

Floresan Mikroskop Sistemlerinde Yüksek Doğruluklu Nükleer Segmentasyonu için Otomatik Kodlayıcı Tabanlı Modellerin Geliştirilmesi

Sümeyye Nur EMİR¹, Sibel DANIŞMAZ², Hülya DOĞAN^{3*}, Ramazan Özgür DOĞAN⁴

Öz

Mikroskopik sistemlerde doku veya hücre numunelerinde nükleer morfoloji veya biyolojik belirteçler gibi bölümleri görselleştirmek için hematoxilen ve eozin (Hematoxylin and eosin - H&E) histolojik boyamalar, immünohistokimyasal (immunohistochemical - IHC) ve immünofloresan (immunofluorescence - IF) boyama yaklaşımları geliştirilmiştir. H&E veya IHC boyamalar ile karşılaştırıldığında, IF boyamaların sayısala aktarılması uzmanlar için daha zorlu ve zaman alıcı olmaktadır. Fakat, IF boyama yaklaşımlarında daha fazla hücresel veya hücre altı belirteç görüntülenebilmektedir. Floresan mikroskoplardan elde edilmiş nükleer segmentasyonun yüksek doğrulukla otomatik gerçekleştirilmesi IF boyama yaklaşımlarındaki hücreler hakkında daha fazla bilgi elde edilmesini sağlamaktadır. Literatürde diğer mikroskopik sistemlerden elde edilmiş görüntülerde hücre veya doku segmentasyonu için birçok çalışma geliştirilmiş ve yüksek doğruluklu sonuçlar elde edilmiştir. Fakat diğer alanlarda gerçekleştirilen bu başarı, floresan mikroskoplardan elde edilmiş görüntülerdeki nükleer segmentasyonu için elde edilmemiştir. Bu kapsamda, çalışmada floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için yüksek doğruluklu otomatik kodlayıcı modelleri geliştirilmektedir. Geliştirilen otomatik kodlayıcı modellerinin analizi uzman kişiler tarafından işaretlenmiş, floresan mikroskop görüntülerinden oluşan veri seti kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Çalışmada kullanılan performans değerlendirme prosedürleri açısından, gerçekleştirilen otomatik kodlayıcı modellerinin başarılarının otomatik nükleer segmentasyon için tatmin edici olduğu açıkça görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Floresan mikroskop, Nükleer segmentasyon, Derin öğrenme, Otomatik kodlayıcı, Transfer öğrenme, U-Net.

Development of Autoencoder Based Models for High Accuracy Nuclear Segmentation in Fluorescent Microscope Systems

Abstract

Hematoxylin and eosin (H&E) histological staining, immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) staining approaches have been developed to visualize sections such as nuclear morphology or biomarkers in tissue or cell samples in microscopic systems. Compared to H&E or IHC staining, digitizing fluorescent staining is more challenging and time consuming for experts. However, more cellular or subcellular markers can be visualized in IF staining approaches. Automated nuclear segmentation obtained from fluorescent microscopes with high accuracy provides more information about cells in IF staining approaches. In the literature, many studies have been developed for cell or tissue segmentation in images obtained from microscopic systems and high accuracy results have been obtained. However, this success in other fields has not been achieved for nuclear segmentation in images obtained from fluorescent microscopes. In this context, high-accuracy autoencoder models are developed for nuclear segmentation in fluorescent microscope systems. The analysis of the developed autoencoder models is carried out using a dataset of fluorescent microscope images marked by experts. In terms of the performance evaluation procedures used in the study, it is clearly seen that the success of the autoencoder models performed is satisfactory for automatic nuclear segmentation.

Keywords: Fluorescent microscope, Nuclear segmentation, Deep learning, Autoencoder, Transfer Learning, U-Net.

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Trabzon, Türkiye, smyyenr.61@gmail.com

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Trabzon, Türkiye, sibel.danisalmaz16@gmail.com

³Karadeniz Teknik Üniversitesi, Yazılım Mühendisliği Bölümü, Trabzon, Türkiye, hulya@ktu.edu.tr

⁴Gümüşhane Üniversitesi, Yazılım Mühendisliği Bölümü, Gümüşhane, Türkiye, ramazan.dogan@gumushane.edu.tr

¹<https://orcid.org/0000-0002-7331-2406>

²<https://orcid.org/0000-0001-6945-6493>

³<https://orcid.org/0000-0003-3695-8539>

⁴<https://orcid.org/0000-0001-6415-5755>

1. Giriş

Günümüzde medikal görüntü işleme, dijital patoloji, hesaplamalı patoloji, sistem patolojisi veya çeşitli mikroskobik sistemler olmak üzere birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Medikal görüntü işleme teknikleri numunenin otomatik yorumlanması, daha iyi çözünürlük, görüntü iyileştirme gibi birçok uygulama sağlayarak bu alanlardaki uzmanların iş yükünü oldukça hafifletmektedir (Ramesh ve ark., 2021).

Dijital patolojide uzmanlar hastalığın derecesini, tipini ve evresini belirleyebilmek için genelde mikroskoplarda doku kesitlerini kullanmaktadırlar. Mikroskobik sistemler ile nükleer özellikler dahil hücre bilgilerinin doğru ölçümü, tümörün heterojenliği ve yapılan tıbbi müdahaleye yanıt gibi karakterizasyonlar için kritik öneme sahiptir. Bu alanda dokularda veya hücre numunelerinde nükleer morfoloji veya biyolojik belirteçler gibi bölümleri görselleştirmek için hematoksin ve eozin (Hematoxylin and eosin - H&E) histolojik boyamalar, immünohistokimyasal (immunohistochemical - IHC) ve immünofloresan (immunofluorescence - IF) boyama yaklaşımları geliştirilmiştir. H&E ve IHC boyamaları rutin tanı laboratuvarlarında ve patoloji bölümlerinde standart prosedürler iken, IF boyama rutin tanılamadan ziyade araştırma ortamlarında daha sık kullanılmaktadır (Ikeda ve ark., 2021).

