

Faz-Kontrast Mikroskopî Görüntü Serilerinden Hücre Hareketliliği Analizi Ön-Çalışması

A Preliminary Study on Cell Motility Analysis from Phase-Contrast Microscopy Image Series

Emre Kayan ve Tarık Kavuşan
Elektrik-Elektronik Müh.
İzmir Demokrasi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
{emre0kayan, t.tarik855}@gmail.com

Sevgi Önal
Biyoteknoloji
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
İzmir, Türkiye
sevgonal1@gmail.com

Devrim P. Okvur ve Özden Y. Özuysal
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
İzmir, Türkiye
{devrimpesen, ozdenyalcin}@iyte.edu.tr

Behçet Uğur Töreşin
Biliřim Enstitüsü
İstanbul Teknik Üniversitesi
İstanbul, Türkiye
toreşin@itu.edu.tr

Devrim Ünay
Elektrik-Elektronik Müh.
İzmir Demokrasi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
unaydevrim@gmail.com

Özetçe —Hücrelerin morfolojisi, polaritesi ve hareketlerinin analizi kanser hücrelerinin metastatik ve invaziv özellikleri, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim gibi hücre biyolojisi araştırmaları için önemlidir. Hücrelerin canlı ortamlarında işaretlemesiz (label-free) görüntülenmelerine olanak sağlayan faz-kontrast optik mikroskopî görüntü serileri kullanılarak bu analizlerin otomatik hale getirilmesine ihtiyaç vardır. Bu hedefle çalışmamızda hücre hareketliliği deneyine ait bir görüntü serisi elle işaretlenmiş, işaretlenmiş veri kullanılarak hücrelerin hareket ve şekil analizlerini gerçekleştiren bir otomasyon algoritması geliştirilmiştir. Ayrıca, görüntü serilerinden hücrelerin otomatik bölütlenmesi için, işaretli veri sayısının az olması nedeniyle, U-Net temelli bir çözüm kurgulanmış ve performansı ölçülmüştür.

Anahtar Kelimeler—hücre hareketliliği, faz-kontrast optik mikroskopî, görüntü işleme, derin öğrenme.

Abstract—Analyses of morphology, polarity, and motility of cells is important for cell biology research such as metastatic and invasive capacity of cells, wound healing, and embryonic development. Automation of such analyses using image series of phase-contrast optical microscopy, which allows label-free imaging of live cells in their living environment, is a need. With this purpose, in this study image series of a cell motility experiment is manually annotated, and an automation algorithm realizing motion and shape analyses of cells using the annotated data is developed. In addition, due to the low number of annotated data at hand, a U-Net based solution is devised for automated segmentation of the cells and its performance is evaluated.

Keywords—cell motility, phase-contrast optical microscopy, image processing, deep learning.

978-1-7281-8073-1/20/ \$31.00 ©2020 IEEE

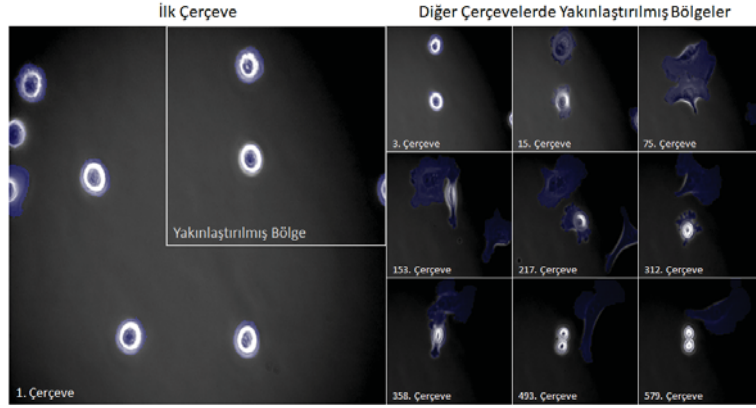
I. GİRİŞ

Hücre biyolojisi araştırmacıları embriyonik gelişim, yara kapanması, kanser hücrelerinin metastatik ve invaziv özellikleri gibi bilimsel sorulara cevap araşışlarında hücrelerin morfolojisi, polaritesi ve hareketine dair bilgilere ihtiyaç duymaktadırlar. Bu amaçla canlı hücrelerin incelenmesine olanak sağlayan floresan ve faz-kontrast gibi mikroskopik görüntüleme yöntemlerine başvurmaktadırlar.

