

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Mindaugas
MORKŪNAS

Naviko mikroaplinkai pritaikytų
pilno kadro vaizdo segmentavimo ir
klasifikavimo skaitmeninės
patologijos metodų kūrimas

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Technologijos mokslai
Informatikos inžinerija (T 007)

VILNIUS 2021

Disertacija rengta 2016–2020 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

doc. dr. Povilas Treigys (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, informatikos inžinerija – T 007).

Mokslinis konsultantas:

prof. dr. Arvydas Laurinavičius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. dr. Julius Žilinskas** (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, informatikos inžinerija – T 007).

Nariai:

prof. habil. dr. Romualdas Baušys (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, technologijos mokslai, informatikos inžinerija – T 007),

dr. Justinas Besusparis (Valstybinis patologijos centras, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Algimantas Kriščiukaitis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011),

prof. dr. Audris Mockus (Tenesio universitetas, JAV, technologijos mokslai, informatikos inžinerija – T 007).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2021 m. rugsėjo mėn. 15 d. 12 val. Vilniaus universiteto Duomenų mokslo ir skaitmeninių technologijų instituto 203 auditorijoje.

Adresas: Akademijos g. 4, LT-04812 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2021 m. rugpjūčio 13 d. Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendarius>

VILNIUS UNIVERSITY

Mindaugas
MORKŪNAS

Development of Tumor Microenvironment-Oriented Digital Pathology Methods for Whole Slide Image Segmentation and Classification

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Technological Sciences
Informatics Engineering (T 007)

VILNIUS 2021

This dissertation was written between 2016 and 2020 at Vilnius University.

Academic supervisor:

Assoc. Prof. Dr. Povilas Treigys (Vilnius University, Technological Sciences, Informatics Engineering – T 007).

Academic consultant:

Prof. Dr. Arvydas Laurinavičius (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Julius Žilinskas (Vilnius University, Technological Sciences, Informatics Engineering – T 007).

Members:

Prof. Habil. Dr. Romualdas Baušys (Vilnius Gediminas Technical University, Technological Sciences, Informatics Engineering – T 007),

Dr. Justinas Besusparis (National Center of Pathology, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Algimantas Kriščiukaitis (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biophysics – N 011),

Prof. Dr. Audris Mockus (The University of Tennessee, USA, Technological Sciences, Informatics Engineering – T 007).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 12 p.m. on 15th of September 2021 in Room 203 of the Institute of Data Science and Digital Technologies of Vilnius University. Address: Akademijos str. 4, LT-04812, Vilnius, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 13th of August 2021. The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

I. SANTRAUKA	6
1. ĮVADAS	6
1.1. Tyrimo kontekstas	7
1.2. Tyrimo aktualumas	10
1.3. Tyrimo objektas	12
1.4. Tyrimo tikslas ir uždaviniai	13
1.5. Bioetika.....	13
1.6. Mokslinis naujumas	14
1.7. Ginamieji teiginiai	15
2. SKAITMENINĖS PATOLOGIJOS METODŲ APŽVALGA	16
3. NAVIKŲ EPITELIO-STROMOS AUDINIŲ KLASIFIKAVIMO METODŲ ANALIZĖ	21
4. LAŠTELIŲ BRANDUOLIŲ SEGMENTAVIMO IR LIMFOCITŲ IDENTIFIKAVIMO METODAS.....	28
5. KOLAGENO STRUKTŪRŲ SEGMENTAVIMAS.....	35
6. KELIŲ KLASIŲ HISTOPATOLOGIJOS OBJEKTŲ SEGMENTAVIMAS NAVIKŲ KLASIFIKAVIMUI.....	44
7. BENDROSIOS IŠVADOS	54
II. SUMMARY	57
1. Research Context	57
2. Relevance of the Research.....	58
3. Object of the Dissertation	61
4. Aim and Tasks of the Dissertation.....	61
5. Bioethics	62
6. Scientific Novelty of the Research	62
7. Defended Statements	63
8. General Conclusions	64
LITERATŪROS SĄRAŠAS	68
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	85

I. SANTRAUKA

1. ĮVADAS

Siekiant didesnės naudos onkologiniams pacientams sukurti diagnostiniai ir skaitmeniniai patologijos metodai, daug dėmesio skiriantys naujiems tyrimo taikiniams. Vienas iš tokių taikinių yra naviko mikroaplinka. Ryškėjanti naviko mikroaplinkos svarba vėžio biologijoje lemia akivaizdų vėžio gydymo ir tyrimų posūkį nuo naviko ląstelėms pritaikyto link naviko mikroaplinkai pritaikyto modelio. Tačiau nuo kompiuterinės regos priklausomi skaitmeninės patologijos metodai vis dar yra stipriai orientuoti į naviko ląsteles ir iš esmės ignoruoja naviko mikroaplinką. Šiame darbe užsibrėžtas tikslas ištirti ir pasiūlyti naujus histopatologijos vaizdo segmentavimo ir klasifikavimo metodus, skirtus su naviko mikroaplinka susijusiems histologiniams audinių komponentams. Pirma, konvoliuciniai neuroniniai tinklai identifikuoti kaip pažangiausių metodų, pakankamai pajėgių daugeliui histologinių objektų segmentuoti, grupė. Tada limfocitams segmentuoti ir identifikuoti pritaikytas ir išplėstas esamas naviko ląstelių segmentavimo metodas. Toliau skaidulinis kolagenas identifikuotas kaip naujas iš naviko mikroaplinkos atsirandantis taikiny, kurį galima segmentuoti naviko audinių šviesinės mikroskopijos vaizduose. Kolageno skaidulų segmentavimo užduočiai spręsti sukurtas visiškai konvoliucinis neuroninių tinklų metodas. Galiausiai pasiūlytas integruotas metodas, sujungiantis ankstesniuose eksperimentuose įgytas žinias ir leidžiantis segmentuoti limfocitų, naviko ląstelių, stromos ląstelių branduolius, kolageno skaidulas ir pagrindinius audinių tipus. Be to, vaizdo požymių inžinerijos būdu įvestas patologijos pilno kadro vaizdo transformavimas, pritaikytas nuspėti krūties vėžiu sergančių pacientų terapinio biožymens būseną. Siūlomi metodai išbandyti eksperimentais, naudojant tiek privačius, tiek viešus anotuotų histologinių vaizdų duomenų rinkinius bei tarptautinio iššūkio varžybose. Siūlomi metodai buvo sulyginami su susijusiais

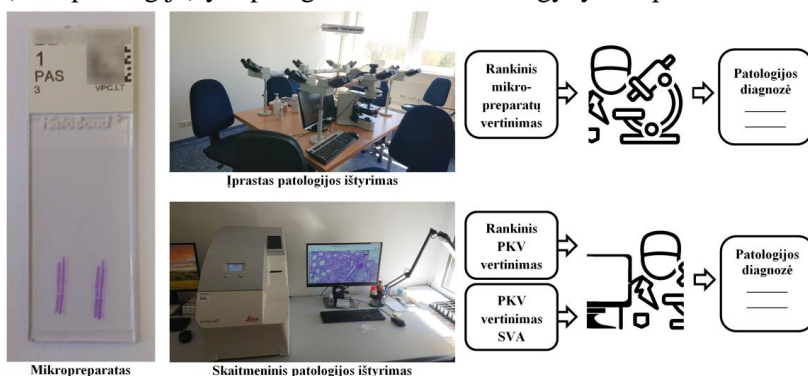
pažangiausiais metodais, tuo pat metu suteikdami papildomų specialių funkcionalumų.