H&E veya IHC boyamalar ile karşılaştırıldığında floresan boyamaların sayısala aktarılması uzmanlar için daha zorlu ve zaman alıcı olmaktadır. Fakat, IF boyama yaklaşımlarında daha fazla hücresel veya hücre altı belirteç görüntülenebilmektedir. Bu durum tek tek hücreler veya hücre bölmeleri hakkında daha fazla bilgi edinilmesini sağlamaktadır (Schubert ve ark., 2006). Floresan mikroskoplardan elde edilmiş nükleer segmentasyonunun yüksek doğrulukla otomatik gerçekleştirilmesi, IF boyama yaklaşımlarındaki hücreler hakkında daha fazla bilgi elde edilmesini sağlamaktadır.

1.1. Literatür Çalışmaları

Birbiriyle ayrık durumda olan çekirdeklere sahip doku veya hücre numunelerinin eşiklemeye dayalı daha basit yaklaşımlarla (Jeevitha ve ark., 2020; Pare ve ark., 2020) kolayca segmentasyonu gerçekleştirilebilirken, nükleer görüntülerdeki gibi yoğun şekilde birbiriyle çakışmış doku veya hücre kümelerinin segmentasyonu için daha karmaşık yaklaşımlar gerekmektedir. Klasik segmentasyon yaklaşımları görüntüdeki doku veya hücreleri arka plandan ayırmak için tasarlanmış olmalarına rağmen, yoğun şekilde birbiriyle çakışmış doku veya hücre kümelerini arka plandan ayırmada (segmentasyon) sıklıkla başarısız olmaktadır. Bu durumun üstesinden gelmek ve yoğun şekilde birbiriyle çakışmış doku veya hücre kümelerinin daha yüksek doğruluklu segmentasyonu için

araştırmacılar genelde derin öğrenme tabanlı görüntü segmentasyon yaklaşımları geliştirilmektedirler (Niazi ve ark., 2019; Durkee ve ark., 2021; Jose ve ark., 2021).

Derin öğrenme tabanlı görüntü segmentasyon yaklaşımları eğitim süreçlerinde uzman kişiler tarafından işaretlenmiş veri kümeleri zengin ise çok başarılı sonuçlar elde etmeyi garanti edebilmektedir. Fakat gerçekleştirdiğimiz literatür araştırmalarına göre nükleer görüntülerde kümenin bir veya birden çok çekirdekten oluşup oluşmadığına karar vermenin zor olmasından dolayı herkesin kullanımına açık nükleer görüntülerden oluşan veri seti çok bulunmamaktadır. Bu yüzden literatürde nükleer segmentasyonu gerçekleştiren çalışma sıklıkla gerçekleştirilememektedir. Literatürde floresan mikroskoplarda hücre veya doku segmentasyonu gerçekleştiren çalışmalara örnek verecek olursak; Wang ve ark. (2010) floresan görüntülerinde tek hücrelilerin analizindeki temel adımları otomatikleştirmek için yeni yöntemler geliştirmişlerdir. Du ve ark. (2010) floresan mikroskoplarda hücre görüntü segmentasyonu için birden fazla denetimsiz veri madenciliği tekniğini geliştirmişler ve çalışmalarında tekniklerin performanslarını değerlendirmişlerdir. Rizk ve ark. (2014) çalışmalarında floresan mikroskopi görüntülerinde hücre altı yapıları tespit etmek, tanımlamak ve ölçmek için kullanılan 'Squassh' (hücre altı şekillerin segmentasyonu ve nicelenmesi) adlı bir yöntem için çok yönlü bir protokol sunmuşlardır. Pan ve ark. (2022) çalışmalarında W-Net modelinden esinlenerek Attention-enhanced Simplified W-Net (ASW-Net) adlı yeni bir çerçeve önermişlerdir. Gerçekleştirdikleri çalışmada dikkate değer bir segmentasyon performansına ulaşmışlardır. Caicedo ve ark. (2019) floresan mikroskop görüntülerinde çekirdek segmentasyonunun doğruluğunu artırmak için derin öğrenme algoritmalarının potansiyeli araştırmışlardır. Kromp ve ark. (2019) floresan mikroskop görüntülerinde nükleer segmentasyonu için derin öğrenme tabanlı yaklaşım geliştirmişlerdir. Daniel ve ark. (2022) transfer öğrenmeli konvolüsyonel sinir ağı modeli kullanarak floresan mikroskopi görüntülerinde endoplazmik retikulum ağını çıkarmak için otomatik segmentasyon işlemini uygulamayı amaçlamışlardır. Bu kapsamda çalışmalarında VGG-UNet ve VGG-SegNet modelleri ile %98'lik segmentasyon doğruluğu elde etmişlerdir.

1.2. Literatürdeki Kısıtlamalar ve Çalışmanın Katkıları

Literatürde mikroskobik sistemlerden elde edilmiş görüntülerde hücre veya doku segmentasyonu için birçok çalışma geliştirilmiş ve yüksek doğruluklu sonuçlar elde edilmiştir (Liu ve ark., 2021; Masubuchi ve ark., 2020; Araújo ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2021). Fakat diğer alanlarda gerçekleştirilen bu başarı floresan mikroskoplardan elde edilmiş görüntülerdeki nükleer segmentasyonu için elde edilmemiştir. Floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu çalışmalarında hala kısıtlamalar mevcuttur. Bu kısıtlamalar şu şekilde özetlenebilmektedir:

1. Gerçekleştirdiğimiz literatür araştırmalarına göre nükleer görüntülerde bir kümenin bir veya birden çok çekirdekten oluşup oluşmadığına karar vermenin zor olmasından dolayı herkesin kullanımına açık nükleer görüntülerden oluşan veri seti çok bulunmamaktadır.
2. Nükleer segmentasyon için veri setinin bulunmamasından dolayı literatürde bu alanda gerçekleştirilen çalışma az sayıda bulunmaktadır. Bundan dolayı floresan mikroskopik sistemlerde otomatik nükleer segmentasyon başarıları da tatmin edici seviyede değildir.

