

# Faz Kontrast Optik Mikroskopi Zaman Serisi Görüntülerinde Hücrelerin Otomatik Bölütlenmesi

## Automated Segmentation of Cells in Phase Contrast Optical Microscopy Time Series Images

Rıfki Can Binici ve Umut Şahin

Yazılım Mühendisliği

İzmir Ekonomi Üniversitesi

İzmir, Türkiye

canbinici.55@gmail.com, umut.sahin.se@gmail.com

Aydin Ayanzadeh ve Behçet Uğur Töreyn

Bilişim Enstitüsü

İstanbul Teknik Üniversitesi

İstanbul, Türkiye

ayanzadeh17@itu.edu.tr, toreyin@itu.edu.tr

Sevgi Önal

Biyoteknoloji

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

İzmir, Türkiye

sevgional1@gmail.com

Devrim Pesen Okvur ve Özden Yalçın Özuysal

Moleküler Biyoloji ve Genetik

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

İzmir, Türkiye

devrimpesen@iyte.edu.tr, ozdenyalcin@iyte.edu.tr

Devrim Ünay

Biyomedikal Mühendisliği

İzmir Ekonomi Üniversitesi

İzmir, Türkiye

unaydevrim@gmail.com

**Özetçe** —Faz kontrast optik mikroskopi hücrelerin canlı ortamlarında zamana bağlı incelenmesi için tercih edilen görüntüleme yöntemidir. Bu yöntem ile elde edilen zaman serisi görüntülerinde hücrelerin bölütlenmesi işi hücre biyolojisi araştırmacılarının çözümüne ihtiyaç duyduğu emek yoğun ve zaman alan bir işidir. Bu çalışmada faz kontrast optik mikroskopi zaman serilerinde hücrelerin otomatik bölütlenmesi için geleneksel görüntü işleme ve derin öğrenme temelli yöntemler önerilmiş ve başarımları elle işaretlenmiş veri kümelerinde nicel olarak ölçülmüştür.

**Anahtar Kelimeler**—faz kontrast optik mikroskopi, zaman serisi, hücre bölütleme, derin öğrenme, SegNet.

**Abstract**—Phase contrast optical microscopy is a preferred imaging technique for live-cell, temporal analysis. Segmentation of cells from time series data acquired with this technique is a labor-intensive and time-consuming task that cell biology researchers need solution for. In this study traditional image processing and deep learning based approaches for automated cell segmentation from phase contrast optical microscopy time series are presented, and their performances are evaluated against manually annotated datasets.

**Keywords**—phase contrast optical microscopy, time series, cell segmentation, deep learning, SegNet.

## I. GİRİŞ

Son yıllarda gelişmiş mikroskop sistemlerinin yaygınlaşmasıyla canlı hücrelerin belirli zaman aralıklarıyla belirli bir süre boyunca mikroskop altında görüntülediği çok sayıda görüntü dizisi oluşturulmaya başlanmıştır. Bu görüntü dizilerinden, hücre morfolojisine, polaritesine ve hareketine dair önemli bilgiler elde edilmekte ve bu bilgiler embriyonik

gelişim, yara kapanması, kanser hücrelerinin metastatik özellikleri gibi bilimsel sorulara cevap olabilmektedir.

Canlı hücrelerin zamana bağlı görüntülenmesinde floresan ve faz kontrast mikroskopi yöntemleri rutin olarak kullanılmaktadır. Floresan işaretli sinyalin zamanla kendiliğinden ya da florışıldama bozulmasına (photobleaching) bağlı olarak azalması, veri elde edilebilen deney süresinin kısa olması ve normal ışık mikroskobunun floresan mikroskobuna göre daha ucuz ve erişilebilir olması nedenleriyle, faz kontrast optik mikroskopi avantajlıdır.