1.1. Tyrimo kontekstas

Žmonijai gyvenant duomenų amžiuje, didelė mūsų kasdienės veiklos dalis yra fiksuojama skaitmeniškai ir analizuojama. Didžiulis skaitmeninės informacijos kiekis gaunamas vaizdo duomenų pavidalu klinikinėje aplinkoje, naudojant tokias nusistovėjusias medicininio vaizdinimo technologijas kaip rentgeno spinduliai, magnetinio rezonanso tomografija (MRT), kompiuterinė tomografija (KT), ultragarsas ir daugelis kitų. Skaitmeninė vaizdų analizė (SVA) naudojama vaizduose esančiai prasmingai informacijai gauti. Pritaikyta medicininiam vaizdams, SVA informuoja apie gydymo sprendimus ir tiesiogiai veikia paciento gyvenimą. Todėl SVA algoritmai, ypač pagrįsti mašininio mokymusi (MM) ir naudojami konkreitiems medicininiam tikslams, kvalifikuojami kaip medicinos ar diagnostikos prietaisai ir jų naudojimas turi būti įteisintas. Visame pasaulyje yra šimtai SVA paremtų medicinos prietaisų, skirtų klinikiniam naudojimui. Automatinis organų (smegenų, plaučių, krūties, prostatos, širdies ir kraujagyslių sistemos, skydliaukės) struktūrų žymėjimas, vizualizavimas ir kiekybinis įvertinimas, anomalijų dokumentavimas, naviko kontūravimas terapijos planavimui iš KT, rentgeno ar MRT vaizdų, tinklainės ligų diagnostika iš oftalmologinių vaizdų, atliekami naudojant SVA.

Šiame kontekste vėžio patologijos diagnozės dažnai remiasi vizualinės informacijos, esančios chirurginiu būdu pašalintų naviko audinių mikroskopinėje anatomijoje (histologijoje), analize. Laboratorijoje apdoroti audinių mėginiai dedami ant mikroskopinių stiklelių ir įprastai dažomi hematoksilino ir eozino (HE) dažais, kad būtų išryškintos permatomos audinio dalys [1]. Galimi alternatyvūs dažymo būdai, kurie paprastai vadinami specialiaisiais dažymo būdais. Nudažyti preparatai gydytojo patologo ištiriami optiniu mikroskopu (žr. 1.1 pav.). Diferencine navikų diagnostika siekiama

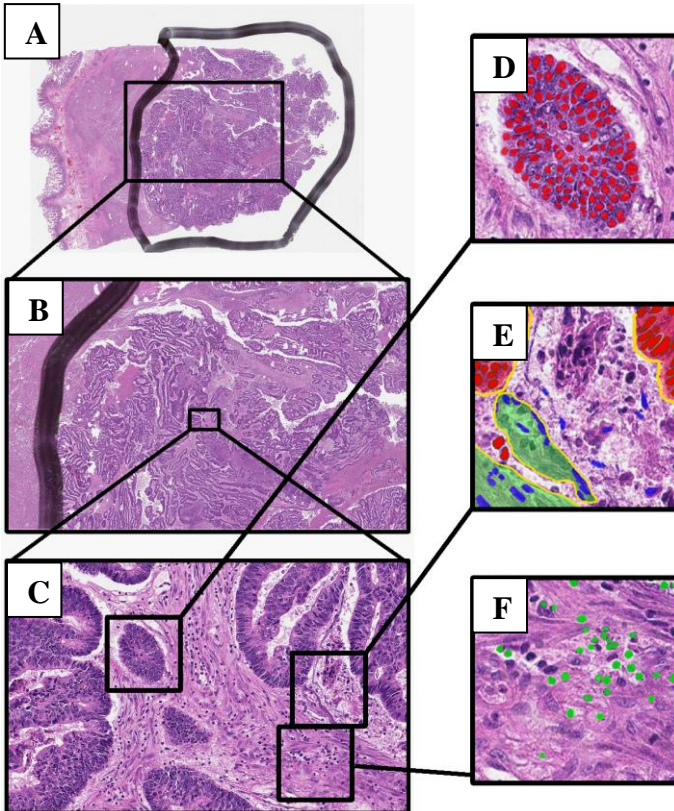
suskirstyti piktybinius navikus į kliniškai paveikias kategorijas. Tokiu būdu patologijos diagnozė leidžia klasifikuoti pacientą ir kitos klinikinės informacijos kontekste priimti sprendimus dėl tolesnio paciento gydymo ir prognozės. Norėdamas nustatyti diagnozę, gydytojas patologas turi atsižvelgti į daugelį biologinių patologijos veiksnių, kurie įprastai pateikiami kaip rankinio ar skaitmeninio vertinimo rezultatai, pvz., kokybinis ar kiekybinis auglio audinio komponentų dydžio, formos ir tankio įvertinimas. Objektyvus, tikslus ir standartizuotas mikroskopinių ligos apraiškų fenotipavimas (histopatologija) yra patogi sistema, lemianti gydymo sprendimus.



1.1 pav. Audinių mėginių histologinė analizė. Patologijos diagnozei nustatyti gydytojas patologas gali rinktis įprastą būdą – preparatų vertinimą optiniu mikroskopu, arba skaitmeninį būdą – PKV vertinimą rankiniu būdu (naudojant arba nenaudojant patologijos SVA).

Specializuota įranga (didelio pajėgumo didelės skiriamosios gebos šviesaus lauko mikroskopijos skeneriai) gali skaitmeninti mikropreparatus į pilno kadro vaizdus (PKV). SVA pagrįstas patologijos vertinimas pradamas nuo audinio mėginio vaizdo taško lygio duomenų ir plečiamas iki objekto lygio duomenų, sujungdamas panašius vaizdo taškus į biologiškai reikšmingus ir atpažįstamus audinių komponentus (žr. 1.2 pav.). Galiausiai objekto lygmens rezultatais pagrindžiamas sprendimų priėmimas paciento lygmeniu

(prognozuojant ligos pasikartojimo tikimybę, jautrumą gydymo būdai ar net genetinę būklę).



1.2 pav. HE dažyto storosios žarnos vėžio audinio PKV. (A) matomas mėginys yra maždaug 2 cm pločio ir 1,3 cm aukščio. PKV nuskaitytas standartine $0,5 \mu\text{m}$ vaizdo taškui raiška ir gautas galutinis 41832×32763 taškų dydžio vaizdas. (B ir C) mažo padidinimo PKV iškarpos. (D, E ir F) didelio padidinimo PKV iškarpos, rodančios audinių objektus, aptiktus SVA metodais, sukurtais šiame darbe. (D) naviko ląstelių branduoliai, (E) raudonai išryškinti naviko audinys ir branduoliai, žaliai – stromos audinys, mėlynai – stromos ląstelių branduoliai, likęs negyvas naviko audinys – nekrozė, (F) žaliai išryškinti limfocitai.

Skaitmeninė histopatologija siūlo greitesnių ir tikslesnių analitinių metodų, apsaugo nuo žinomų vizualių šališkumo šaltinių (optinės dydžio, spalvos, atspalvio ir šešėlio iliuzijos, netyčinio aklumo). Nuo 2014 m. Europoje su „Conformité Européenne“ (CE) ženklų parduodami PKV skaneriai, o 2016 m. PKV technologija patvirtinta taikymui diagnostikoje JAV. Europoje keli MM pagrindu sukurti patologijos SVA algoritmai jau žymimi CE ženklu, tačiau JAV iki šiol dar nėra įteisintų jokių MM parentų patologijos SVA medicinos prietaisų.

1.2. Tyrimo aktualumas

Išplėstinė ir išsami solidinių navikų analizė naudinga vėžiu sergantiems pacientams. Navikų profiliavimas pagal DNR, RNR ir baltymų biožymenis užtikrina individualizuoto onkologinio gydymo sprendimus [2]. Taikinių terapija yra ypač svarbi tiksliai parinktomis pacientų grupėms, todėl gydytojai patologai naudoja patikrintus metodus navikų histologijai analizuoti optiniu mikroskopu ir geba atrinkti terapijai jautrių pacientų grupes.