Literatürde otomatik segmentasyon gerçekleştiren çalışmalarda klasik U-Net, Seg-Net, transfer öğrenmeli U-Net yaklaşımlarının oldukça başarılı olduğu görülmüştür (Cheng ve ark., 2021; Amiri ve ark., 2020; Raj ve ark., 2021). Bu çalışmada ise literatürdeki çalışmalardan esinlenilerek floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için yüksek doğruluklu otomatik kodlayıcı modelleri geliştirilmektedir.

Bu çalışmanın genel yapısı şu şekilde tasarlanmıştır. Bölüm 2’de çalışmada kullanılan veri seti ve otomatik kodlayıcı modelleri detaylı şekilde anlatılmaktadır. Bölüm 3’te çalışmada elde edilen bulgular hakkında genel tartışma gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızın son kısmı olan Bölüm 4’te ise çalışmanın sonuçları ve gelecekteki çalışmalar için öneriler verilmektedir.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada, otomatik nükleer segmentasyonu için uzman kişiler tarafından işaretlenmiş, floresan mikroskop görüntülerinden oluşan veri seti kullanılarak otomatik kodlayıcı modelleri geliştirilmektedir. Çalışmamızın bu bölümünde ilk olarak kullanılan veri setinden bahsedilecek, daha sonra ise geliştirilen otomatik kodlayıcı modelleri detaylı olarak anlatılacaktır.

2.1. Veri Seti

Bu çalışmada geliştirilen otomatik kodlayıcı modellerinin analizi, makine öğrenmesi tabanlı nükleer segmentasyon yaklaşımlarının eğitilmesi amacıyla Kromp ve ark. (2020) tarafından hazırlanmış veri seti üzerinde gerçekleştirilmektedir. Bu veri seti patolojik kökenli farklı biyolojik doku ve hücrelerden oluşmaktadır. Veri setinde 79 adet uzman kişi tarafından işaretlenmiş görüntü bulunmaktadır. Veri setindeki görüntülerin elde edildiği numune çeşitleri şu şekildedir: Schwann hücre stroması bakımından zengin doku (ganglionöroblastomdan) kriyoseksiyonları, Wilms tümör dokusu kriyoseksiyonları, nöroblastom tümör dokusu kriyoseksiyonları, nöroblastom hücreleri ile infiltre edilmiş kemik iliği sitospin preparatları, nöroblastom tümör dokunmatik damgaları, mikroskopi cam slaytlarında sitospinlenmiş iki nöroblastom hücre hattının (CLB-Ma, STA-NB10)

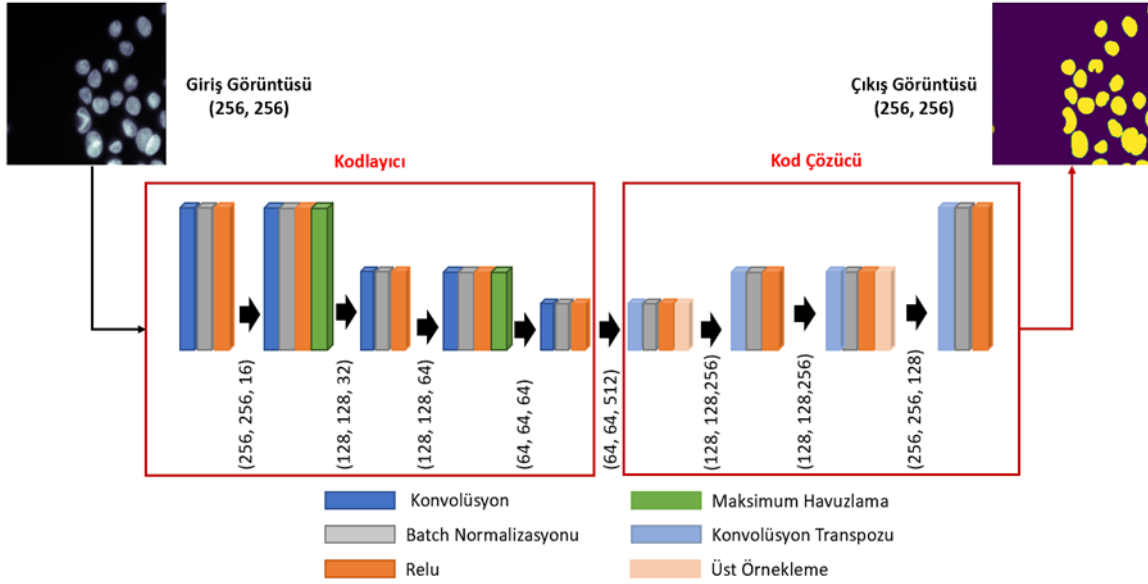
hücreleri ve mikroskopi cam slaytlarında sitospinlenmiş veya büyütülmüş normal bir insan keratinosit hücre hattının (HaCaT) hücreleri. Veri setindeki görüntüler 10x, 20x, 40x ve 63x olmak üzere farklı büyütme objektifleri kullanılarak elde edilmektedir. IF görüntülerindeki çekirdekler, eğitimli biyologlar tarafından işaretlenmektedir.

