

Yara İyileşmesi Mikroskopi Görüntü Serilerinin Otomatik Analizi - Bir Ön-Çalışma Automated Analysis of Wound Healing Microscopy Image Series - A Preliminary Study

Berkay Mayalı ve Orkun Şaylığ
Elektrik-Elektronik Mühendisliği
İzmir Demokrasi Üniversitesi
İzmir, Türkiye
m.berkayqq17@gmail.com
orkunsaylig@hotmail.com

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

Behçet Uğur Töreyn
Bilişim Enstitüsü
İstanbul Teknik Üniversitesi
İstanbul, Türkiye
toreyn@itu.edu.tr

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

Özetçe —Mikroskopi görüntü serilerinden hücrelerin kolektif analizinin gerçekleştirilmesi yara iyileşmesi araştırmaları için önemlidir. Bu analizlerin bilgisayar yardımıyla otomatik hale getirilmesi sonuçların güvenilir, tekrarlanabilir ve hızlı şekilde elde edilmesini sağlayabilir. Bu çalışmada bir in-vitro yara iyileşmesi deneyine ait faz-kontrast optik mikroskopi görüntü serisi iki farklı uzman tarafından elle işaretlenmiş ve analizi gerçekleştirilmiş, görüntü serisinden yara bölgesinin otomatik tespiti için geleneksel görüntü işleme ve derin öğrenme temelli yöntemler geliştirilmiş ve performansları karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler—Yara iyileşmesi, faz-kontrast optik mikroskopi, görüntü işleme, derin öğrenme.

Abstract—Collective cell analysis from microscopy image series is important for wound healing research. Computer-based automation of such analyses may help in rapid acquisition of reliable and reproducible results. In this study phase-contrast optical microscopy image series of an in-vitro wound healing essay is manually delineated by two experts and its analysis is realized, traditional image processing and deep learning based approaches for automated segmentation of wound area are developed and their performance comparisons are carried out.

Keywords—Wound healing, phase-contrast optical microscopy, image processing, deep learning.

I. GİRİŞ

Hücre hareketleri, kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik kapasitelerini belirlemede önemli özelliklerden biridir. Floresan veya faz-kontrast mikroskopi yardımıyla hücrelerin yaşadıkları ortamlarında belli bir süre boyunca gözlenmesi (örneğin in-vitro yara iyileşmesi deneylerindeki gibi [1]) morfolojilerinin ve davranışlarının dinamik olarak analiz edilme-

sine, kanser hücrelerinin özelinde de invaziv ve metastatik kapasitelerinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır [2].

Floresan mikroskopi hücrelerin ışına yapan bir molekülle işaretlenmesine dayalıdır, ancak bu işaretleme sebebiyle hücreler toksik etkiye maruz kalabilir ve sinyalin zamanla azalması nedeniyle deney süresi kısıtlıdır. Bu sebeple işaretlemsiz (label-free) görüntüleme yöntemi olan faz-kontrast optik mikroskopi tercih edilmektedir [3], [4].

Stamm ve arkadaşları, in-vitro model kullanılarak yara iyileşmesi deneyleri konusundaki gelişmeleri özetleyen çalışmalarında [5], yara yüzeylerinin elle işaretlenmesinin uzun ve yorucu olduğunu dolayısıyla görüntü işleme temelli otomatik analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir. Bu konuda literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır.

İlk çalışmalardan birisi floresan mikroskopi yara iyileşmesi verilerinin analizi için ayrık curvelet dönüşümü temelli bir çözüm önermiştir [6]. Ancak yöntemin başarısı kullanıcının eşikleme değerleri gibi parametreleri doğru belirlemesine bağlıdır. Bir ImageJ/FIJI eklentisi olarak sunulan White Wave yöntemi görüntülerin birbirinden çıkarılmasına dayalı basit bir tespit yaklaşımı önermektedir [7]. PyScratch, görüntülere Laplace ve Gauss süzgeçlemenin ardından eşikleme uygulayarak yara bölgesini tespit eden, python dilinde kodlandığı için hızlı çalışan bir çözümdür [8]. Son olarak, Suarez-Arnedo ve arkadaşları yara bölgesinin tespiti için kontrast iyileştirme, varyans temelli süzgeçleme ve eşikleme uygulayan yöntemi ImageJ/FIJI eklentisi olarak önermişlerdir [9].