Faz kontrast optik mikroskopi zaman serisi görüntülerinde hücrelerde oluşan morfolojik değişimlerin tespiti (örn. video boyunca hücre sınırları işaretlenerek hacim değişimlerin belirlenmesi) hücre biyolojisi araştırmacılarının ihtiyaç duyduğu ancak emek yoğun ve zaman alan bir işlemdir. Görüntü işleme yöntemlerinden faydalanılarak bu işlem kolaylaştırılabilir ve hızlandırılabilir. Literatürdeki çalışmalar görüntü işleme yöntemleri kullanılarak faz kontrast optik mikroskopi zaman serilerinde hücrelerin tespiti [1], sayılması [2], bölütlenmesi [3], sınıflanması [4] ve takibi [5] gibi farklı problemlere odaklanmıştır.

Biz bu çalışmada faz kontrast optik mikroskopi zaman serilerinde hücrelerin otomatik bölütlenmesi problemine odaklanmaktayız. Bu konuda literatürde yapılan çalışmaları histogram [6], sınır/bölge (edge/region) [7], morfoloji [8], aktif çevrit (active contour) [8], [9], çizge ayırma (graph partitioning) [10], [11], sınıflandırma [12] ve seyrek matris ayrıştırma (sparse matrix decomposition) [3] temelli olanlar şeklinde gruplayabiliriz.

Literatürden farklı olarak çalışmamızda geleneksel görüntü işleme ve derin öğrenme temelli olmak üzere iki farklı bölütleme yöntemi önerilmiş ve bu yöntemlerin hücre

bölütlemesi başarımları iki farklı faz kontrast optik mikroskopi zaman serisinde ölçülmüştür.

## II. KULLANILAN YÖNTEMLER

Bu bölümde çalışmada kullanılan veri kümeleri, geliştirilen bölütleme yöntemleri ve bölütleme başarımının nasıl ölçüldüğü anlatılmaktadır.

### A. Faz Kontrast Mikroskopi Veri Kümeleri

Bu çalışmada her ikisi de uzman tarafından elle işaretlenmiş iki farklı faz kontrast optik mikroskopi zaman serisi kullanılmıştır (Şekil 1). Birinci veri seti 2013'ten itibaren her sene düzenlenen Cell Tracking Challenge (<http://celltrackingchallenge.net/>) yarışmasına ait polakrilamit substratı üzerinde glioblastoma-astrocytoma U373 hücrelerinin iki boyutlu zaman serisi görüntüleridir. Nikon mikroskop ve Plan Fluor DLL 20x/0.5 objektifi kullanılarak 15 dakikada bir  $696 \times 520$  piksel ( $0.65\mu m \times 0.65\mu m$ ) boyutlu görüntüler elde edilmiştir. Verinin ardışık olmayan toplam 34 zaman noktasına ait uzman elle işaretlemeleri de orijinal görüntüler ile birlikte paylaşılmıştır.

İkinci veri kümesi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden sağlanmıştır. Mezenkimal morfolojiye sahip invaziv meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231 hücre hattı) Olympus IX71 mikroskop ile ısıtıcı tabla üzerinde  $37^\circ C$ 'de 40X büyütme ile 15 dakikada bir görüntülenmiş ve  $2568 \times 1912$  piksel ( $0.117\mu m \times 0.117\mu m$ ) boyutlu görüntüler elde edilmiştir. Verinin ardışık olmayan 14 zaman noktasına ait görüntüsünde uzman elle işaretleme yapılmıştır.

### B. Geleneksel Görüntü İşleme ile Bölütleme

Bu çalışmada hücrelerin mikroskopi resimlerinden bölütlenmesi için kenar bulma ve morfolojik işlem temelli bir geleneksel görüntü işleme yaklaşımı geliştirilmiştir. Öncelikle resimlere Canny kenar bulma yöntemi uygulandıktan sonra ayrık ve küçük kenarlar eşikleme ile yok edilir. Daha sonra Bresenham çizgi algoritması [13] kullanılarak birbirine yakın kenarlar birleştirilir ve kısa/küçük kenarlar yok edilir. Son olarak dışbükey örtü (convex hull) yaklaşımıyla kenar bölgeleri doldurulur ve bölütleme sonucu elde edilir.