2.2. Otomatik Kodlayıcı Modelleri

Bu çalışmada floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için yüksek doğruluklu otomatik kodlayıcı modelleri geliştirilmektedir. Çalışmada geliştirilen otomatik kodlayıcı modellerinin detayları şu şekildedir:

2.2.1. Tam Konvolüsyonel Ağ (Fully Convolutional Network - FCN)

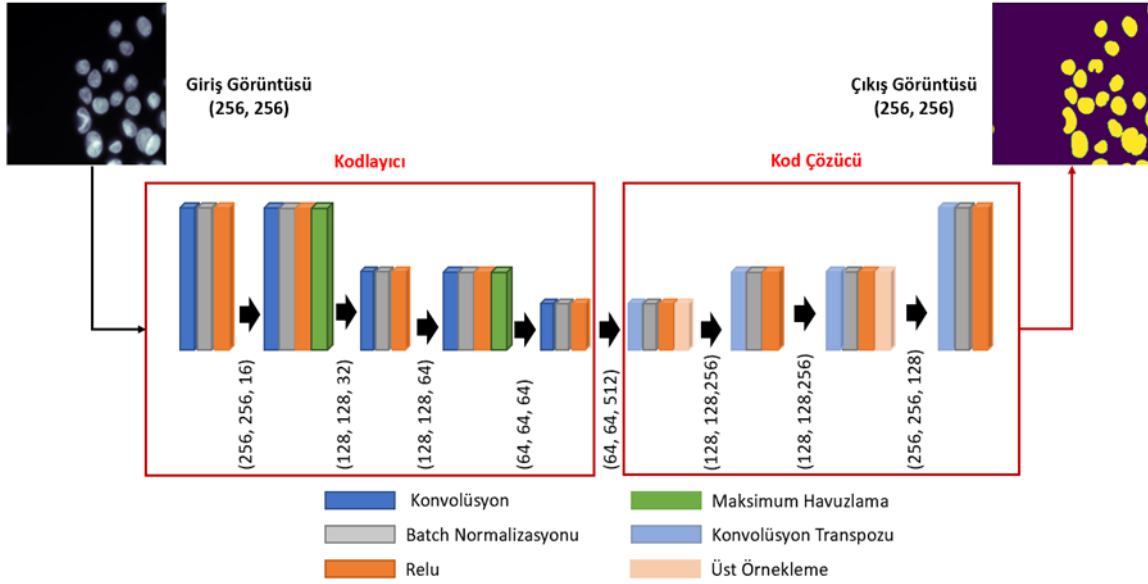
Floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için çalışmada geliştirilen ilk otomatik kodlayıcı modeli Tam Konvolüsyonel Ağ yapısıdır. Çalışmada geliştirilen Tam Konvolüsyonel Ağ modelinin şematik temsili Şekil 1'de verilmektedir. Geliştirilen Tam Konvolüsyonel Ağ modeli giriş olarak nükleer yapılar içeren floresan mikroskop görüntüsünün ham halini almakta ve çıkış olarak giriş ile aynı boyutta nükleer segmentasyonu elde edilmiş görüntüyü vermektedir. Önerilen Tam Konvolüsyonel Ağ modeli kodlayıcı ve kod çözücü olmak üzere iki ana aşamadan oluşmaktadır. Kodlayıcı aşaması giriş olarak floresan mikroskop görüntüsünün ham halini almakta ve çıkış olarak giriş verisini temsil eden özellik haritaları üretmektedir. Kodlayıcı aşaması art arda sıralanmış 5 bloktan oluşmaktadır. 1, 3 ve 5. blok konvolüsyon, batch normalizasyonu ve Relu katmanlarını içerirken, diğer katmanlar ek olarak maksimum havuzlama katmanını kapsamaktadır. Kod çözücü aşaması ise giriş olarak kodlayıcı aşamasında üretilen özellik haritalarını almakta ve çıkış olarak giriş sinyali ile aynı boyutta nükleer segmentasyonu elde edilmiş görüntüyü üretmektedir. Kod çözücü aşaması art arda sıralanmış 4 bloktan oluşmaktadır. 2 ve 4. blok konvolüsyon traspozu, batch normalizasyon ve Relu katmanlarını içermektedir. Diğer katmanlar ise bu üç katmana ek olarak üst örnekleme katmanını kapsamaktadır.



Şekil 1. Çalışmada geliştirilen Tam Konvolüsyonel Ağ modelinin şematik temsili.

2.2.2. U-Net

Floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için çalışmada geliştirilen ikinci otomatik kodlayıcı modeli U-Net yapısıdır. Çalışmada geliştirilen U-Net modelinin şematik temsili Şekil 2’de verilmektedir. Geliştirilen U-Net modeli giriş olarak nükleer yapılar içeren floresan mikroskop görüntüsünün ham halini almakta ve çıkış olarak giriş sinyali ile aynı boyutta nükleer segmentasyonu elde edilmiş görüntüyü vermektedir. Şekil 2’de görüldüğü gibi çalışmada nükleer segmentasyon için U-Net modeli giriş katmanından aldıkları değerleri çıkış katmanına ileten bir yapıya sahiptir. Bu yaklaşım modelinde giriş olarak verilen floresan görüntülerin en iyi özelliklerinin öğrenilmesi amaçlanmaktadır. Önerilen U-Net modeli kodlayıcı ve kod çözücü olmak üzere iki ana aşamadan oluşmaktadır. Kodlayıcı aşaması giriş olarak floresan mikroskop görüntüsünün ham halini almakta ve çıkış olarak giriş verisini temsil eden özellik haritaları üretmektedir. Kodlayıcı aşaması art arda sıralanmış 6 bloktan oluşmaktadır. 1. blok sadece konvolüsyon ve batch normalizasyonu katmanlarını içermektedir. 1. bloktaki katmanlara ek olarak 6. blok Relu katmanını, 2, 3, 4 ve 5. bloklar ise Relu ve maksimum havuzlama katmanlarını içermektedirler. Kod çözücü aşaması ise giriş olarak kodlayıcı aşamasında üretilen özellik haritalarını almakta ve çıkış olarak giriş görüntüsü ile aynı boyutta nükleer segmentasyonu elde edilmiş görüntüyü üretmektedir. Kod çözücü aşaması art arda sıralanmış 5 bloktan oluşmaktadır. İlk 4 blok konvolüsyon traspozu ve conceratenate katmanlarını içermektedir. Son katman ise konvolüsyon ve zero padding katmanlarını kapsamaktadır.