Bu ön-çalışmada bir in-vitro yara iyileşmesi deneyine ait faz-kontrast optik mikroskopi zaman serisi görüntülerinin analizi için 1) verinin elle işaretlenmesi ve bu işaretli veri kullanılarak yara iyileşmesi hakkında sayısal bilgi çıkarılması, 2) yara bölgesinin otomatik tespiti için geleneksel görüntü işleme

ve derin öğrenme temelli 4 farklı yöntemin geliştirilmesi ve performanslarının analizi gerçekleştirilmiştir.

II. YÖNTEM

A. Veri seti

Çalışmada kullanılan faz-kontrast optik mikroskopi verisi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden alınmıştır. Epitel morfolojide invaziv olmayan meme kanseri hücre hattı MCF7 hücreleri 6 kuyucuklu petri kaplarına ekildikten sonra 24 saat yapışmaları beklenmiştir. Görüntüleme başlamadan hemen önce sarı tip ucuyla yüzey bir çizgi halinde kazınarak yara oluşturulmuştur. Görüntüleme için 6 kuyucuklu petri kapları Leica SP8 mikroskop sisteminin 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ sağlayan inkübasyon odasına yerleştirilmiş ve belirlenen bölgelerden 48 saat boyunca her 60 dakikada bir 10x objektif ile faz-kontrast görüntü alınmıştır. Elde edilen görüntüler 1920×1440 piksel çözünürlüğe sahiptir.

B. Verilerin elle işaretlenmesi

Elle işaretleme, bilgisayarla görü verilerinin işaretlenmesi ve analizi için ücretsiz olarak sunulan Supervisely adlı araç kullanılarak iki farklı uzman tarafından gerçekleştirilmiştir. İşaretleme için her 3 kareden biri seçilmiştir. Seçilen kareler bu araç üzerinde *polyline* işaretleme yöntemi kullanılarak, yara yüzeyleri ayrıntılı olacak ve yaranın her iki tarafındaki hücreleri kapsayacak şekilde işaretlenmiştir.

C. İşaretli verilerin nicel analizi

Çalışmamızda öncelikle işaretlenmiş veri kullanılarak yara iyileşmesini sayısallaştırmak amacıyla çeşitli analizler yapılmıştır. Bu hedefle her çerçevede işaretli yara yüzeyleri arasındaki uzaklık dikey yönde eşit aralıklarla ölçülmüş ve yara genişliğinin ortalama ve standart sapma değerleri tespit edilmiştir. Çalışmada aralık olarak 10 piksel tercih edilmiştir.

Ayrıca yara yüzeylerinin eğrilik (curvature, K) değerleri aşağıdaki denkleme göre hesaplanmış, ortalama ve standart sapma olarak raporlanmıştır.

$$K = \frac{|x'y'' - y'x''|}{\left((x')^2 + (y')^2\right)^{\frac{3}{2}}} \quad (1)$$

Bu denklemde yara yüzeyleri $x = x(t)$ ve $y = y(t)$ ifadeleri ile parametrik olarak tanımlanmıştır.

D. Otomatik yara bölütlemesi

Bu çalışmada faz-kontrast optik mikroskopi zaman serisi görüntülerinden yara bölgesinin otomatik bölütlenmesi için geleneksel görüntü işleme ve derin öğrenme temelli yöntemler geliştirilmiştir (Şekil 1). Önerdiğimiz geleneksel yöntemler kontrast iyileştirme, eşikleme, süzgeçleme ve morfolojik işlem uygulayan (Algorithm-1), eşikleme, morfolojik ve kontur işlemleri uygulayan (Algorithm-2) ve eşikleme, morfolojik işlem ve bağlantılı bileşen etiketleme uygulayan (Algorithm-3) olarak özetlenebilir.