Diagnostinė patologija daugiausia orientuota į naviko ląsteles. Naviko ląstelių genetika paaiškina daugelį vėžio vystymosi aspektų, tačiau progresuojantis navikas artimai sąveikauja su paciento kūnu (šeimininku). Naviko mikroaplinka (NMA) gali būti suprantama kaip šios sąveikos sąsaja (artimiausia navikui mikroskopinė aplinka) kartu su šeimininko organų ir kraujagyslių vidinio ir išorinio paviršiaus ląstelėmis, jungiamojo, raumeninio ir riebalinio audinių ląstelėmis, nervų skaidulomis, imuninės kilmės ląstelėmis ir tarpląsteliniu matriksu (ECM). NMA tapo ypatinga onkologijos tema todėl, kad vis labiau suprantame jos funkciją ir vaidmenį vystantis navikams. Neabejotina, kad NMA vertinimas gali suteikti kritinės terapinės informacijos, ypač kai kalbama apie neaiškios histologijos navikus. Naujausi tyrimai atskleidžia NMA kaip individualizuotos priešvėžinės terapijos taikinį.

Visgi skaitmeninė patologija, netgi labiau nei diagnostinė patologija, yra orientuota į naviko ląsteles ir iš esmės ignoruoja NMA. Nors yra daugybė SVA metodų naviko ląstelėms aptikti, segmentuoti ir klasifikuoti, metodai, pritaikyti NMA ląstelėms, yra nepakankamai ištirti. Pavyzdžiui, į navikus įsiskverbiančios imuninės ląstelės (ypač limfocitai) yra svarbūs NMA taikiniai, kuriuos galima efektyviai aptikti, suskaičiuoti ir įvertinti jų tankį audiniuose taikant jau esamus SVA metodus. Tačiau limfocitų segmentavimas yra aprašytas tik keliuose tyrimuose. Taip pat jungiamojo audinio ląstelės (fibroblastai) dažnai minimos kitų ląstelių segmentavimo problemų kontekste, bet ne kaip pageidaujamas taikynys, o kaip sunkiai atpažįstamos ląstelės, trukdančios naviko ląstelių segmentavimui. Todėl reikia tirti ir kurti SVA metodus, specialiai skirtus NMA ląstelėms.

Ląstelių aptikimo (segmentavimo ir klasifikavimo) metodai remiasi ekspertų anotacijomis, tačiau yra sunku, o gal išvis neįmanoma tiksliai anotuoti, pavyzdžiui, ECM komponentą. Nors ECM vaizdinimas didele skiriamąja geba įmanomas taikant specializuotus vaizdinimo metodus (antros harmonikos generacijos mikroskopija, poliarizuotos šviesos mikroskopija, fluorescencinė mikroskopija) ir gali būti naudojamas kaip anotacija (etalonas), šie metodai ribotai pritaikomi diagnostikoje (dėl įvairių priežasčių). O plačiai prieinami šviesinės mikroskopijos metodai negali pasiūlyti panašaus tikslumo, todėl yra aiškiai išreikštas poreikis kurti patikimus ir prieinamus metodus, leidžiančius įvertinti ECM nešamą biologinę informaciją.

Patologijos SVA galutinius rezultatus (paprastai tolydžius dydžius) toliau naudoja patologai, norėdami atskirus pacientus priskirti prie kliniškai reikšmingų kategorijų (pagal ligos sunkumą, terapijos tinkamumą ar būtiną priežiūros planą). Kaupiasi pavyzdžiai sėkmingai pritaikomų neprižiūrimo ar silpnai prižiūrimo mokymo metodų pacientų biožymenų būsenai, atsakui į gydymą ir ligos pasikartojimui prognozuoti. Neprižiūrimas MM turi potencialą pagerinti patologijos SVA vystymąsi, sumažindamas šiuo metu itin didelę priklausomybę nuo ekspertų anotuotų (rankiniu būdu) duomenų. Tokie modeliai ne

tik geba tiksliau numatyti paciento ligos išeią nei optimalus visu srities eksperto naudojamų parametų derinys, bet ir suteikia unikalią galimybę standartizuoti diagnozę. Visgi kuriant visiškai nuo žmogaus nepriklausomą patologijos SVA tenka susitaikyti su ribotu MM priimamų sprendimų skaidrumu ir iš to kylančiomis papildomomis etinėmis ir profesinėmis problemomis. Tai skatina tyrinėti į naviką orientuotų ir į NMA orientuotų skaitmeninių metodų integravimą, siekiant pagerinti aiškėmis taisyklėmis grindžiamų metodų efektyvumą ir tuo pačiu išvengti neprižiūrimo MM metodų skaidrumo trūkumo.

Tiek diagnostinė patologija, tiek ir patologijos SVA (ir, plačiąja prasme, visa skaitmeninė patologija) yra intensyviai vystoma tyrimų sritis, tačiau išlieka itin orientuota į naviko ląsteles. Nemaža šios disertacijos dalis skirta plėtoti ir analizuoti patologijos SVA metodus, pritaikant juos iš NMA audinių kylantiems objektams, kuriuos dažniausiai ignoroja esami patologijos SVA metodai ir net gydytojai patologai.

Disertacijoje supažindinama su skaitmenine patologija apžvelgiant patologijos SVA metodus mokslinėje literatūroje, skiriant dėmesio tiek istoriškai svarbiems, tiek moderniausiems metodams. Tiriamoji disertacijos dalis nagrinėja naviko audinio klasifikavimą, ląstelių branduolių segmentavimą ir segmentuotų branduolių klasifikavimą, audinių kolageno segmentavimą ir navikų audinius aprašančių požymių erdvės konstravimą, siekiant nustatyti audinių charakteristikas, būdingas patologinei būklei.

1.3. Tyrimo objektas

Šios disertacijos objektas yra naviko mikroaplinkos dalių analizė rutiniškai paruoštuose histopatologiniuose pilno kadro vaizduose.

1.4. Tyrimo tikslas ir uždaviniai

Šios disertacijos tikslas – ištirti ir pasiūlyti naujus histopatologijos vaizdo segmentavimo ir klasifikavimo metodus, skirtus su naviko mikroaplinka susijusiems histologiniams audinių komponentams.

Norint įgyvendinti šį tikslą, reikia atlikti šias tyrimo užduotis:

1. Sukurti ir įvertinti kolorektalinio naviko epitelio-stromos audinių tipų klasifikavimo metodą.
2. Krūties ir kolorektalinių navikų mikroaplinkos analizei pasiūlyti pažangų paprastos konstrukcijos naviko ląstelių branduolių segmentavimo ir klasifikavimo metodą.
3. Išnagrinėti žinomus kolageno struktūrų požymių analizės metodus bei sukurti metodą, leidžiantį aptikti skaidulinę navikų mikroaplinkos kolageno struktūrą šviesinės histopatologinės mikroskopijos vaizduose ir ištirti kiekybinių kolageno struktūrų požymių panaudojimą prognozuoti skirtingų krūties vėžio pacientų grupių išgyvenamumui.
4. Sukurti ir generalizuoti giliuoju konvoliuciniu neuroniniu tinklu paremtą metodą, leidžiantį segmentuoti ir klasifikuoti naviko mikroaplinkos audinių komponentus įvairaus įvesties dydžio vaizduose krūties vėžiu sergančių pacientų terapinių biožymenų būklei klasifikuoti.

1.5. Bioetika

Penktame (5) skyriuje gauti rezultatai apėmė pacientų stebėjimo duomenų analizę, todėl Lietuvos bioetikos komitetas patvirtino šį tyrimą (numeris 40, data 2007-04-26, atnaujinta 2017-09-12). Kitiems disertacijoje atliktiems tyrimams bioetikos komiteto patvirtinimas nebuvo reikalingas.