Şekil 2. Çalışmada geliştirilen U-Net modelinin şematik temsili.

2.2.3. Transfer Öğrenmeli U-Net

Tam Konvolüsyonel Ağ ve U-Net gibi klasik otomatik kodlayıcı modelleri yeterli performans sağlayabilmeleri için kapsamlı hesaplama ve zaman kaynakları gerektirmektedirler. Transfer öğrenme önceden eğitilmiş bu modellerin başlangıç noktası olarak kullanıldığı bir yaklaşımdır. Transfer öğrenmenin amacı eğitimi yapıldığı kaynaktaki bilgiyi kullanarak hedef kaynaktaki öğrenmeyi geliştirmek ve eğitim süresini azaltmaktır.

Floresan mikroskop sistemlerinin nükleer segmentasyonu sürecinde daha az bellek kullanımı ve daha kısa eğitim süresi sağlayarak klasik U-Net modelinin başarısını daha da artırmak için bu çalışmada Transfer Öğrenmeli U-Net modelleri geliştirilmektedir. Geliştirilen transfer öğrenmeli modellerde U-Net yapısının kodlayıcı kısmı değiştirilmektedir. Çalışmada önerilen Transfer Öğrenmeli U-Net modellerinin kodlayıcı kısımları MobileNet (Howard ve ark., 2017), VGG (Wang ve ark., 2015), DenseNet (Huang ve ark., 2017) ve ResNet (He ve ark., 2016) ile değiştirilmiştir. Tüm bu modeller, 1000 sınıfa sahip yüzbinlerce görüntü içeren ImageNet'in (Deng ve ark., 2009) bir alt kümesinde eğitilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Cihaz Konfigürasyonu

Çalışmada önerilen otomatik kodlayıcı modellerinin gerçekleştirilmesi için, Intel Core i7-9750 ve 2.60 GHz işlemci, 16 GB RAM ve NVIDIA GeForce RTX 3060 GPU'ya sahip bir PC üzerinde

çalışan Python 3.6 yazılımını Keras arka uç Tensorflow'dan oluşan bir cihaz konfigürasyonu oluşturulmuştur.

3.2. Performans Değerlendirme Prosedürleri

Bu çalışmada hangi nükleer segmentasyon yaklaşımının daha iyi sonuçlar ürettiğini göstermek için Doğruluk, Hassasiyet, Özgüllük ve Jaccard olmak üzere dört farklı performans değerlendirme prosedürü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan performans değerlendirme prosedürleri şu şekilde hesaplanmaktadır:

$$\text{dogruluk} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} \quad (1)$$

$$\text{hassasiyet} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (2)$$

$$\text{ozgulluk} = \frac{TN}{TN+FP} \quad (3)$$

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

Denklem (1) – (4)'te Doğru Pozitif (True Positive - TP) doğru tahmin edilmiş sınıf sayısını, Doğru Negatif (True Negative - TN) doğru tahmin edilmemiş sınıf sayısını, Yanlış Pozitif (False Positive - FP) hatalı tahmin edilmiş sınıf sayısını ve Yanlış Negatif (False Negative - FN) tahmin edilmemiş sınıf sayısını göstermektedir. İdeal nükleer segmentasyon yaklaşımı ile elde edilen Doğruluk, Hassasiyet, Özgüllük ve Jaccard değerlerinin diğer yaklaşımlardan daha yüksek olması beklenmektedir.

3.3. Önerilen Ağ Yapısı Konfigürasyonu

Bu çalışmada floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için Bölüm 2'de ayrıntıları verilen otomatik kodlayıcı modelleri kurulmaktadır. Çalışmada kurulan otomatik kodlayıcı modelleri 60 görüntü kullanılarak eğitilmekte ve 19 görüntü kullanılarak test edilmektedir. Önerilen modellerin eğitim ve test işlemleri beş kat çapraz doğrulama ile gerçekleştirilmektedir. Batch size ve epoch sayıları sırasıyla 10 ve 70 olarak atanmaktadır. Her giriş görüntüsünün boyutu 256 x 256 piksele ölçeklenmekte ve gri seviyeye dönüştürülmektedir.