Derin öğrenme temelli çözüm her biri 3×3 boyutlu çekirdeğe sahip sırasıyla 32, 64, 128 ve 256 süzgeçten oluşan U-Net [10] modelini temel almaktadır. Aktivasyon fonksiyonu olarak son katmanda sigmoid, diğerlerinde ReLU tercih edilmiştir. Modelin eğitimi için Adam eniyileştirici (optimizer), ikili çapraz entropi (binary cross entropy) hata fonksiyonu, 0.001 başlangıç öğrenme hızı ve 280 maksimum devir (epoch) sayısı kullanılmıştır. Eğitim aşamasında veriyi çoğaltmak için 90deg döndürme işlemi uygulanmıştır. Modelin yara tespit performansının tarafsızlığını sağlamak amacıyla işaretlenmiş çerçeveler rastgele 5 alt-kümeye ayrılarak çapraz-doğrulama (cross-validation) gerçekleştirilmiştir.

Bunlara ek olarak yara iyileşmesi analizi için literatürde önerilmiş süzgeçleme ve eşikleme temelli geleneksel çözüm içeren PyScratch [8] yöntemi de verimizde koşturulmuş ve sonuçları karşılaştırmaya dahil edilmiştir.

E. Performans değerlendirme ölçütü

Yara bölütlemesi için önerilen yöntemlerin performansı, gerçek ve tahmin edilen bölgeler arasındaki örtüşmeyi hesaplayan Dice katsayısı ile ölçülmüştür.

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

Bu denklemde X elle işaretlenen bölgeyi Y ise yöntemin tespit ettiği bölgeyi belirtir.

III. DENEYSSEL SONUÇLAR

A. İşaretlenmiş veri üzerinde gerçekleştirilen analiz sonuçları

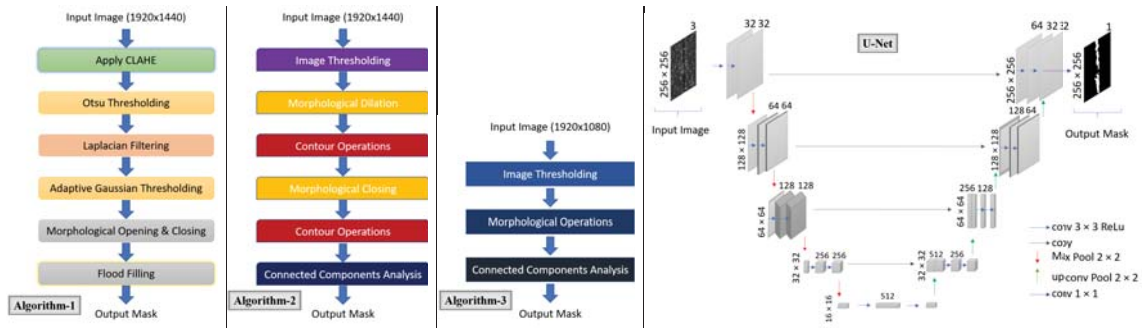
Çalışmamızda ilk olarak elle işaretlenmiş veri üzerinde yara iyileşmesi analizi için çeşitli ölçümler gerçekleştirilmiştir. Şekil 2 verinin her çerçevesindeki yara genişliğinin ortalama ve standart sapma değerlerini görselleştirmektedir. Ortalama yara genişliğinde zamana bağlı olarak üstel azalma ve 7. ile 22. çerçeveler arasında standart sapma değerlerinde artış gözlenmektedir.

Şekil 3 verinin her çerçevesindeki işaretlenmiş sağ ve sol yara yüzeylerine ait eğrilik değerlerini ortalama ve standart sapma cinsinden gösterir. Gözlendiği üzere yara yüzeyleri ilk andan yani iyileşmenin başından (ya da yüzeylerin ilk hareketinden) itibaren yüksek eğriliğe sahiptir.

