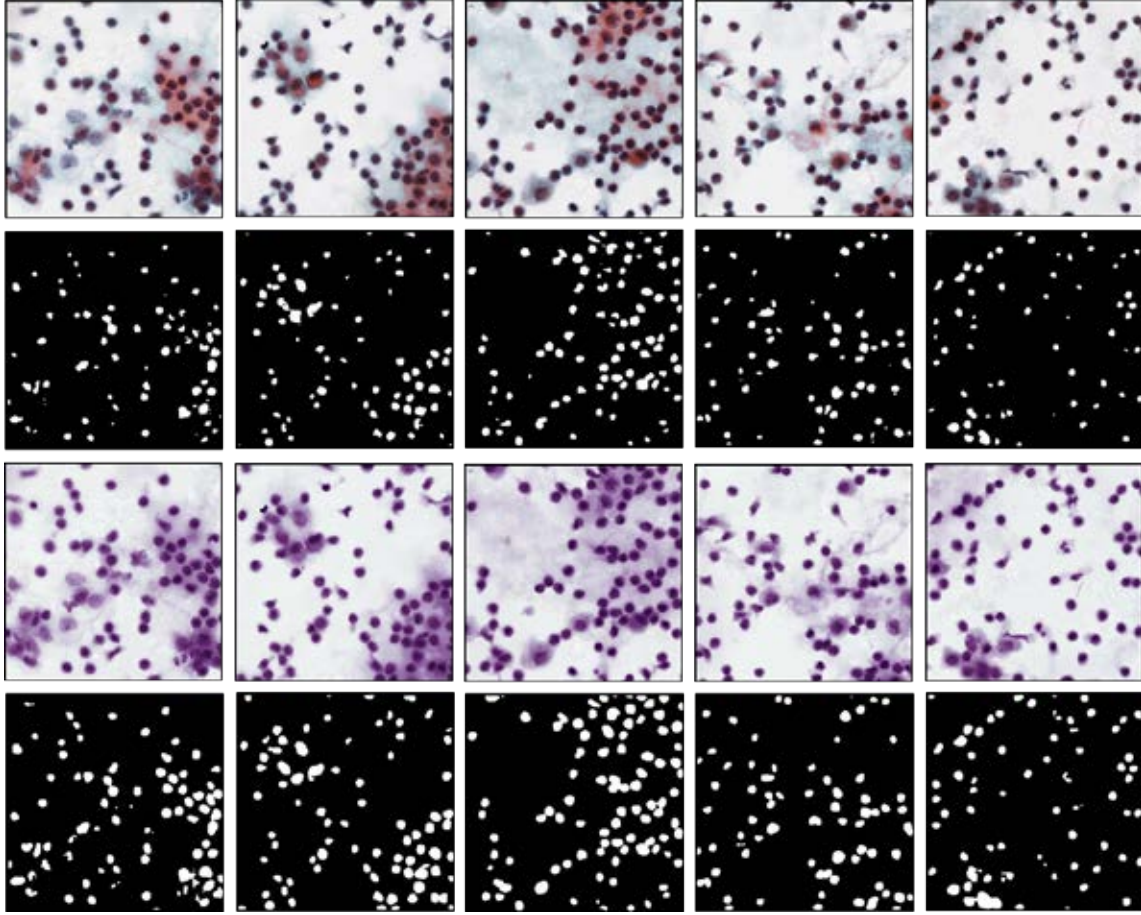
F artık fonksiyonu gösterir; x_l , l . artık birimine giriş özelliğidir ve W_l , bu artık birime karşılık gelen ağırlık matrisidir. Derin artık öğrenmenin ana fikri, giriş x_l özelliğine göre F artık fonksiyonunu öğrenmektir. Dolayısıyla yukarıdaki denklemi rekürsif olarak açarsak $x_L (L > l \geq 1)$ aşağıdaki gibi elde edilebilir.

$$x_L = x_l + \sum_{i=1}^{L-1} F(x_i, W_i) \quad (2)$$

Bu nedenle, daha derin katmanların özelliği x_L , l biriminin x_l özelliğinin diğer artık fonksiyonlarının özeti $\sum_{i=1}^{L-1} F(x_i, W_i)$ ile toplamı olarak gösterilebilir.

B. Artık Öğrenme ile Boya Normalizasyonu

Bu çalışmada, boya normalizasyonu için, artık öğrenme paradigmasından ilham alan yeni bir evrişimli sinir ağı (CNN) mimarisi önerilmiştir. Önerilen boya normalizasyon yöntemi Şekil 1'te verilmiştir. Önerilen yöntem, giriş görüntüsü ile artık (boya) görüntüsü arasındaki bağıntıyı öğrenmektedir.



Şekil 2: FCN ile elde edilen boya normalizasyonu sonuçları. Yukarıdan aşağıya doğru: boyanmış görüntü, boya normalizasyonu uygulanmadan çekirdek segmentasyon sonucu, önerilen yöntem ile boya normalize edilmiş bir görüntü ve boya normalizasyonu uygulandıktan sonra çekirdek segmentasyon sonucu.