3.4. Nicel Performans Analizi

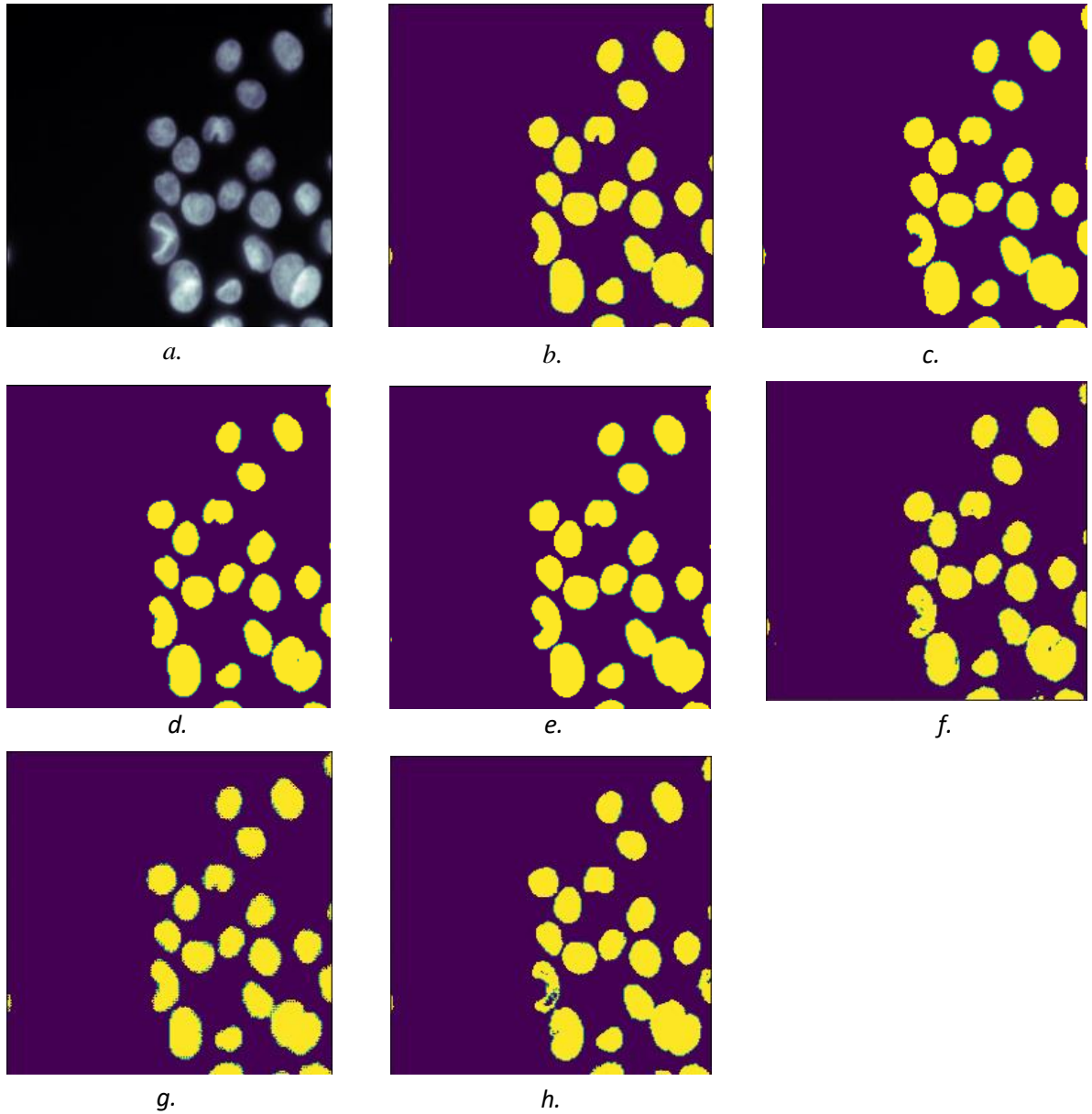
Floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için nicel performans analizi çalışmada geliştirilen otomatik kodlayıcı modelleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için kullanılan veri seti ile literatürde çalışma gerçekleştirilmediğinden önerilen otomatik kodlayıcı modelleri literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılamamıştır. Çalışmada gerçekleştirilen tüm otomatik kodlayıcı modelleri (FCN, U-Net, MobileNet + U-Net, VGG + U-Net, DenseNet + U-Net ve ResNet + U-Net) için performans değerlendirme prosedürlerinden elde edilen nicel sonuçlar Tablo 1'de sunulmaktadır. Optimum otomatik kodlayıcı modeli ile segmente edilmiş görüntülerin daha yüksek Doğruluk, Hassasiyet, Özgüllük ve Jaccard değerlerini vermesi beklenmektedir. Tablo 1'de görüldüğü gibi performans değerlendirme prosedürleri açısından MobileNet + UNet modeli etkinliğinin nükleer segmentasyonu için diğer otomatik kodlayıcı modellerinden daha üstün olduğu açıkça görülmektedir. Geliştirilen MobileNet + U-Net modeli Doğruluk, Hassasiyet, Özgüllük ve Jaccard ortalama değerlerini 0.9766, 0.9538, 0.9833 ve 0.8832 olarak üretmektedir. Bu değerler diğer otomatik kodlayıcı modellerinden daha yüksek sonuçlar üretmektedir.

Tablo 1. Nükleer segmentasyon için önerilen otomatik kodlayıcı modellerinin performans değerlendirme prosedürlerinden elde edilen nicel sonuçlar.

Model	Doğruluk	Hassasiyet	Özgüllük	Jaccard
FCN	0.9205	0.9263	0.9348	0.8187
U-Net	0.9750	0.9522	0.9816	0.8045
MobileNet + U-Net	0.9766	0.9538	0.9833	0.8832
VGG + U-Net	0.9672	0.9504	0.9778	0.8820
DenseNet + U-Net	0.9723	0.9400	0.9820	0.8811
ResNet + U-Net	0.9389	0.9101	0.9471	0.8354

3.5. Nitel Performans Analizi

Floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için çalışmanın nitel performans analizi Şekil 3'te verilmektedir. Şekil 3'te sırasıyla otomatik kodlayıcı modellerine verilen giriş görüntüsü, biyologlar tarafından işaretlenmiş referans görüntü, FCN, U-Net, MobileNet + U-Net, VGG + U-Net, DenseNet + U-Net ve ResNet + U-Net modelleri ile elde edilmiş çıkış görüntüleri gösterilmektedir. Çalışmada elde edilen nicel sonuçlarda performans değerlendirme prosedürleri açısından MobileNet + U-Net etkinliğinin nükleer segmentasyonu için diğer otomatik kodlayıcı modellerinden daha üstün olduğu açıkça görülmektedir. Şekil 3'te elde edilen nitel sonuçlarda ise MobileNet + U-Net modelinin bu üstünlüğü görsel olarak ispatlanmaktadır.