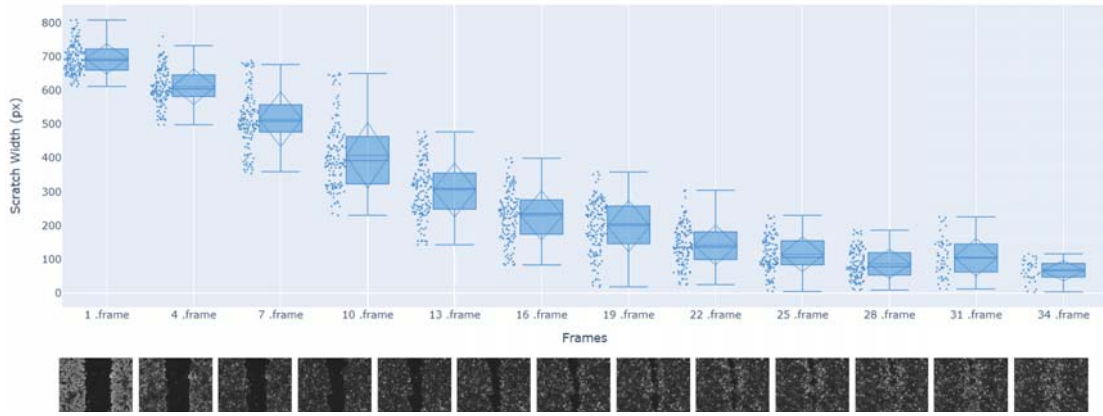
B. Otomatik yara tespiti yöntemlerinin sonuçları

Otomatik yara tespiti için geliştirdiğimiz geleneksel yöntemler ile U-Net temelli çözümün görsel sonuçlarını elle işaretleme ve literatürdeki referans yöntem olarak aldığımız PyScratch sonuçları ile nitel ve nicel olarak karşılaştırdık. Şekil 4'te sunulan Dice ölçütü sonuçlarına göre tüm yöntemler ilk çerçevelerde yara bölgesini başarılı şekilde tespit etmekte, ancak özellikle 22. çerçeveden itibaren tespit başarımlarında belirgin düşüş gözlenmektedir. U-Net temelli yöntem diğerlerine göre daha doğru bölütleme sonucu vermektedir.

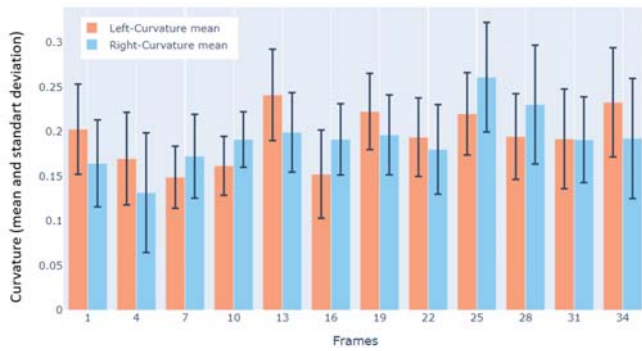
Yöntemlerin yara bölgesini bölütlemeye en çok zorlandıkları (Dice ölçütü değerlerinin en düşük olduğu) iki çerçeve için görsel sonuçlar Şekil 5'de sunulmuştur. Hem referans yöntem olan PyScratch hem de geleneksel yöntemlerin bölütleme



Şekil 1: Otomatik yara tespiti için geliştirilen geleneksel ve U-Net temelli yöntemlerin mimarileri.



Şekil 2: İşaretli veri üzerinde yara genişliği analizi.



Şekil 3: İşaretli veri üzerinde yara yüzeyi eğrilik analizi.

sonuçları hatalı iken U-Net temelli yöntem elle işaretlemeye oldukça benzer sonuçlara ulaşmaktadır.

Otomatik yara tespiti için geliştirdiğimiz yöntemlerin hesaplama sürelerini orijinal boyuttaki (1920 × 1440 piksel) veriyi kullanarak 2.30GHz Intel Xeon CPU'lu ve 12GB RAM'li bir bilgisayarda ölçtük (Şekil 6). U-Net temelli yöntemin Nvidia Tesla T4 GPU üzerinde çalıştırıldığındaki hızının - PyScratch ve iki geleneksel yöntem ile birlikte - yüksek olduğunu, diğer geleneksel yöntemin hızının ise morfolojik boşluk doldurma adımına bağlı olarak düşük kaldığını gözlemledik.