### C. Derin Öğrenme ile Bölütleme

Bu çalışmada geleneksel görüntü işleme ile bölütlemenin yanısıra literatürde farklı bölütleme problemlerinde başarılı sonuçlar veren kodlayıcı-çözücü tabanlı SegNet [14] derin öğrenme mimarisinden faydalanılmıştır. Kodlayıcı kısmında evrişim (convolutional), yığın normalizasyonu (batch normalization), aktivasyon (ReLU) ve havuzlama (pooling) katmanlarından oluşan vgg16 ağı kullanılır ve resime boyut azaltma uygulanır, çözücü kısmında ise kodlayıcı kısmındakilere benzer katmanlar kullanılarak resmin boyutu tekrar artırılır. Çalışmada sırasıyla evrişim, havuzlama, evrişim, yukarı örnekleme, evrişim ve softmax katmanlarından oluşan SegNet mimarisinin uyarlanmış halinden faydalanılmıştır.  $696 \times 520$  boyutlu girdi görüntüsü, evrişim katmanlarında  $3 \times 3$  boyutlu 64 süzgeç, *stochastic gradient descent with momentum* eniyileştirici (optimizer), 0.001 başlangıç öğrenme hızı ve 40 maksimum devir (epoch) sayısı kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan veri kümelerinde farklı sayıda ve derin öğrenme için yetersiz görüntü bulunmaktadır. Bu durumu aşmak için veri kümelerine yansıtma, döndürme, ölçekleme ve kaydırma işlemlerinden oluşan veri çoğaltma uygulanmış ve 48 görüntüden yaklaşık 3600 yeni görüntü elde edilmiştir.

SegNet ile 5-kat çapraz doğrulama uygulanarak elde edilen bölütleme sonuçlarının iyileştirilmesi amacıyla disk şeklindeki yapısal eleman kullanılarak açma (opening) ve aşındırma (erosion) morfolojik işlemleri uygulanmıştır.

### D. Bölütleme Başarımının Ölçülmesi

Geliştirdiğimiz bölütleme yöntemlerinin başarımını ölçmek için Dice benzerlik katsayısı kullanılmıştır [15].  $X$  ve  $Y$  sırasıyla, uzmanın el ile yaptığı ve bir yöntem tarafından elde edilen ikili bölütleme sonuçları olsun. Dice katsayısı

$$Dice(X, Y) = \frac{2|X \cap Y|}{|X| + |Y|} \quad (1)$$

olarak hesaplanır,  $[0, 1]$  aralığında değer alır ve iki sonucun benzerliği arttıkça katsayı 1'e yaklaşır.

Bu çalışmadaki derin öğrenme deneyleri Matlab 2019a (i7 3.6GHz işlemci ve 32GB RAM'e sahip platformda) sürümünde, diğer deneyler ise Python 3.6.3 (i7 2.0GHz işlemci ve 8GB RAM'e sahip platformda) sürümünde gerçekleştirilmiştir.