1.6. Mokslinis naujumas

1. Eksperimentiškai įrodyta, kad konvoliucinio neuroninio tinklo (CNN) modelis, mokomas tiesiogiai iš vaizdo duomenų, tiksliau klasifikuoja storosios žarnos naviko audinių nei atraminių vektorių klasifikatorius (SVM), atsitiktinių miškų klasifikatorius (RDF) ar daugiasluoksnis perceptronas (MLP), mokomi tų pačių vaizdų spalvų ir tekstūros požymių erdvėje.
2. Literatūros analizė pateikia neabejotinų įrodymų, kad visiškai konvoliuciniai neuroniniai tinklai (FCNN) yra moderniausias naviko ląstelių branduolių segmentavimo būdas. Sukurtas ir įvertintas naujas modifikuotas ląstelių branduolių segmentavimo ir limfocitų identifikavimo naudojant daugiasluoksnį perceptroną (MLP) metodas. Limfocitų aptikimo požiūriu šis metodas yra prilyginamas pažangiausiems metodams, tačiau papildomai įgalina limfocitų segmentavimą.
3. Literatūros analizė identifikavo navikų mikroaplinkos kolageną kaip naują taikinį šviesinės mikroskopijos navikų vaizduose. Sukurtas ir patikrintas FCNN pagrįstas metodas kolageno gijoms segmentuoti rutiniuose krūties navikų audinių vaizduose. Eksperimentu įrodyta, kad morfometrinių kolageno struktūrų požymių prognozinė galia yra daug didesnė už įprastus klinikinius rodiklius. Mūsų žiniomis, tai yra pirmas metodas kolageno gijoms segmentuoti šviesinės mikroskopijos vaizduose.
4. Literatūros analizė atskleidė, kad FCNN gali būti tinkamas kelioms objektų klasėms segmentuoti vienu metu. Todėl anksčiau svarstyti metodai sujungti į vieną modelį, galintį segmentuoti tiek su naviku susijusius, tiek su TME susijusius krūties naviko audinio objektus. Tuomet segmentacijos pasitelktos sugeneruoti morfometriniams audinių požymiams, siekiant sukurti ir įvertinti krūties navikų audinių komponentų erdvinius ryšius išsaugančią PKV projekciją. Pasiūlyta transformacija suteikė galimybę audinio vaizdą perkelti į fiksuoto dydžio projekciją, leidžiančią

klasifikatoriui mokytis iš visų audinių vaizdų, ir tiksliai prognozuoti krūties vėžio pacientų terapinio biožymens būseną.

1.7. Ginamieji teiginiai

1. CNN, apmokytas vaizdo segmentais paremto storosios žarnos vėžio navikų audinių tipų klasifikavimo tiesiogiai iš vaizdo duomenų, yra tikslesnis su HE dažytiems histopatologijos vaizdams už kitus MM modelius, apmokytus sukonstruotoje segmentų lygio požymių erdvėje.
2. FCNN parentas būdas ląstelių branduoliams segmentuoti ir limfocitams identifikuoti krūties ir storosios žarnos navikų PKV pagal tikslumą gali būti lyginamas su pažangiausiais metodais limfocitų aptikimo požiūriu, tačiau papildomai įgalina limfocitų segmentavimą, yra paprastos konstrukcijos ir pasižymi geromis generalizacijos savybėmis.
3. FCNN pagrįstas metodas tinka kolageno karkasui segmentuoti iš įprastai nudažytų audinių šviesinės mikroskopijos vaizdų. Segmentuotose kolageno struktūrose yra informacijos apie išgyvenamumo skirtumus tarp skirtingų krūties vėžiu sergančių pacientų grupių.
4. Su navikais ir su NMA susijusių komponentų agreguotas segmentavimas įprastuose audinių PKV yra įmanomas naudojant FCNN pagrįstą modelį bei taikant daugiasluoksnes anotacijų kaukes, o kiekvienos klasės segmentavimą traktuojant kaip binarinę vaizdo taškų lygio klasifikavimo problemą suteikia pagrindą erdvinius ryšius išsaugančiai PKV projekcijai. Pasiūlyta PKV projekcija, konstruojama iš morfometrinių audinių požymių, leidžia mašininio mokymosi klasifikatoriaus apmokymą visais audinių vaizdais ir tikslų krūties vėžiu sergančių pacientų terapinių biožymenų būsenos prognozavimą iš įprastai nudažytų patologijos vaizdų.

2. SKAITMENINĖS PATOLOGIJOS METODŲ APŽVALGA

Istoriškai histopatologijoje kompiuterinės regos metodai pradėti taikyti siekiant automatizuoti gydytojo patologo darbo eigą, kuri didžiąja dalimi yra susijusi su objektyviu, tiksliu ir standartizuotu mikroskopinių naviko požymių tipavimu. Šie skaitmeninės patologijos metodai sukurti specialiai naviko ląstelėms (taigi į naviko ląsteles orientuoti). Iš NMA kylantiems audinių komponentams esamuose skaitmeninės patologijos metoduose skiriama nepakankamai dėmesio.

Į naviko ląsteles orientuoti patologijos SVA metodai. Automatizuoti navikų tipavimo metodai nustato naviko laipsnį (arba balą) pagal įvairius kiekybinius ar kokybinius patologijos rodiklius. Tokią tipišką patologijos vaizdų analizės darbo eigą galima suskirstyti į tris pagrindinius žingsnius: vaizdo apdorojimas (vaizdo taškų klasifikavimas), požymių išskyrimas ir diagnostiniai sprendimai, kiekviename žingsnyje naudojant įvairius gerai žinomus metodus.

Ląstelių branduoliams segmentuoti istoriškai naudojami slenksčio metodai (globalūs ir lokalūs slenksčiai). Norint sumažinti segmentavimo artefaktus arba užfiksuoti dideles struktūras, tokias kaip liaukos ir kanalėliai, segmentavimo žemėlapius galima toliau modifikuoti morfologinėmis operacijomis. Naudojant slenkstinius metodus kaip išankstinį apdorojimo žingsnį vandenskyros [3] transformacijai, briaunų detektoriams (pvz., Canny [4], Hough transformacijai [5]) arba formą pritaikančiam algoritmui [6, 7] galima išskirti ląstelių kontūrus ir histologines struktūras [8]. Panašius vaizdo taškus galima grupuoti tiek kieto grupavimo, tiek triukšmui atsparesniais ir tikslesniais minkšto grupavimo metodais [9]. Pradiniam segmentavimui tikslinti dažnai taikomas Markovo atsitiktinio lauko modelis [10-13], kuriame vaizdas traktuojamas kaip grafas, o segmentavimas suprantamas kaip grafo briaunų, jungiančių objektus su fonu, kirpimas.