Belirli bir süre boyunca belirli zaman aralıklarıyla mikroskopik görüntüleme yoluyla elde edilen görüntü serilerinin analizi - hücre sınırlarının her çerçevede elle işaretlenmesi - uzmanların ihtiyaç duyduğu ancak zaman alan ve yorucu bir işlemdir. Görüntü işleme yöntemleri bu işlemin hem otomatik hale getirilmesini ve hızlandırılmasını hem de elde edilecek sonuçların güvenilirliğinin artırılmasını sağlayabilir. Bu konuda literatürdeki görüntü işleme temelli çözümler faz kontrast optik mikroskopî görüntü serilerinde hücrelerin tespiti [1], sayılması [2], bölütlenmesi [3]–[6], sınıflanması [7] ve takibi [8] gibi farklı problemlere odaklanmıştır.

Biz bu çalışmada in-vitro modelde hücre hareketliliği deneyine ait faz-kontrast optik mikroskopî görüntü serilerinin analizine yoğunlaşmaktayız. Bu amaçla bir in-vitro hücre hareketliliği deneyine ait görüntü serisi iki farklı uzman tarafından elle işaretlenmiş, işaretlenmiş veri üzerinde analizler gerçekleştirilmiş ve işaretlemenin otomatik hale getirilmesi için derin öğrenme temelli bir çözüm önerilmiştir. Analiz aşamasında hücrelerin konum, dairesellik, yüzey alanı ve hızları gibi biyolojik olarak anlamlı niceliklerinin sayısallaştırılması hedeflenmiştir.

Hücrelerin otomatik bölütlenmesi (işaretleme) konusunda literatürde histogram [9], sınır/bölge (edge/region) [10], morfoloji [11], aktif çevrit (active contour) [11], [12], çizge



Şekil 1: Uzman elle işaretlemelerinin orijinal resimlere bindirilmiş hali. Solda ilk çerçeve ve yakınlaştırılmış bölge sınırı, sağda ise farklı çerçevelere ait yakınlaştırılmış bölge görselleri sunulmuştur.

ayırma (graph partitioning) [13], [14], seyrek matris ayrıştırma (sparse matrix decomposition) [4], klasik makine öğrenmesi ile sınıflandırma [3] ve derin öğrenme [5], [6] temelli çözümler mevcuttur.

Bu çalışmada önerilen derin öğrenme yönteminin farkı klasik U-Net mimarisindeki evrişim katmanlarının yerine ayrılabilir evrişim (separable convolution) katmanlarının kullanılması ve böylece bölütleme başarımından ödün vermeden hesaplama hızının artırılmasıdır.

Bildiri metni sırasıyla yöntem, deneysel sonuçlar ve varyantlar şeklinde organize edilmiştir.

II. YÖNTEM

A. Veri seti

Bu çalışmada İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü tarafından sağlanan bir faz-kontrast optik mikroskopi zaman serisi kullanılmıştır. Mezenkimal morfolojiye sahip invaziv meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231 hücre hattı) Olympus IX71 mikroskop ile ısıtıcı tabla üzerinde 37°C 'de 40X objektif ile 15 dakikada bir görüntülenmiş ve 2568×1912 piksel (1 piksel = $0.117\mu\text{m}$) boyutlu görüntüler elde edilmiştir.

B. Verilerin elle işaretlenmesi

Hücrelerin analizi ve model eğitiminde kullanılmak üzere, verinin ardışık olmayan 14 zaman noktasına ait görüntüsünde iki farklı uzman Supervisely web tabanlı işaretleme aracı kullanarak elle işaretleme yapmıştır. Hücre şekilleri kapalı formda (closed-form) olduğu için işaretlemede *poligon* seçeneği tercih edilmiştir. İşaretleme öncelikle uzmanlar tarafından birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirilmiş, görsel ve nicel karşılaştırmanın ardından tutarsızlık içeren işaretleme müzakere yoluyla revize edilmiş ve son haline getirilmiştir. Şekil 1 örnek bir elle işaretleme farklı çerçevelerin üzerine bindirilmiş halde gösterilmektedir.