## III. DENEYSEL SONUÇLAR

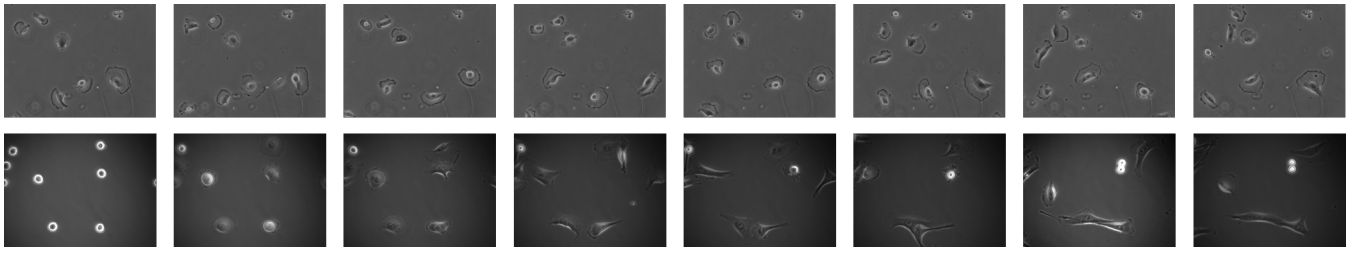
Geliştirdiğimiz yöntemlerin hücre bölütleme başarımlarını iki farklı veri kümesine ait faz kontrast mikroskopi resimlerinde nicel ve nitel olarak değerlendirdik. Tablo I'de sunulan nicel sonuçlara göre geleneksel yöntem CTC Yarışma verisinde düşük başarımlar gösterirken İYTE verisinde en iyi başarımları sağlamıştır. Derin öğrenme yöntemi ise her iki veri kümesinde de benzer ve yüksek başarımlara ulaşmıştır. Ayrıca derin öğrenme ile elde edilen bölütleme sonuçlarının standart sapma değerlerinin geleneksel yöntem değerlerine göre daha düşük olduğu görülmektedir, ki bu da derin öğrenme yönteminin daha gürbüz olduğunu düşündürmektedir.