Vaizdo elementų sužymėjimas skaitmeniniame patologijos vaizde dėl segmentavimo gaunamas skaidant didelį skaitmeninį vaizdą į mažus, bet prasmingesnius regionus. Tokiu būdu segmentavimas suprantamas kaip regiono klasifikavimas ir dažnai remiasi vaizdo požymiais, tokiais kaip spalva, intensyvumas, kontrastas ir kitais. Lokalūs binariniai šablonai [14-16], Gaboro filtrai [17, 18], tekstūra [19, 20], momentai [21] ir atsakas į filtrus [22-24] leidžia susikurti vaizdą aprašančią požymių erdvę. Požymių erdvės inžinerija paremti MM klasifikatoriai yra ribojami itin išsamių žinių apie tiriamą sritį poreikiu [25-27]. Šiame kontekste MM klasifikatorius galima suskirstyti į tradicinius ir giliuosius mokymosi metodus. MM metodai, plačiai naudojami jau nuo devintojo–dešimtojo dešimtmečio (pvz., sprendimų medžiai [28], **daugiasluoksnis perceptronas (MLP)** [29, 30], **atraminiai vektoriai (SVM)** [31], **atsitiktinių sprendimų miškai (RDF)** [32, 33]) gali būti laikomi tradiciniais MM metodais. Nors gilusis mokymas (GM), kaip daugiasluoksnio dirbtinio neuroninio tinklo (DNN) apmokomo atgalinio klaidos sklidimo būdu [30] koncepcija, taip pat žinomas jau dešimtmečius, platesnis jo naudojimas prasidėjo visai neseniai (apie 2011 m.), kai DNN buvo įgyvendintas grafiniame procesoriuje [34, 35]. Dirbtiniai neuroniniai tinklai nereikalauja požymių erdvės konstravimo, bet patys išmoksta požymius tiesiai iš vaizdų.

Konvoliuciniai neuroniniai tinklai (CNN) skaitmeninėje patologijoje pirmiausia buvo pritaikyti klasifikuoti vaizdo segmentams [26, 36-38]. CNN modeliai gali būti taikomi ir vaizdo taškų lygio klasifikatoriuose [39, 40], kuriuose kiekvienam vaizdo taškui priskiriama jį gaubiančio segmento klasės žymuo. Apie 2015 m. pristatyta **visiškai konvoliucinio tinklo architektūra (FCNN)**, leidžianti sužymėti kiekvieną vaizdo tašką vaizde, tinklą apmokant žymėtų vaizdo taškų kaukėmis [41]. Šis metodas grindžiamas visiškai sujungtą CNN architektūros sluoksnių pakeitimu konvoliuciniais sluoksniais, o reikiamo dydžio segmentavimo žemėlapiams gauti prieš išvesties sluoksnį naudojant atstatymo sluoksnį (dekonvoliucija). Įvestas praleidimo jungties elementas sujungia galutinį prognozavimo

sluoksnį su giliaisiais sluoksniais, padeda atgauti erdvinę informaciją. FCNN architektūra greitai pritaikyta skaitmeninės patologijos užduotims, o kai kurios žymios FCNN architektūros netgi gimė iš medicininių vaizdų analizės srities. U-net architektūra įvedė dekonvoliucijos sluoksnių kaskadą (dekoderį), praleidimo jungtimis sujungtą su enkoderio sluoksniais [42]. FCNN architektūra buvo adaptuota ir intensyviai modifikuota įvairioms tyrimų sritims, atliekant specifines užduotis. 2017 m. Xu ir kt. [43] pristatė gilų daugiakanalį neuroninį tinklą, skirtą vienu metu aptikti ir segmentuoti navikų liaukų struktūras. Siūlomas modelis segmentavimą atlieka per FCNN kanalą, gaunantį aukšto lygio požymius, o ribos tarp liaukų randamos skirtingos įvesties skyros CNN kanale. Trečias kanalas atlieka regiono pasiūlymo funkciją (R-CNN), nustato liaukų lokalizaciją vaizdo plokštumoje, o CNN sujungia visų kanalų išvestį į galutinį rezultatą. Panašus daugiakanalio FCNN principas buvo pritaikytas siekiant patikslinti įvairių medicininių objektų segmentavimą ir išbandytas su rentgenografijos, ultragarso ir histologijos duomenų rinkiniais [44].

2018 m. Geceris ir kt. [45] pritaikė kelis atskirai apmokytus FCNN modelius, norėdami atskirti nereikšmingas vaizdo sritis nuo diagnostškai reikšmingų regionų krūtų histopatologijos PKV. Panašiai Rawat ir kt. [46] pritaikė FCNN, kad sudarytų erdvinį PKV žemėlapi, išryškinantį krūties navikų sritis, būdingas skirtingoms specifinio biožymens būsenoms.

2019 m. pristatyta U-net architektūros modifikacija – Micro-net [47], FCNN paremtas modelis, kuriame tam pačiam įvesties vaizdai taikomos daugybinės lygiagrečios operacijos. Bandi ir kt. [48] sukonstravo audinių detektorius, pagrįstą FCNN, galintį naviko audinius atskirti nuo fono skirtingos skiriamosios gebos PKV sluoksniuose. Autoriai pademonstravo, kad vienas FCNN modelis, išmokytas aptikti audinius įvairios raiškos vaizduose, buvo vienodai tikslus lyginant su keliais FCNN modeliais, mokytais tam tikrai vaizdo raiškai. Pontalba ir kt. [49] pristatė FCNN ir segmentus

klasifikuojančio CNN architektūrų darinį (angl. *ensemble*) branduoliams segmentuoti įvairiuose histologijos vaizduose.

2019 m. publikuoti „Kaggle 2018 Data Science Bowl“ iššūkio rezultatai, kuriame dalyviai varžėsi ląstelių branduolių segmentavimo įvairiuose mikroskopijos vaizduose varžybose. Dauguma dalyvių naudojo vienokias ar kitokias CNN architektūras, tačiau FCNN modeliai pasiekė aukščiausių rezultatų [50].

2020 m. pristatytas U-net ++ [51] – daugelio įvairaus gylio U-net architektūrų darinys su pertvarkytomis praleidimo jungtimis, apmokytų modelių karpymo schema (spartesniam veikimui). Skirtingos konfigūracijos U-net ++ modeliai žymiai pagerino kelių biomedicininį vaizdų segmentavimo duomenų rinkinių rezultatus. 2021 m. Tran ir kt. [52] pristatė TMD-Unet, dar vieną U-net architektūros modifikaciją, naudojančią tankiai sujungtas konvoliucijas kiekviename U-net mazge ir daugiakanalę įvestį. TMD-Unet išbandytas su keliais viešais duomenų rinkiniais, įskaitant „Kaggle 2018 Data Science Bowl“ ląstelių branduolių segmentavimo iššūkį [50].

Įvairūs metodai, naudojantys regionų pasiūlymų architektūrą (R-CNN [53]) ir jos išplėtimus („Fast R-CNN“ [54], „Faster R-CNN“ [55], „Mask-RCNN“ [56]) labai sėkmingai pritaikyti aptikti mitozėms [57], naviko ląstelėms [58] ar kitoms specifinėms histologinėms struktūroms [59]. PKV modeliuojant kaip vaizdo regionų seką, pasiūlytas modelis su dėmesio atkreipimo mechanizmu [60], kuris remiasi rekurentiniu neuroniniu tinklu. Šio modelio išskirtinis bruožas yra vizualaus dėmesio vartai, kurie leidžia vizualizuoti vaizdo regionus, turinčius didžiausią įtaką vaizdo klasifikavimo sprendimams.

Skaitmeninės patologijos etaloniniai duomenys. Mašininis mokymasis, kaip itin specializuota technologija, reikalauja kruopščiai suprojektuotų ir realistiškų etaloninių duomenų (ED). Idealiu atveju skaitmeninės patologijos GM modeliai turėtų mokytis pagal patologų sistemingai anotuotas vaizdų kolekcijas, tačiau kvalifikuoti ekspertai retai turi tiek laiko, kiek reikia tikslioms vaizdo taškų lygio

anotacijoms atlikti. Tokiu būdu ED yra gaunami su kiekiu ir tikslumo kompromisu [61-64]. Konkretūs mokymosi tikslai gali apimti laiko ir įvykio prognozavimą pagal paciento stebėjimo duomenis, taip pat palyginti lengvai gaunami diagnozės duomenys iš patologijos ataskaitų ar įrašų ligoninių informacinėse sistemose. Tačiau diagnozė priskiria klasės žymę visam vaizdui ir PKV turi būti modeliuojamas kaip daugybinių atvejų (smulkių vaizdo regionų) rinkinys (angl. *bag* arba *set of instances*) [65-69]. Tokiu atveju galutinis rezultatas apibendrinamas regiono lygio rezultatus agreguojant į globalų PKV lygio rezultatą. Atskira NN rūšis – autoenkoderiai (AE) yra neprižiūrimo mokymosi metodai, suteikiantys galimybę mokyti modelius be klasės žymės, be ED. Apmokyti AE naudojami vaizdams normalizuoti, požymiams ištraukti, ląstelių branduoliams ir metastazėms aptikti [70-74].