IV. VARGILAR

Bu çalışmada bir in-vitro yara iyileşmesi deneyine ait faz-kontrast optik mikroskopi görüntü serisi elle işaretlenmiş ve bu işaretli veri kullanılarak yara iyileşmesi analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, görüntü serisinden yara bölgesinin otomatik tespiti için geleneksel görüntü işleme ve derin öğrenme temelli yöntemler önerilmiş ve bu yöntemlerin performansları karşılaştırılmıştır. U-Net temelli yöntemin tespit doğruluğu ve hız bakımından umut verdiği gözlenmiştir.

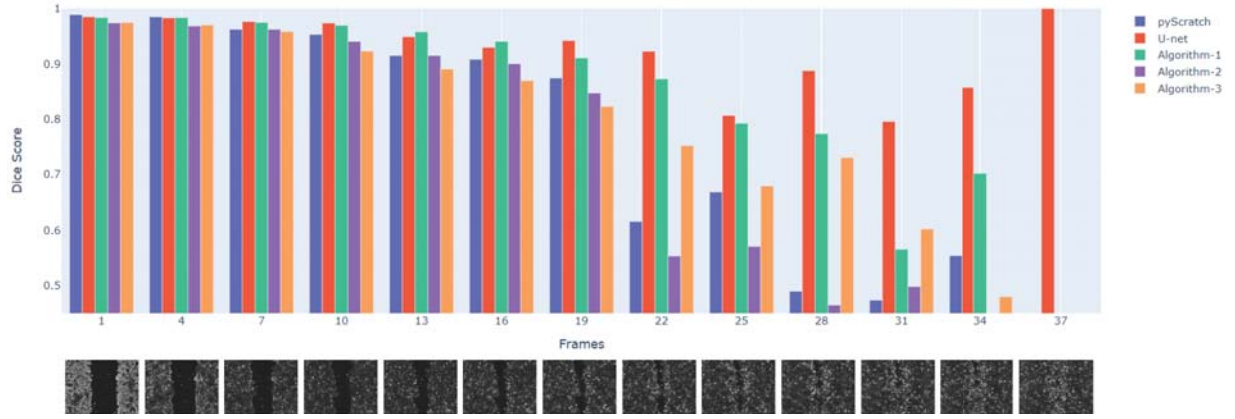
Gelecek çalışmalarda önerilen yöntemlerin performanslarının daha geniş veri kümelerinde ölçülmesi ve performans iyileştirmelerinin yapılması planlanmaktadır.

BİLGİLENDİRME

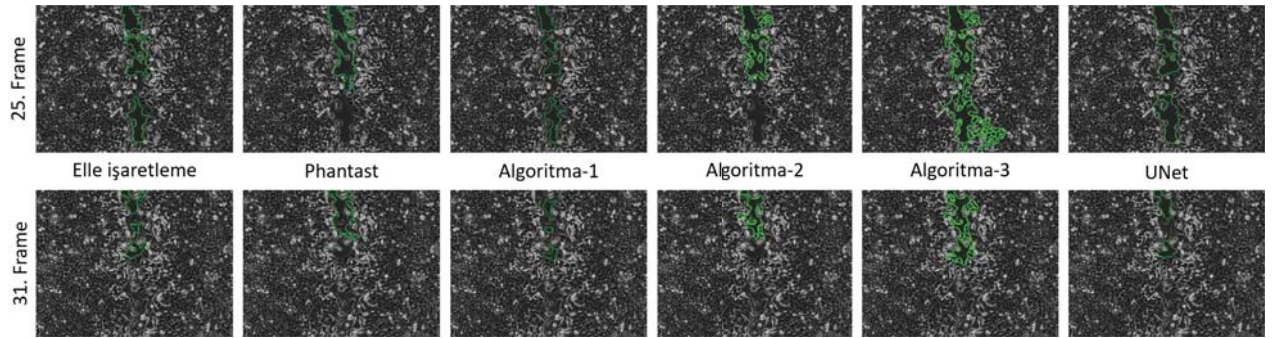
Bu bildiriye ilişkin çalışmalar kısmi olarak Tübitak 119E578 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