Şekil 2'deki görsel sonuçlara bakılacak olursa geleneksel yöntemin bazen fazla bölütleme (over-segmentation, örneğin soldaki iki sonuç) yaptığı ve bölütleme sonucu bulunan objelerin sınırlarının girintili-çıkıntılı hatlara sahip olduğu, buna karşılık derin öğrenme temelli yönteminin yumuşak hatlı sınırlara sahip objeler bulduğu ancak bazen yetersiz bölütleme (under-segmentation, örneğin soldan üçüncü sonuç) yaptığı ve küçük, ayrık bölgeleri hatalı olarak hücre diye tanımlayabildiği (örneğin sağdaki sonuç) gözlenmiştir.

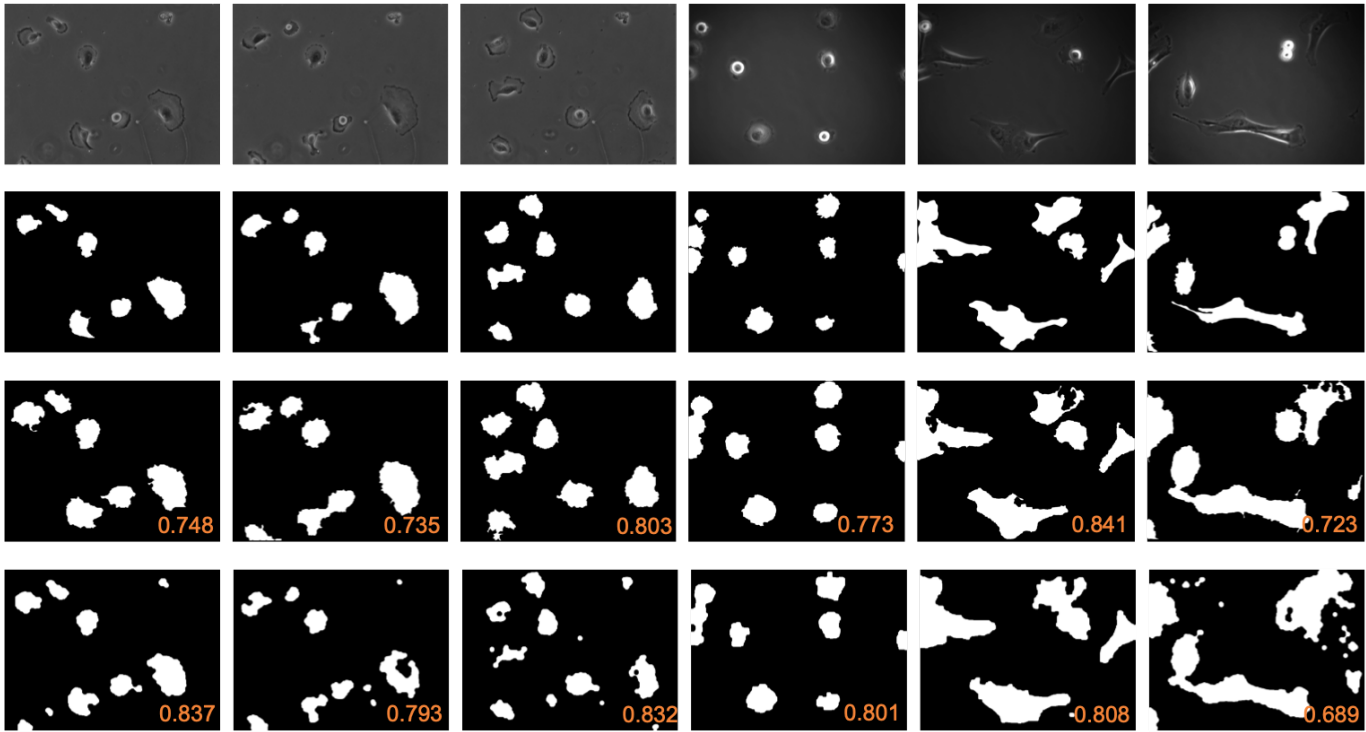
Tablo I: Önerilen yöntemlerin iki veri setindeki ortalama  $\pm$  standart sapma Dice katsayıları cinsinden bölütleme başarımları.