C. İşaretli verilerin nicel analizi

Çalışmamızda öncelikle işaretlenmiş veriler kullanılarak hücre hareketliliğini sayısallaştırmak amacıyla çeşitli analizler

yapılmıştır. Bu hedefle işaretli hücrelerin alanları, dairesellik değerleri, konumları ve toplam katettikleri mesafeler hesaplanmış ve zamana bağlı olarak görselleştirilmiştir. Hücrenin bir zaman noktasındaki daireselliği hücrenin alanı (A) ve çevresi (P) cinsinden aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

$$\text{Dairesellik} = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (1)$$

Konum ve katedilen mesafe hesaplamaları hücrelerin geometrik merkezleri referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Hücrenin toplam katettiği mesafe ($|\Delta x|$) son zaman noktasındaki geometrik merkezi (x_{son}, y_{son}) ile ilk zaman noktasındaki geometrik merkezinin (x_{ilk}, y_{ilk}) arasındaki uzaklıktan faydalanarak aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

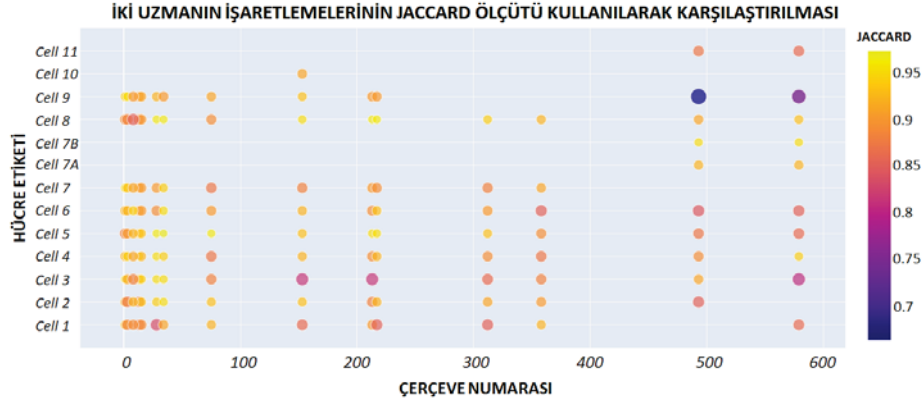
$$|\Delta x| = \sqrt{(x_{son} - x_{ilk})^2 + (y_{son} - y_{ilk})^2} \quad (2)$$

D. Otomatik hücre tespiti

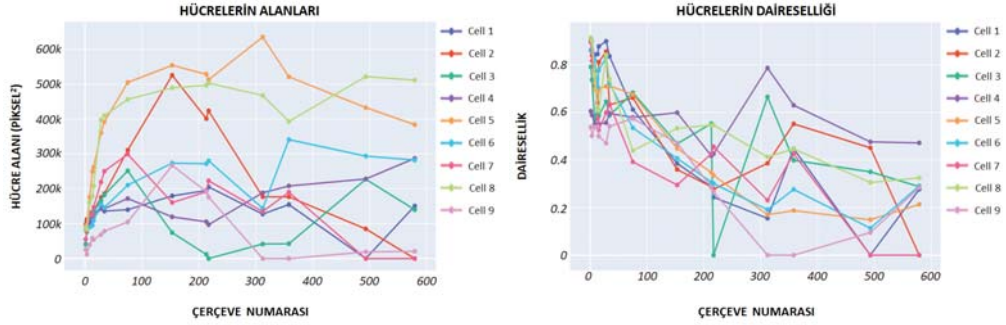
Bu çalışmada faz-kontrast optik mikroskopi zaman serisi görüntülerinde hücrelerin otomatik bölütlenmesi için, literatürdeki [5], [6] çalışmalarına benzer şekilde, az sayıda işaretli veri ile öğrenebilen U-Net [15] derin öğrenme modeli tercih edilmiştir. Çalışmamızdaki modelin diğerlerinden farkı klasik evrişim katmanları yerine ayrılabilir evrişim (separable convolution) katmanlarından oluşması ve böylece hesaplama karmaşıklığının azaltılmasıdır.

Model, her biri 3×3 boyutlu çekirdeğe sahip sırasıyla 32, 64, 128 ve 256 süzgeçten oluşmaktadır. Aktivasyon fonksiyonu olarak son katmanda sigmoid, diğerlerinde ReLU tercih edilmiştir. Modelin eğitimi için RMSprop eniyileştirici (optimizer), seyrek kategorik çapraz entropi (sparse categorical cross entropy) hata fonksiyonu, 0.001 başlangıç öğrenme hızı ve 50 maksimum devir (epoch) sayısı kullanılmıştır.