Į NMA orientuoti patologijos SVA metodai. Nors daugumoje tyrimų daugiausia dėmesio skiriama naviko ląstelėms, NMA komponentus visgi galima segmentuoti, klasifikuoti ir kiekybiškai įvertinti pritaikant tuos pačius į naviką orientuotus metodus: NMA kraujagysles [75, 76], nervines skaidulas [77], audinių zonas [78, 79], stromos ląsteles [80], imuninį infiltratą [81-87] ir (tam tikru laipsniu) ECM [88-93].

Neprižiūrimo mokymo patologijos SVA metodai. Gilaus mokymosi metodai efektyviai taikomi įvairioms skaitmeninės patologijos užduotims ir yra nuolat lyginami (ir konkuruoja) su žmogaus gebėjimais. Reikšmingiausi GM pasiekimai gauti, naudojantis silpnai žymėtais duomenimis, visiškai nepriklausomais (arba didele dalimi nepriklausomais) nuo anotuotų vaizdo duomenų metodais [94-97]. Kita vertus, kai pageidaujami patologijos SVA rezultatai yra audinių objektų lygyje, pavyzdžiui, kai reikia vizualiai patvirtinti metastazių aptikimą, biožymens būseną, limfocitų tankį ir pan., požymių erdvės inžinerija vis dar sėkmingai taikoma ir naudojama.

Susiję darbai Lietuvoje. Tyrėjų grupės Lietuvoje taiko patologijos SVA metodus histologinių objektų (kraujagyslių [98],

biožymenims teigiamų naviko ląstelių [99-102]) kiekybiniam įvertinimui, audinių morfologijos vertinimui [103-106], imties sudarymo principų biožymenų statistinei analizei [107-109]. Vykdomi tyrimai, skirti ląstelių kultūroms modeliuoti [110-112]. Yra paskelbta darbų, skirtų ląstelių aptikimo ir segmentavimo metodams sukurti ir įgyvendinti histologiniuose vaizduose [113, 114]. Konkrečiai, su NMA susiję skaitmeninės patologijos tyrimai buvo sutelkti į naviko invazinio krašto aptikimą ir kiekybinį biožymenų vertinimą naviko audinių skyriuose [79, 115, 116].

Skyriaus išvados. CNN yra daugelio pažangiausių metodų, sprendžiančių skaitmeninės patologijos segmentavimo ir klasifikavimo problemas, esmė. Tradiciniai MM tinkami spręsti toms pačioms problemoms, tačiau jų naudojimas visuomet ribojamas, nes požymių erdvę, reikalingą MM mokymui, turi apibrėžti srities ekspertas. CNN gali apsimokyti ir iš eksperto apibrėžtos požymių erdvės, tačiau turi pranašumą mokytis tiesiogiai iš vaizdų. Požymių erdvės inžinerija yra itin aktuali konkrečioms užduotims, pvz., siekiant padidinti sprendimų skaidrumą.

FCNN yra ypatingas CNN atvejis, kurį, remiantis literatūros apžvalga, galima laikyti moderniausiu vaizdo taškų lygio segmentavimo metodu. Svarbu toliau nagrinėti FCNN taikymą skaitmeninėje patologijoje.

Aukštos kokybės anotuotų skaitmeninės patologijos duomenų rinkinių trūkumas sprendžiamas taikant neprižiūrimus ar silpnai prižiūrimus MM metodus. Neprižiūrimo mokymosi MM turi neabejotinų trūkumų sprendimų aiškumo ir skaidrumo požiūriu, todėl skaitmeninėje patologijoje aktualu tirti prižiūrimo MM metodus.

3. NAVIKŲ EPITELIO-STROMOS AUDINIŲ KLASIFIKAVIMO METODŲ ANALIZĖ

Šiame skyriuje nagrinėjamas storosios žarnos vėžio navikų histologinių vaizdų segmentų klasifikavimas į du pagrindinius tipus – naviko epitelį ir stromą. Navikų epitelio-stromos klasifikavimas

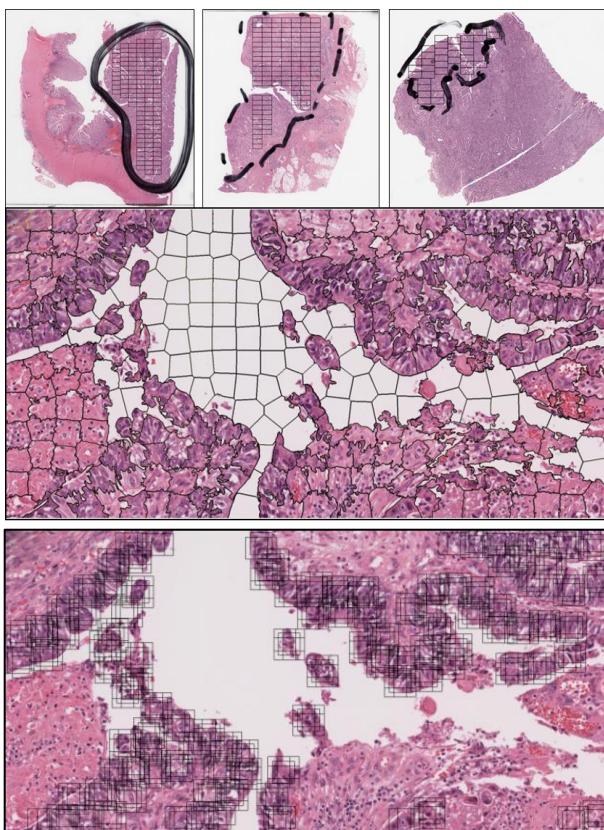
dažnai derinamas su labai specifiniais patologijos tyrimo tikslais, todėl yra racionalu ieškoti naujų ir analizuoti esamus metodus tiksliam naviko audinio klasifikavimui.

Eksperimento dizainas. Šiame skyriuje pateikiamas eksperimentas, kurio metu analizuojami du konkuruojantys navikų audinių klasifikavimo metodai taikant prieinamus mašininio mokymo metodus – pirma, taikomi tradiciniais laikomi **RDF, SVM, MLP ir gilusis MLP**, klasifikatorius apmokant sukurta vaizdo superelementų požymių erdve ir, antra, apmokant **CNN** tiesiogiai vaizdo duomenimis.

Iš HE nudažytų storosios žarnos navikų audinių PKV generuojami du suderinti duomenų rinkiniai – vaizdo superelementų ir stačiakampių vaizdo segmentų (72×72 taškų dydžio), generuojamų pagal vaizdo superelementų centroidų koordinates PKV plokštumoje. Trečiasis duomenų rinkinys sukurtas iš stačiakampių vaizdo segmentų juos tankiai imant aplink vaizdo superelementų centroidus. Taip siekiama iširti duomenų rinkinio augmentavimo įtaką CNN klasifikatoriaus veikimui. Etaloniniai duomenys eksperimentui gauti vaizdo superlementams priskiriant audinio klasės žymę, o kiekviena vaizdo iškarpa paveldi atitinkamo vaizdo supelemento žymę.