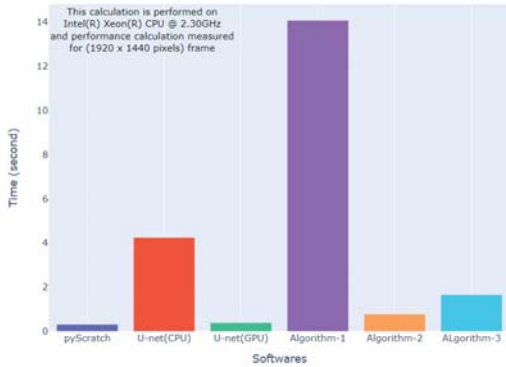
- [1] J. E. N. Jonkman, J. A. Cathcart, F. Xu, M. E. Bartolini, J. E. Amon, K. M. Stevens, and P. Colarusso, "An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy," *Cell Adhesion & Migration*, vol. 8, no. 5, pp. 440–451, 2014, pMID: 25482647. [Online]. Available: <https://doi.org/10.4161/cam.36224>
- [2] P. Friedl and D. Gilmour, "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 10, no. 7, pp. 445–457, 2009.



Şekil 4: Yöntemlerin her çerçeveye ait başarımları.



Şekil 5: 25. ve 31. çerçevelere ait elle işaretleme ve yöntemlerin görsel sonuçları. Bölütleme sınırları orijinal resimlere yeşil renkli olarak bindirilmiştir.



Şekil 6: Yöntemlerin saniye cinsinden yara tespiti hesaplama süreleri.

- This calculation is performed on Intel(R) Xeon(R) CPU @ 2.30GHz and performance calculation measured for (1920 x 1440 pixels) frame
- [3] J. M. Hillger, W.-L. Lieu, L. H. Heitman, and A. P. IJzerman, "Label-free technology and patient cells: from early drug development to precision medicine," *Drug Discovery Today*, vol. 22, no. 12, pp. 1808–1815, 2017.
- [4] B. Xi, N. Yu, X. Wang, X. Xu, and Y. Abassi, "The application of cell-based label-free technology in drug discovery," *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, vol. 3, no. 4, pp. 484–495, 2008.
- [5] A. Stamm, K. Reimers, S. Strauß, P. Vogt, T. Scheper, and I. Pepelanova, "In vitro wound healing assays – state of the art," *BioNanoMaterials*, vol. 17, no. 1-2, pp. 79 – 87, 01 May. 2016. [Online]. Available: <https://www.degruyter.com/view/journals/bioma/17/1-2/article-p79.xml>
- [6] T. Gebäck, M. M. P. Schulz, P. Koumoutsakos, and M. Detmar, "Tscratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays," *BioTechniques*, vol. 46, no. 4, pp. 265–274, 2009, pMID: 19450233. [Online]. Available: <https://doi.org/10.2144/000113083>
- [7] Y. Matsubayashi, W. Razzell, and P. Martin, "'white wave' analysis of epithelial scratch wound healing reveals how cells mobilise back from the leading edge in a myosin-ii-dependent fashion," *Journal of Cell Science*, vol. 124, no. 7, pp. 1017–1021, 2011. [Online]. Available: <https://jcs.biologists.org/content/124/7/1017>
- [8] F. Garcia-Fossa, V. Gaal, and M. B. de Jesus, "Pyscratch: An ease of use tool for analysis of scratch assays," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 193, p. 105476, 2020. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169260719313914>
- [9] A. Suarez-Arnedo, F. T. Figueroa, C. Clavijo, P. Arbeláez, J. C. Cruz, and C. Muñoz-Camargo, "An image j plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays," *bioRxiv*, 2020. [Online]. Available: <https://www.biorxiv.org/content/early/2020/04/20/2020.04.20.050831>
- [10] 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.