Veri Seti	Önerilen yöntem	
	Geleneksel yöntem	Derin öğrenme temelli yöntem
CTC Yarışma verisi	0.665 $\pm$ 0.13	0.787 $\pm$ 0.10
İYTE verisi	0.790 $\pm$ 0.05	0.761 $\pm$ 0.04

Derin öğrenme temelli yaklaşımın her iki veri kümesi için de benzer başarımlara ulaşması, standart sapma değerlerinin geleneksel yöntemlere göre daha düşük olması ve veri



Şekil 1: Glioblastoma-astrocytoma U373 hücrelerinden oluşan CTC Yarışma verisi (üst) ve meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinden oluşan İYTE verisinin farklı zaman noktalarına ait örnek görüntüleri.



Şekil 2: CTC Yarışma verisi (sol baştan üç sütun) ve İYTE verisinin üç farklı zaman noktasına ait örnek bölütleme sonuçları. Yukarıdan aşağıya satırlar orijinal görüntüyü, uzman elle işaretlemesini, geleneksel yöntem ile bölütleme sonucunu ve derin öğrenme ile bölütleme sonucunu gösterir. Bölütleme sonuçlarının Dice benzerlik katsayıları resimlere giydirilmiştir.

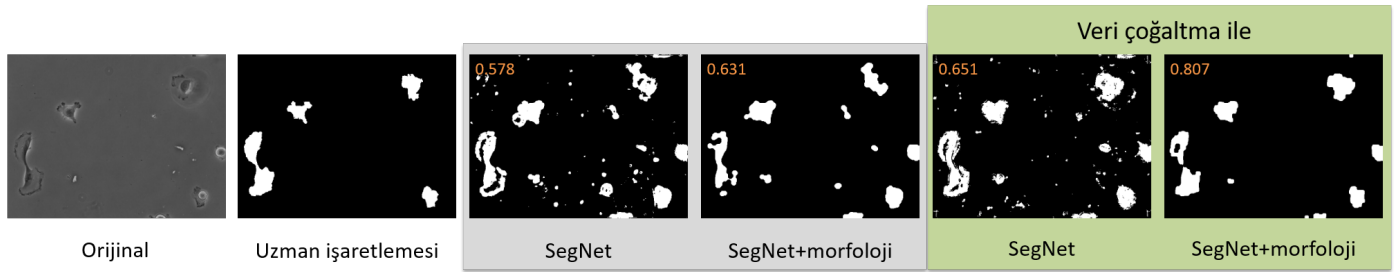
miktarı arttıkça başarımının artacağı öngörüsü sebepleriyle faz kontrast mikroskopide hücre bölütleme problemi için ümit verici olduğu düşünülmüş ve ilave deneyler yapılmıştır. Bu çalışmada veri çoğaltma işlemiyle her iki veri kümesinin eşit sayıda resme sahip olması ve derin öğrenme yönteminin tarafsız eğitilmesi sağlanmıştır. Verinin çoğaltılmadığı yani derin öğrenme yönteminin orijinal veri kümeleri ile eğitildiği durumda bölütleme başarımının yaklaşık %7 düştüğü, derin öğrenme sonrası morfolojik işlemlerin uygulanmadığı durumda da başarımın %5-10 azaldığı gözlenmiştir. Bu gözlemleri destekleyen örnek görsel sonuçlar Şekil 3'te sunulmuştur. Bu görsel sonuçlarda da görüldüğü üzere veri çoğaltmanın uygulanmadığı durumda derin öğrenme yaklaşımı birçok küçük boyutlu bölgeyi hatalı bir şekilde hücre olarak işaretlemekte ve bu hatalı bölütlemeler takip eden morfolojik işlemler ile tamamen temizlenememektedir. Buna karşılık veri çoğaltma sonrası derin öğrenme sonuçları görsel olarak daha tatmin edicidir. Bu gözlem başarılı hücre bölütlemesi için elimizdeki

sınırlı sayıdaki verinin veri çoğaltma uygulanarak zenginleştirilmesinin gerekli olduğunu düşündürmektedir.

#### IV. VARGILAR

Bu çalışmada faz kontrast mikroskopi zaman serilerinde hücrelerin otomatik bölütlenmesi için geleneksel görüntü işleme ve derin öğrenme temelli yöntemler önerilmiş ve bu yöntemlerin başarımı iki farklı veri kümesinde ölçülmüştür. Derin öğrenme yönteminin her iki veri kümesinde de benzer yüksek başarımlara ve daha düşük standart sapma değerlerine ulaştığı için daha gülbüz olduğu ve dolayısıyla söz konusu problem için ümit verici olduğu gözlenmiştir.

Gelecek çalışmalarda veri kümesinin genişletilmesi ve bölütleme başarımını en iyileyen derin öğrenme parametreleri ile morfolojik işlemlerin araştırılması hedeflenmektedir. Nihayi amacımız faz kontrast optik mikroskopi zaman serilerinde



Şekil 3: CTC Yarışma verisine ait bir görüntüde örnek derin öğrenme bölütleme sonuçları. Dice benzerlik katsayıları resimlere giydirilmiştir.

hücrelerin morfolojik değişimlerinin tespiti için görüntü işleme temelli çözümler geliştirmektedir.

### TEŞEKKÜR

A. Ayanzadeh Bilişim Enstitüsü (İTÜ) ve Vodafone Türkiye tarafından İTÜ Vodafone Future Lab kapsamında ITUVF20180901P04 numaralı proje tarafından desteklenmiştir. Çalışma kısmi olarak İTÜ BAP MGA-2017-40964 projesi tarafından desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan İYTE verisi Marie Curie Avrupa'ya Geri Dönüş Hibesi (Marie Curie IRG grant) tarafından desteklenen FP7 PIRG08-GA-2010-27697 projesi kapsamında toplanmıştır.