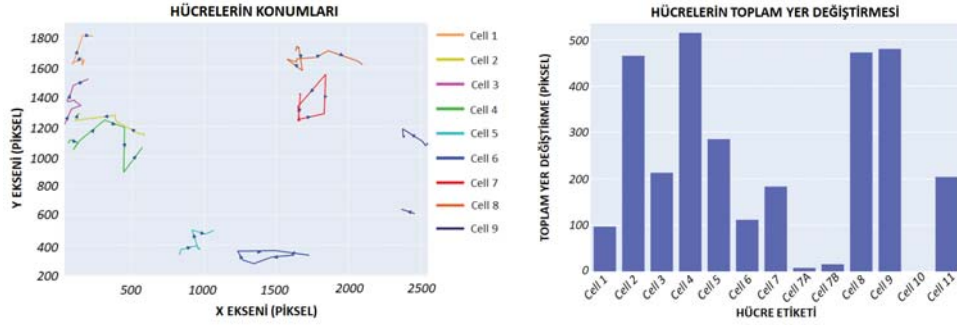
Eğitim aşamasında herhangi bir veri çoğaltma yönteminden faydalanılmamıştır. Modelin bölütleme performansının tarafsızlığını sağlamak amacıyla 14 adet elle işaretlenmiş çerçeve rastgele 7 alt-kümeye ayrılarak çapraz-doğrulama (cross-validation) uygulanmıştır.



Şekil 2: Uzman işaretlemelerinin karşılaştırılması. Yatay eksen çerçeve numarasını, dikey eksen hücre etiketini, resimdeki noktalar ise ilgili hücreye ait işaretlemelerin o çerçevede Jaccard ölçütü cinsinden örtüşme miktarını renk kodlu olarak sunmaktadır.



Şekil 3: İşaretli hücrelerin alan (sol) ve dairelilik değerlerinin değişimi.



Şekil 4: İşaretli hücrelerin zamana bağlı konumları (sol) ve toplam katettikleri mesafe.

E. Performans değerlendirme ölçütü

Hücre bölütleme yöntemlerinin başarımları Dice ve Jaccard benzerlik katsayıları kullanılarak ölçülmüştür.

$$Dice(X, Y) = \frac{2|X \cap Y|}{|X| + |Y|} \quad (3)$$

$$Jaccard(X, Y) = \frac{|X \cap Y|}{|X \cup Y|} \quad (4)$$

Bu denklemlerde X uzmanın elle işaretlediği Y ise yön-

temin tespit ettiği ikili bölütleme sonuçlarını gösterir. Her iki katsayı $[0, 1]$ aralığında değer alır ve iki sonuç arasındaki benzerlik (örtüşme) arttıkça 1'e yaklaşır.

III. DENEYSEL SONUÇLAR

A. İşaretlenmiş veri üzerinde gerçekleştirilen analiz sonuçları

Çalışmamızda ilk olarak elle işaretlenmiş veri üzerinde hücre hareketliliği analizine yönelik çeşitli ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu hedefle öncelikle uzman işaretlemelerinin tutarlılığı incelenmiştir. Şekil 2, iki uzmanın işaretlemelerinin benzerliklerini çerçeve numarası ve hücre seviyesinde renk

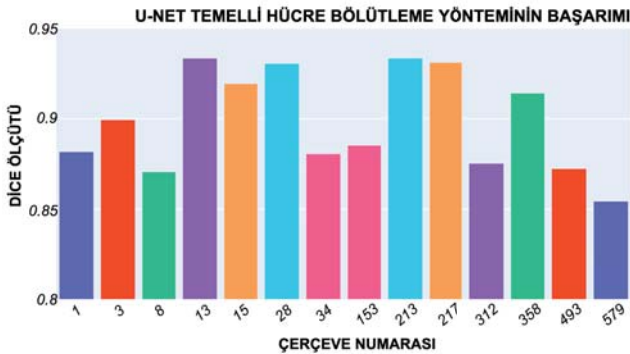
kodlu olarak sunar. Gözleendiği üzere benzerlikler genel olarak 0.85'in üzerindedir, dolayısıyla uzman işaretlemelerinin birbiriyle tutarlı olduğu anlaşılmıştır. Bu görselleştirme, görüntü alanına girip çıkan (örneğin Cell 1, Cell 9, Cell 10 ve Cell 11) ve mitoz bölünen (Cell 7) hücrelerin fark edilmesini de kolaylaştırmaktadır.