Şekil 3. Nükleer segmentasyon için önerilen otomatik kodlayıcı modelleri kullanılarak elde edilen nitel sonuçlar. a. Giriş görüntüsü b. Biyologlar tarafından işaretlenmiş referans görüntü c. FCN modeli elde edilmiş çıkış görüntüsü d. U-Net modeli elde edilmiş çıkış görüntüsü e. MobileNet + U-Net modeli elde edilmiş çıkış görüntüsü f. VGG + U-Net modeli elde edilmiş çıkış görüntüsü g. DenseNet + U-Net modeli elde edilmiş çıkış görüntüsü h. ResNet + U-Net FCN modeli elde edilmiş çıkış görüntüsü.

4. Sonuçlar ve Öneriler

Bu çalışmada floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için yüksek doğruluklu otomatik kodlayıcı modelleri geliştirilmektedir. Çalışmada geliştirilen otomatik kodlayıcı modelleri Tam Konvolüsyonel Ağ, U-Net ve Transfer Öğrenmeli U-Net'tir. Çalışmada Transfer Öğrenmeli U-Net modellerinin kodlayıcı kısımları MobileNet, VGG, DenseNet ve ResNet ile değiştirilmektedir.

Çalışmanın önceki kısımlarından da değinildiği gibi, literatürde diğer mikroskop sistemlerinden elde edilmiş görüntülerde hücre ve doku segmentasyonu gerçekleştiren birçok çalışma

bulunmaktadır. Bu çalışmalar oldukça yüksek doğruluklu sonuçlar elde etmektedir. Fakat diğer mikroskop sistemlerinde gerçekleştirilen bu performans floresan mikroskop sistemlerinde elde edilememiştir. Floresan mikroskop sistemleri için nükleer segmentasyonu çalışmalarında, kullanıma açık nükleer görüntülerden oluşan veri setinin çok bulunmaması, bu alanda gerçekleştirilen çalışma sayısının az olması gibi kısıtlamalar mevcuttur. Bu kısıtlamalardan dolayı floresan mikroskopik sistemlerde otomatik nükleer segmentasyon başarıları da tatmin edici seviyede değildir. Gerçekleştirilen çalışmada ise literatürdeki derin öğrenme modellerinden esinlenilerek floresan mikroskop sistemlerinde nükleer segmentasyonu için otomatik kodlayıcı modelleri geliştirilmiş ve bu alandaki kısıtlamalar minimize edilmiştir.

Çalışmada gerçekleştirilen otomatik kodlayıcı modellerinin performans analizi için, Doğruluk, Hassasiyet, Özgüllük ve Jacard olmak üzere 4 farklı performans değerlendirme prosedürü kullanılmıştır. Nükleer segmentasyon analizi için çalışmada FCN, U-Net, MobileNet + U-Net, VGG + U-Net, DenseNet + U-Net ve ResNet + U-Net modelleri geliştirilmiştir. Performans değerlendirme prosedürleri ile elde edilen sonuçlardan MobileNet + UNet modeli etkinliğinin nükleer segmentasyonu için diğer otomatik kodlayıcı modellerinden daha üstün olduğu açıkça görülmüştür. Geliştirilen MobileNet + U-Net modeli Doğruluk, Hassasiyet, Özgüllük ve Jaccard ortalama değerlerini 0.9766, 0.9538, 0.9833 ve 0.8832 olarak üretmiştir. Çalışmada elde edilen bu sayısal sonuçlar görsel sonuçlar ile de desteklenmiştir.

Bu çalışmada önceden değinildiği gibi nükleer segmentasyonu için FCN, U-Net, MobileNet + U-Net, VGG + U-Net, DenseNet + U-Net ve ResNet + U-Net modelleri geliştirilmiştir. Gelecek çalışmalarda görüntü dönüştürücü (image transformer) gibi daha performanslı otomatik kodlayıcı modelleri kullanılarak başarının artırılması planlanmaktadır.

Bu çalışmada geliştirilen otomatik kodlayıcı modellerinin analizi, makine öğrenmesi tabanlı nükleer segmentasyon yaklaşımlarının eğitilmesi amacıyla Kromp ve ark. (2020) tarafından hazırlanmış veri seti üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu veri seti patolojik kökenli farklı biyolojik doku ve hücrelerden oluşmaktadır. Veri setinde 79 adet uzman kişi tarafından işaretlenmiş görüntü bulunmaktadır. Veri setindeki görüntü sayısının oldukça kısıtlı olduğu görülmektedir. Gelecek çalışmalarda floresan mikroskop görüntüleri içeren yeni veri seti oluşturularak daha objektif değerlendirmenin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

Yazarların Katkısı

Sümeyye Nur Emir çalışmanın veri toplama, veri analizi ve yorumlama, fikirsel içeriğin eleştirisel incelenmesi, son onay ve tam sorumluluk kısımlarına, Sibel Danışmaz veri toplama, veri analizi ve yorumlama, fikirsel içeriğin eleştirisel incelenmesi, son onay ve tam sorumluluk

kısımlarına, Hülya Doğan çalışmanın kavramsal ve tasarım süreçlerinin belirlenmesi ve yönetimi, veri analizi ve yorumlama, makale taslağının oluşturulması, son onay ve tam sorumluluk kısımlarına, Ramazan Özgür Doğan çalışmanın kavramsal ve tasarım süreçlerinin belirlenmesi, fikirsel içeriğin eleştirisel incelenmesi, son onay ve tam sorumluluk kısımlarına katkı sağlamışlardır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