### KAYNAKÇA

- [1] K. Lomanov, J. M. del Rincon, P. Miller, and H. Gribben, "Cell Detection With Deep Convolutional Networks Trained With Minimal Annotations," in *2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019)*. IEEE, apr 2019, pp. 943–947. [Online]. Available: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8759411/>
- [2] R. Flight, G. Landini, I. B. Styles, R. M. Shelton, M. R. Milward, and P. R. Cooper, "Automated noninvasive epithelial cell counting in phase contrast microscopy images with automated parameter selection." *Journal of microscopy*, vol. 271, no. 3, pp. 345–354, sep 2018. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29999527>
- [3] L. Zhang, "An Efficient Approach for Cell Segmentation in Phase Contrast Microscopy Images," *CoRR*, vol. abs/1904.0, 2019. [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/1904.00328>
- [4] D. Bhaskar, D. Lee, H. Knütsdóttir, C. Tan, M. Zhang, P. Dean, C. Roskelley, and L. Edelstein-Keshet, "A methodology for morphological feature extraction and unsupervised cell classification," *bioRxiv*, 2019.
- [5] H. F. Tsai, J. Gajda, T. F. Sloan, A. Rares, and A. Q. Shen, "Usiigaci: Instance-aware cell tracking in stain-free phase contrast microscopy enabled by machine learning," *SoftwareX*, vol. 9, pp. 230–237, 2019.
- [6] A. Hand, T. Sun, D. Barber, D. Hose, and S. Macneil, "Automated tracking of migrating cells in phase-contrast video microscopy sequences using image registration," *Journal of Microscopy*, vol. 234, no. 1, pp. 62–79, apr 2009. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19335457> <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2818.2009.03144.x>
- [7] K. Li, E. D. Miller, M. Chen, T. Kanade, L. E. Weiss, and P. G. Campbell, "Cell population tracking and lineage construction with spatiotemporal context," *Medical Image Analysis*, vol. 12, no. 5, pp. 546–566, oct 2008. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18656418> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2670445> <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1361841508000650>
- [8] M. Ambühl, C. Brepsant, J.-J. Meister, A. Verkhovsky, and I. Sbalzarini, "High-resolution cell outline segmentation and tracking from phase-contrast microscopy images," *Journal of Microscopy*, vol. 245, no. 2, pp. 161–170, feb 2012. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21999192> <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2818.2011.03558.x>
- [9] I. Seroussi, D. Veikherman, N. Ofer, S. Yehudai-Resheff, and K. Keren, "Segmentation and tracking of live cells in phase-contrast images using directional gradient vector flow for snakes," *Journal of Microscopy*, vol. 247, no. 2, pp. 137–146, aug 2012. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591174> <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2818.2012.03624.x>
- [10] H. Su, Z. Yin, S. Huh, and T. Kanade, "Cell segmentation in phase contrast microscopy images via semi-supervised classification over optics-related features," *Medical Image Analysis*, vol. 17, no. 7, pp. 746–765, oct 2013. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23725638> <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1361841513000492>
- [11] M. Schiegg, P. Hanslovsky, C. Haubold, U. Koethe, L. Hufnagel, and F. A. Hamprecht, "Graphical model for joint segmentation and tracking of multiple dividing cells," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 6, pp. 948–956, mar 2015. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25406328> <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu764>
- [12] N. Jaccard, N. Szita, and L. D. Griffin, "Segmentation of phase contrast microscopy images based on multi-scale local Basic Image Features histograms." *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering. Imaging & visualization*, vol. 5, no. 5, pp. 359–367, sep 2017. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28815155> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5526147>
- [13] J. E. Bresenham, "Algorithm for computer control of a digital plotter," *IBM Systems Journal*, vol. 4, no. 1, pp. 25–30, 2010.
- [14] V. Badrinarayanan, A. Kendall, and R. Cipolla, "SegNet: A Deep Convolutional Encoder-Decoder Architecture for Image Segmentation," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 39, no. 12, pp. 2481–2495, 2017.
- [15] L. R. Dice, "Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species," *Ecology*, vol. 26, no. 3, pp. 297–302, 1945.