Uzmanların işaretlemelerinin birbiriyle tutarlı olduğu gözleminden yola çıkarak, takip eden analizlerde sadece bir uzmanın işaretlemeleri kullanılmıştır. Şekil 3, hücrelerin alan ve dairesellik değerlerindeki değişimi görselleştirmektedir. Grafiklerin karmaşıklığını azaltmak amacıyla görüntüleme alanına girip çıkan hücreler ile mitoz bölünen hücrenin bölünme sonrası kısmı hesaba katılmamıştır. Hücre alanlarında ilk anlarda artış görülmekle birlikte 100. çerçeveden itibaren sabit kalma, azalma ya da dalgalanma gibi farklı davranışlar görülmektedir. Dairesellik değerleri ise genel olarak logaritmik azalma gözlenmekle birlikte 200. çerçeveden itibaren dalgalanma artmaktadır.

Şekil 4, işaretli hücrelerin zamanla değişen konumlarını ve katettikleri toplam mesafeyi görselleştirmektedir. Hücreler hareketlerini ilk konumlarına yakın bir alanda tamamlamaktadır. Toplam katettikleri mesafe ise değişkendir. Tüm deney boyunca görünen ama kısa mesafe kateden hücreler olduğu gibi (örneğin Cell 3), sadece son çerçevelerde belirip görece çok yol alan hücreler de mevcuttur (örneğin Cell 11).

B. Otomatik hücre bölütleme yönteminin sonuçları

Hücrelerin otomatik bölütlenmesi için önerilen U-Net modelinin işaretlenmiş verideki başarımı çapraz doğrulama altkütmesine göre renklendirilmiş şekilde Dice katsayısı cinsinden sunulmuştur (Şekil 5). Çerçeve başına bölütleme başarımlarının 0.85'in üzerinde olduğu gözlenmektedir. Eğitim aşamasında kullanılacak işaretli veri sayısının artması halinde bölütleme başarımının daha da yükseleceği düşünülmektedir.



Şekil 5: U-Net temelli derin öğrenme modelinin çerçeve başına hücre bölütleme başarımı.

IV. VARGILAR

Bu çalışmada bir in-vitro hücre hareketliliği deneyine ait faz-kontrast optik mikroskopi görüntü serisi iki uzman tarafından elle işaretlenmiş ve bu işaretli veri kullanılarak uzmanların işaretlemeleri arasındaki uyum incelenmiş ve hücrelerin hareket ve şekil analizlerini otomatik gerçekleştiren bir yöntem geliştirilmiştir. Bunlara ek olarak görüntü serilerinden

hücrelerin otomatik bölütlenmesi için U-Net temelli bir yöntem önerilmiş ve performans analizi sunulmuştur.

Gelecek çalışmalarda sunulan yöntemlerin performanslarının farklı görüntü serilerinde ölçülmesi ve yöntemlerin iyileştirilmesi planlanmaktadır.

BİLGİLENDİRME

Bu çalışma kısmi olarak Tübitak 119E578 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

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.
- [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.
- [3] 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.
- [4] L. Zhang, "An Efficient Approach for Cell Segmentation in Phase Contrast Microscopy Images," *CoRR*, vol. abs/1904.0, 2019.
- [5] R. C. Binici, U. Şahin, A. Ayanzadeh, B. U. Töreyn, S. Önal, D. P. Okvur, Y. Özüysal, and D. Ünay, "Automated segmentation of cells in phase contrast optical microscopy time series images," in *2019 Medical Technologies Congress (TIPTEKNO)*, 2019, pp. 1–4.
- [6] A. Ayanzadeh, H. O. Yağar, Y. Özüysal, D. P. Okvur, B. U. Töreyn, D. Ünay, and S. Önal, "Cell segmentation of 2d phase-contrast microscopy images with deep learning method," in *2019 Medical Technologies Congress (TIPTEKNO)*, 2019, pp. 1–4.
- [7] D. Bhaskar, D. Lee, H. Knütsdöttir, C. Tan, M. Zhang, P. Dean, C. Roskelley, and L. Edelstein-Keshet, "A methodology for morphological feature extraction and unsupervised cell classification," *bioRxiv*, 2019.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] M. Ambühl, C. Brepsant, J.-J. Meister, A. Verkhovsky, and I. Szbalzani, "High-resolution cell outline segmentation and tracking from phase-contrast microscopy images," *Journal of Microscopy*, vol. 245, no. 2, pp. 161–170, feb 2012.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, "U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation," in *International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention*. Springer, 2015, pp. 234–241.