Diğer yöntemlerin aksine, RGB renk uzayı yerine YCbCr renk uzayının yalnızca Y (parlaklık) kanalında çalışmaktadır. Ağın girişi tek bir renk kanalına sahip olduğundan, önerilen yöntem eğitim süresi açısından daha hızlıdır.

Giriş RGB görüntüsü öncelikle YCbCr renk uzayına dönüştürülür. Önerilen ağ, artık görüntüyü renkli görüntünün yalnızca Y kanalından tespit edecektir. Bir görüntünün parlaklık kanalı I_Y , her pikselin parlaklığını kırmızı, yeşil ve mavi piksel değerlerinin doğrusal bir birleşimi yoluyla gösterir. Ağın girişi I_Y 'dir ve ağ eğitimden $I_{Residual} = I_{RGB} - I_Y$ 'yi tahmin etmeyi öğrenir. Bu durumda, ağ aslında kaynak görüntünün kullanıcı tarafından belirlenen boya ile nasıl boyanacağını öğrenmektedir. Ağ artık görüntüyü tahmin etmeyi öğrendikten sonra, tahmin edilen artık görüntüye $I_{RGB} - I_Y$, I_Y eklenerek boyanmış kaynak görüntü yeniden oluşturabilir. Bu sayede, yeniden oluşturulan görüntünün tekrar RGB renk uzayına dönüştürülmesine gerek yoktur.

III. YAPILAN ÇALIŞMALAR VE DENEYSEL SONUÇLAR

Önerilen sistem Ubuntu 16.04 64 bit sistemde CPU @ 2.3 GHz, 8GB RAM ve NVIDIA GeForce GTX 1050Ti GPU'lu bir bilgisayarda eğitilmiş ve test edilmiştir.

A. Plevral Efüzyon Veriseti

Plevral efüzyon, aşırı sıvı üretimi veya azalmış emilimden kaynaklanan plevral boşlukta gerçekleşen bir tür seröz efüzyondur. ABD'de yılda yaklaşık 1.5 milyon kişiye plevral efüzyon teşhisi konulduğu bildirilmiştir. Vakaların %90'ından fazlası kalp yetmezliği, tüberküloz, siroz, zatürree veya pulmoner emboli gibi farklı hastalıklardan kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada önerilen yeni veri seti Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde toplanan PE sitopatoloji örneklerinden oluşmaktadır. Veri kümesi Aperio ScanScope kullanılarak 40x büyütme ile taranmış dört hastadan alınan 120 sitoloji görüntüsünden (512 x 512 piksel) oluşmaktadır. Bunlardan 80 görüntü Giemse ile boyanmıştır. 40 görüntü Papanicolaou (PAP) ile boyanmıştır. Eğitim seti olarak 80 Giemse ile boyanmış görüntü kullanılmıştır. Tüm görüntüler uzman bir patolog tarafından manuel olarak işaretlenmiştir. Ayrıca, 5-kat çapraz doğrulama gerçekleştirilmiştir.

B. Performans Ölçütleri

Çekirdek segmentasyonunun boya normalizasyonu uygulanmadan önceki ve sonraki performansı dört ölçütle belir-

Tablo I: Önerilen boya normalizasyon yönteminden önce ve sonra FCN yönteminin plevral efüzyon sitoloji veriseti üzerinde segmentasyon performansı (%).

Yöntem	Jaccard	Doğruluk	Hassasiyet	Özgüllük
FCN	60.29	95.64	63.52	99.38
Önerilen Yöntem	74.94	96.84	90.70	97.55

lenmiştir; doğruluk, hassasiyet, özgüllük, Jaccard indeksi. Bu ölçütlerin tümü aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{dogruluk} = \frac{TP + TN}{TP + FN + TN + FP} \quad (3)$$

$$\text{hassasiyet} = \frac{TP}{TP + FN} \quad (4)$$

$$\text{ozgulluk} = \frac{TN}{TN + FP} \quad (5)$$

$$\text{Jaccard} = \frac{TP}{TP + FN + FP} \quad (6)$$

TP, TN, FP ve FN sırasıyla, sırasıyla doğru pozitif, doğru negatif, yanlış pozitif ve yanlış negatiftir. Çekirdek pikseli doğru bir şekilde bölütlenmişse, TP, aksi halde FN olarak kabul edilmiştir. Diğer taraftan, çekirdek olmayan (arka plan) piksel, arka plan olarak doğru bir şekilde sınıflandırılmışsa TN, aksi halde FP olarak kabul edilmiştir.