Požymių erdvė klasifikatoriams apmokyti yra sukurta iš vaizdo superelementų išgaunant spalvos ir vaizdo tekstūros charakteristikas, bei gautam duomenų rinkiniui taikant faktorių analizę kaip būdą sumažinti požymių erdvės matmenų skaičių. Dėl mikropreparatų gamybos procese naudojamų rankinių procedūrų dažymo kokybė gali šiek tiek įvairuoti. Todėl siekiant įvertinti dažymo kokybės įtaką visi duomenų rinkiniai tirti RGB ir pilkos spalvos erdvėse.

Klasifikatoriai lyginami pagal AUC metriką (plotą po sprendimus priimančiojo ypatybių kreive, angl. *area under Receiver operating characteristic*) [117].



3.1 pav. Vaizdų duomenys. Viršuje – storosios žarnos navikų pilno kadro vaizdai. Analizei parinkti regionai naviko audinyje eksperto patologo pažymėtose naviko zonose. Vidurinė eilutė – vienas 1000×2000 taškų dydžio vaizdo regionas, sudalytas į vaizdo superelementus. Apatinė eilutė – tankaus vaizdo stačiakampių ėmimas pagal naviko klasės vaizdo superelementų koordinates.

Duomenų rinkinys. Buvo naudojami trys HE dažytų storosios žarnos vėžio audinių PKV (žr. 3.1 pav.). Iš navikų vaizdų tyrimui rankiniu būdu parinkti 284 regionai (1000×2000 taškų dydžio), segmentuoti į vaizdo superelementus taikant SLIC algoritmą [118] ir anotuoti priskiriant kiekvieną vaizdo superelementą naviko (epitelio),

stomos arba fono klasei. Visi fono klasės vaizdo superelementai atrinkti pagal žalios spalvos kanalo vidurkį (> 190) bei standartinį nuokrypį (< 30) ir pašalinti iš duomenų rinkinių. Gauti duomenų rinkiniai pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Suderinti vaizdo superelementų ir vaizdo stačiakampių segmentų duomenų rinkiniai. Kiekvienas duomenų pogrupis atitinka atskirą naviko mėginį.

Pogrupis	Mokymo imtis		Validavimo imtis		Testavimo imtis	
	Navikas	Stroma	Navikas	Stroma	Navikas	Stroma
Sample1*	10000	10000	750	750	9416	1205
	Vaizdo superelementų / Stačiakampių skaičius: 32121. Mok. / Valid. / Test. imčių proporcijos: 0.62 / 0.05 / 0.33					
Sample2	10000	10000	750	750	533	8699
	Vaizdo superelementų / Stačiakampių skaičius: 30732. Mok. / Valid. / Test. imčių proporcijos: 0.65 / 0.05 / 0.30					
Sample3	2200	2200	150	150	3269	175
	Vaizdo superelementų / Stačiakampių skaičius: 8144. Mok. / Valid. / Test. imčių proporcijos: 0.54 / 0.04 / 0.42					
General	28000	28000	2000	2000	7068	3929
	Vaizdo superelementų / Stačiakampių skaičius: 70997. Mok. / Valid. / Test. imčių proporcijos: 0.79 / 0.06 / 0.15					

* – duomenų pogrupis naudotas klasifikatorių parametrų paieškai.

Vaizdo stačiakampių duomenų rinkinys sukurtas iš PKV iškerpant 72×72 taškų dydžio stačiakampius pagal vaizdo superelementų centroidų koordinates. Todėl vaizdo stačiakampių duomenų rinkinys tiksliai atitinka vaizdo superelementų duomenų rinkinį.

Požymių erdvė. RGB spalvų erdvėje kiekvienam vaizdo superelementui apskaičiuotos 8 spalvos charakteristikos – kiekvieno spalvos kanalo atskirai ir visų spalvų kanalų bendrai vaizdo taškų verčių vidurkiai ir standartinis nuokrypis. Pilkos spalvos erdvėje apskaičiuotos dvi spalvos charakteristikos – vaizdo taškų vertės vidurkis ir standartinis nuokrypis. Vaizdo superelementams iš

pilkumo lygio pasikartojimų matricos apskaičiuota 13 tekstūros charakteristikų [119].

Požymių erdvė galutinai suformuota duomenų rinkinio matmenų mažinimui pritaikius faktorių analizę (FA) [120]. Požymių erdvės matmenų skaičius pasirinktas iš pagrindinių komponentių analizės [120] kaip komponentių skaičius, paaiškinantis daugiau kaip 99 % duomenų rinkinio dispersijos. FA pritaikyta atskirai spalvos ir tekstūros charakteristikų duomenims bei jungtiniam duomenų rinkiniui (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Požymių erdvės matmenų skaičius po FA.

	Spalvos požymiai	Tekstūros požymiai	Jungtiniai požymiai
RGB	4	8	8
Pilkos skalės	2	8	8

Normalizuoti (intervale [0, 1]) faktorių įverčiai, čia vadinami „požymiais“, buvo naudojami kaip įvesties duomenys klasifikatoriams.

Klasifikatoriai. Kadangi fono klasė pašalinta iš visų duomenų rinkinių, epitelio-stromos klasifikavimo problemą galima apibrėžti kaip dvejetainę.

SVM su radialinės bazės funkcijos transformacijos branduoliu. **RDF** klasifikatorius su 25 pagrindinio lygio medžiais, **MLP** neuroninis tinklas, įgyvendintas su vienu įvesties sluoksniu, dviem paslėptais sluoksniais (atitinkamai su 1000 ir 40 neuronų) ir išėjimo sluoksniu su vienu neuronu, ribotos atminties LBFSGS [121] optimizatoriumi logaritminei klaidos funkcijai minimizuoti, apmokytas 200 epochų. **Gilusis MLP** sukonstruotas iš trijų visiškai sujungtų sluoksnių (su 1024, 512 ir 128 neuronų atitinkamai), iškritimo (50 %) sluoksniu, išėjimo sluoksniu su dviem neuronais per softmax aktyvavimo funkciją, Adam [122] optimizatoriumi logaritminei klaidos funkcijai minimizuoti, apmokytą 200 epochų. **CNN** sukonstruotas su 4 konvoliuciniais sluoksniais (su 96, 96, 192 ir

192 neuronais), vienu visiškai sujungtu sluoksniu (su 384 neuronais) ir išėjimo sluoksniu su dviem neuronais per softmax aktyvavimo funkciją, imties normalizavimo sluoksniais po kiekvieno konvoliucinio sluoksnio, Adam optimizatoriumi logaritminei klaidos funkcijai minimizuoti, apmokytu 200 epochų.

SVM, RDF, MLP ir gilusis MLP apmokyti naudojant vaizdo superelementų spalvų, tekstūros ir jungtinius požymius. CNN apmokytas tiesiogiai vaizdų stačiakampiais. Atlikta 10 pakartojimų, kiekvieną kartą atsitiktinai išmaišant duomenis ir priskiriant mokymo / validavimo / testavimo imtims. Kiekvienam klasifikatoriui apskaičiuotas vidutinis AUC ir standartinis AUC nuokrypis.

Vaizdo superelementų klasifikavimo rezultatai. RGB spalvų erdvėje atskirų mėginių (*Samples*) duomenų pogrupiuose SVM, RDF, MLP ir gilusis MLP klasifikatoriai veikė gana panašiai. Tačiau MLP pasiekė geriausią generalizacijos (*General* duomenų pogrupis) rezultatą tarp šių klasifikatorių (AUC = 0,9666), taip pat pralenkdamas gilųjį MLP (AUC = 0,9575). Pilkos spalvos erdvėje šių klasifikatorių AUC balai buvo nuo 0,5533 iki 0,9443. Skirtumai pastebėti tarp duomenų pogrupių (*Samples*), bet ne tarp klasifikatorių.