Kaynaklar

- Amiri, M., Brooks, R., and Rivaz, H., (2020). Fine-tuning U-Net for ultrasound image segmentation: different layers, different outcomes. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 67(12), 2510-2518.
- Araújo, F. H., Silva, R. R., Ushizima, D. M., Rezende, M. T., Carneiro, C. M., Bianchi, A. G. C., and Medeiros, F. N., (2019). Deep learning for cell image segmentation and ranking. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 72, 13-21.
- Caicedo, J. C., Roth, J., Goodman, A., Becker, T., Karhohs, K. W., Broisin, M., ... and Carpenter, A. E., (2019). Evaluation of deep learning strategies for nucleus segmentation in fluorescence images. *Cytometry Part A*, 95(9), 952-965.
- Cheng, D., and Lam, E. Y., (2021). Transfer learning U-Net deep learning for lung ultrasound segmentation. *arXiv preprint arXiv:2110.02196*.
- Daniel, J., Rose, J. T., Vinnarasi, F., and Rajinikanth, V., (2022). VGG-UNet/VGG-SegNet Supported Automatic Segmentation of Endoplasmic Reticulum Network in Fluorescence Microscopy Images. *Scanning*, 2022.
- Deng, J., Dong, W., Socher, R., Li, L. J., Li, K., and Fei-Fei, L., (2009). Imagenet: A large-scale hierarchical image database. *IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 248-255.
- Du, X., and Dua, S., (2010). Segmentation of fluorescence microscopy cell images using unsupervised mining. *The open medical informatics journal*, 4, 41.
- Durkee, M. S., Abraham, R., Clark, M. R., and Giger, M. L., (2021). Artificial intelligence and cellular segmentation in tissue microscopy images. *The American Journal of Pathology*, 191(10), 1693-1701.
- He, K., Zhang, X., Ren, S., and Sun, J., (2016). Deep residual learning for image recognition. *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, 770-778.
- Howard, A. G., Zhu, M., Chen, B., Kalenichenko, D., Wang, W., Weyand, T., ... and Adam, H., (2017). Mobilenets: Efficient convolutional neural networks for mobile vision applications. *arXiv preprint arXiv:1704.04861*.
- Huang, G., Liu, Z., Van Der Maaten, L., and Weinberger, K. Q., (2017). Densely connected convolutional networks. *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, 4700-4708.
- Ikeda, J., Ohe, C., Yoshida, T., Kuroda, N., Saito, R., Kinoshita, H., ... and Matsuda, T., (2021). Comprehensive pathological assessment of histological subtypes, molecular subtypes based on immunohistochemistry, and tumor-associated immune cell status in muscle-invasive bladder cancer. *Pathology International*, 71(3), 173-182.

- Jeevitha, K., Iyswariya, A., RamKumar, V., Basha, S. M., and Kumar, V. P., (2020). A review on various segmentation techniques in image processing. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7(4), 1342-1348.
- Jose, L., Liu, S., Russo, C., Nadort, A., and Di Ieva, A., (2021). Generative adversarial networks in digital pathology and histopathological image processing: A review. *Journal of Pathology Informatics*, 12(1), 43.
- Kromp, F., Bozsaky, E., Rifatbegovic, F., Fischer, L., Ambros, M., Berneder, M., ... and Taschner-Mandl, S., (2020). An annotated fluorescence image dataset for training nuclear segmentation methods. *Scientific Data*, 7(1), 1-8.
- Kromp, F., Fischer, L., Bozsaky, E., Ambros, I., Doerr, W., Taschner-Mandl, S., ... and Hanbury, A., (2019). Deep Learning architectures for generalized immunofluorescence based nuclear image segmentation. *arXiv preprint arXiv:1907.12975*.
- Liu, Z., Jin, L., Chen, J., Fang, Q., Ablameyko, S., Yin, Z., and Xu, Y., (2021). A survey on applications of deep learning in microscopy image analysis. *Computers in Biology and Medicine*, 134, 104523.
- Masubuchi, S., Watanabe, E., Seo, Y., Okazaki, S., Sasagawa, T., Watanabe, K., ... and Machida, T., (2020). Deep-learning-based image segmentation integrated with optical microscopy for automatically searching for two-dimensional materials. *NPJ 2D Materials and Applications*, 4(1), 1-9.
- Niazi, M. K. K., Parwani, A. V., and Gurcan, M. N., (2019). Digital pathology and artificial intelligence. *The lancet oncology*, 20(5), e253-e261.
- Pan, W., Liu, Z., Song, W., Zhen, X., Yuan, K., Xu, F., and Lin, G. N., (2022). An Integrative Segmentation Framework for Cell Nucleus of Fluorescence Microscopy. *Genes*, 13(3), 431.
- Pare, S., Kumar, A., Singh, G. K., and Bajaj, V., (2020). Image segmentation using multilevel thresholding: a research review. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions of Electrical Engineering*, 44(1), 1-29.
- Raj, R., Londhe, N. D., and Sonawane, R., (2021). Automated psoriasis lesion segmentation from unconstrained environment using residual U-Net with transfer learning. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 206, 106123.
- Ramesh, K. K. D., Kumar, G. K., Swapna, K., Datta, D., and Rajest, S. S., (2021). A review of medical image segmentation algorithms. *EAI Endorsed Transactions on Pervasive Health and Technology*, 7(27), e6-e6.
- Rizk, A., Paul, G., Incardona, P., Bugarski, M., Mansouri, M., Niemann, A., ... and Sbalzarini, I. F., (2014). Segmentation and quantification of subcellular structures in fluorescence microscopy images using Squash. *Nature protocols*, 9(3), 586-596.
- Schubert, W., Bonnekoh, B., Pommer, A. J., Philipsen, L., Böckelmann, R., Malykh, Y., ... and Dress, A. W., (2006). Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nature biotechnology*, 24(10), 1270-1278.
- Wang, L., Guo, S., Huang, W., and Qiao, Y., (2015). Places205-vggnet models for scene recognition. *arXiv preprint arXiv:1508.01667*.
- Wang, Q., Niemi, J., Tan, C. M., You, L., and West, M., (2010). Image segmentation and dynamic lineage analysis in single-cell fluorescence microscopy. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*, 77(1), 101-110.
- Zhang, Y., Jiang, H., Ye, T., and Juhas, M., (2021). Deep learning for imaging and detection of microorganisms. *Trends in Microbiology*, 29(7), 569-572.