C. Sonuçlar

Veriseti içerisinde hem PAP hem de Giemse ile aynı numunenin boyanmış görüntüleri mevcut olduğundan, karşılaştırma yapılamamıştır. Bu nedenle, performans analizi, önerilen yöntemin, görüntü analizi algoritmalarının başarısı üzerindeki etkisiyle belirlenmiştir. Bu çalışmada, boya normalizasyonunun, hücre sınıflandırmasının nihai adımı için kritik olan çekirdek segmentasyonundaki performansını karşılaştırılmıştır. Elde edilen boya normalizasyon sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, özellikle önerilen boya normalizasyon yöntemi uygulanmadığında FCN'nin segmentasyon başarısı zayıftır. Ancak, önerilen yöntem uygulandığında, segmentasyon sonuçları kesin referansa çok yakındır. Tablo 1'de ayrıca, ön işlem adımı olarak önerilen boya normalizasyon yöntemi uygulanmadan önce ve sonra FCN yönteminin segmentasyon performansı verilmiştir. Segmentasyon performansı, doğruluk, hassasiyet, özgüllük, ve Jaccard indeksi ölçütleri kullanılarak ölçülmüştür. Önerilen yöntemin segmentasyon performansını önemli ölçüde artırdığı görülmüştür.

IV. DEĞERLENDİRME

Boya çeşitliliği sitopatolojide önemli bir sorundur. Uzman patoloğun renk değişimleriyle başa çıkması kolaydır, ancak sitopatolojik görüntülerin otomatik analizinde oluşabilecek tüm renk değişimleriyle doğru şekilde çalışabilecek bir yöntem önermek zordur. Bu bildiride, artık öğrenme paradigması boya normalizasyonu amacıyla önerilmiştir. Önerilen yöntem

plevral efüzyon sitopatolojik görüntülerinde çekirdek segmentasyonu başarısını önemli ölçüde artırmıştır. Gelecekteki çalışmalarda, boya renk sayısı artırılacak ve veriseti genişletilerek nicel sonuçlar güçlendirilecektir. Ayrıca, önerilen yöntemin farklı mimarilerinin (derinlik, aktivasyon fonksiyonu vb.) etkisi araştırılacaktır.

TEŞEKKÜR

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

KAYNAKÇA

- [1] Hamilton, P. W., Bankhead, P., Wang, Y., Hutchinson, R., Kieran, D., McArt, D. G., ... & Salto-Tellez, M. (2014). Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods*, 70(1), 59-73.
- [2] Soenksen, D. (2007). Digital pathology: looking beyond the glass. *Laboratory Medicine*, 38(6), 341-344.
- [3] Monaco, J., Hipp, J., Lucas, D., Smith, S., Balis, U., & Madabhushi, A. (2012, October). Image segmentation with implicit color standardization using spatially constrained expectation maximization: Detection of nuclei. In *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* (pp. 365-372). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [4] Khan, A. M., Rajpoot, N., Treanor, D., & Magee, D. (2014). A non-linear mapping approach to stain normalization in digital histopathology images using image-specific color deconvolution. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 61(6), 1729-1738.
- [5] Ruifrok, A. C., & Johnston, D. A. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Analytical and quantitative cytology and histology*, 23(4), 291-299.
- [6] Macenko, M., Niethammer, M., Marron, J. S., Borland, D., Woosley, J. T., Guan, X., ... & Thomas, N. E. (2009, June). A method for normalizing histology slides for quantitative analysis. In *2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro* (pp. 1107-1110). IEEE.
- [7] Magee, D., Treanor, D., Crellin, D., Shires, M., Smith, K., Mohee, K., & Quirke, P. (2009). Colour normalisation in digital histopathology images. In *Proc Optical Tissue Image Analysis in Microscopy, Histopathology and Endoscopy (MICCAI Workshop)* (Vol. 100). Daniel Elson.
- [8] Bejnordi, B. E., Litjens, G., Timofeeva, N., Otte-Höller, I., Homeyer, A., Karssemeijer, N., & van der Laak, J. A. (2015). Stain specific standardization of whole-slide histopathological images. *IEEE transactions on medical imaging*, 35(2), 404-415.
- [9] Reinhard, E., Adhikhmin, M., Gooch, B., & Shirley, P. (2001). Color transfer between images. *IEEE Computer graphics and applications*, 21(5), 34-41.
- [10] Basavanthally, A., & Madabhushi, A. (2013, March). EM-based segmentation-driven color standardization of digitized histopathology. In *Medical Imaging 2013: Digital Pathology* (Vol. 8676, p. 86760G). International Society for Optics and Photonics.
- [11] Long, J., Shelhamer, E., & Darrell, T. (2015). Fully convolutional networks for semantic segmentation. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition* (pp. 3431-3440).
- [12] He, K., Zhang, X., Ren, S., & Sun, J. (2016). Deep residual learning for image recognition. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition* (pp. 770-778).
- [13] He, K., Zhang, X., Ren, S., & Sun, J. (2016, October). Identity mappings in deep residual networks. In *European conference on computer vision* (pp. 630-645). Springer, Cham.
- [14] Dai, J., He, K., & Sun, J. (2016). Instance-aware semantic segmentation via multi-task network cascades. In *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* (pp. 3150-3158).