Duomenų pogrupio dydis neturėjo įtakos klasifikatoriaus veikimui. Priešingai nei tikėtasi, mažiausio *Sample3* duomenų pogrupio klasifikavimo tikslumas yra palyginamas su didesnių pogrupių rezultatais (pvz., *Sample1* duomenų pogrupis yra beveik keturis kartus didesnis už *Sample3*). Šis faktas rodo, kad individualios audinio mėginio savybės lemia didesnę rezultatų variaciją nei apmokymui naudotų duomenų kiekis.

Jungiant spalvų ir tekstūros požymius padidėja RGB vaizdo superelementų klasifikavimo tikslumas (AUC = 0,9666), palyginti su vien spalvų (AUC = 0,9577) ar vien tekstūros požymiais (AUC = 0,9542) generalizacijos sąlygomis.

Pilkos spalvos erdvėje vaizdo superelementų tekstūros požymiai labiau tinkami klasifikuoti (AUC intervale nuo 0,8160 iki 0,9443) už spalvų ar kombinuotus požymius. Geriausias *General* duomenų pogrupio rezultatas gautas naudojant MLP ir tekstūros požymius

(AUC = 0,8885) – daug mažesnis, palyginti su geriausiu RGB spalvų erdvėje gautu rezultatu (MLP ir jungtiniai požymiai, AUC = 0,9666). Rezultatai gerai atitinka kitų grupių gautus rezultatus – AUC 0,97–0,99 [63] ir AUC = 0,98 [123] storosios žarnos navikų ir AUC = 0,98 [26] prostatos navikų vaizdams.

Vaizdo stačiakampių klasifikavimo CNN rezultatai. Generalizacijos sąlygomis RGB spalvų erdvėje CNN pasiekė 0,9895 AUC. Rezultatas yra lyginamas su kitų grupių rezultatais – krūties vėžio AUC = 0,9316 [38], prostatos vėžio AUC = 0,965 ir AUC = 0,99 [26, 37]. Šiomis eksperimentinėmis sąlygomis CNN klasifikavimo tikslumas buvo daug didesnis už kitų klasifikatorių apmokytų RGB erdvėje vaizdo superelementų požymius (AUC = 0,9895, palyginti su AUC 0,9533–0,9666, pasiektu naudojant SVM, RDF, MLP ar gilųjį MLP). Tačiau atskiriems duomenų pogrupiams (*Samples*) CNN nebuvo geresnis už kitus klasifikatorius (pvz., SVM pasiekė AUC 0,9534–0,9769, o CNN pasiekė AUC 0,8942–0,9681).

CNN apmokytas pilkos spalvos erdvėje visais atvejais buvo tikslesnis (AUC diapazone nuo 0,8706 iki 0,9797) už kitus klasifikatorius, apmokytus pilkos spalvos erdvės vaizdo superelementų požymiais (AUC diapazonas nuo 0,8160 iki 0,9443).

Tankiai sugeneruotas vaizdo stačiakampių duomenų rinkinys nepagerino CNN klasifikavimo rezultatų. Toks duomenų rinkinio augmentavimas galėjo sukelti nepageidaujamą klasių sumaišymą. Vėlgi, kaip ir vaizdo superelementų duomenų pogrupių atveju, galima teigti, kad individualios audinio mėginio savybės labiau lėmė rezultatų kitimo priežastis nei duomenų kiekis.

Skyriaus išvados. Navikų audiniams klasifikuoti buvo naudojami anotuoti vaizdo superelementai ir tradiciniai MM klasifikatoriai, o vaizdo stačiakampiams klasifikuoti – CNN. Rezultatai leidžia daryti šias išvadas:

Vaizdo superelementų spalvų požymiai leidžia gauti geresnių klasifikavimo rezultatų (AUC 0,9217–0,9701), palyginti su tekstūros požymiais (AUC 0,9095–0,9629) visuose duomenų pogrupiuose. RGB spalvų erdvėje generalizacijos sąlygomis jungiant spalvų ir

tekstūros požymius padidėjo visų klasifikatorių tikslumas (AUC = 0,9533–0,9666), lyginant vien tik su spalvų požymiais (AUC = 0,9466–0,9577) arba vien tik su tekstūros požymiais (AUC = 0,9385–0,9542).

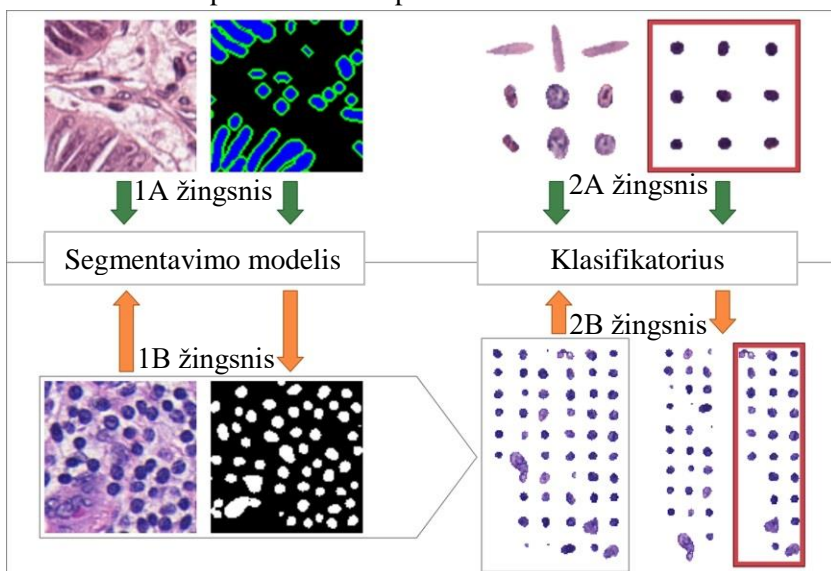
Kaip ir tikėtasi, CNN pasiekė geriausią klasifikavimo tikslumą generalizacijos sąlygomis (AUC = 0,9895). Įdomu tai, kad net apmokytas pilkos spalvos erdvėje, CNN pasiekė geresnį generalizacijos rezultatą (AUC = 0,9797) už kitus MM modelius, apmokytus RGB spalvų erdvėje vaizdo superelementų požymiais (AUC 0,9533–0,9666). Tai rodo, kad mokydamasis tiesiogiai iš vaizdo duomenų, CNN gali sukurti įvairialypę požymių erdvę paslėptuose savo architektūros sluoksniuose.

4. LAŠTELIŲ BRANDUOLIŲ SEGMENTAVIMO IR LIMFOCITŲ IDENTIFIKAVIMO METODAS

Ankstesniame skyriuje pagrindinis dėmesys buvo skiriamas dviejų pagrindinių naviko audinių tipų – naviko epitelio ir stromos – klasifikavimui vaizduose. Šiame skyriuje toliau išsamiai nagrinėjama HE nudažytų navikų audinių PKV analizė, t. y. limfocitų (imuninių ląstelių, kurios per stromą skverbiasi į naviką) aptikimas ir segmentavimas krūties vėžio ir storosios žarnos vėžio audinių PKV vaizduose. Motyvacija tirti specifiskai limfocitus kyla iš to, kad limfocitų segmentavimas įprastuose patologijos vaizduose yra svarbi, tačiau nepakankamai ištirta skaitmeninės patologijos tema.

Eksperimento dizainas. Šiame skyriuje pristatomas ląstelių branduolių segmentavimo modelis. Svarstomas FCNN pagrįstų pažangiausių ląstelių segmentavimo modelių architektūrų pritaikymas. Daugybinės skiriamosios gebos vaizdo įvesties architektūros idėja yra perimta iš Micro-Net modelio [47], o daugiapakopė tarpusavyje sujungta U-net [42] architektūra naudojama kaip pagrindinis branduolių segmentavimo modelis. Pristatomas naujas tinklo architektūros struktūrinis elementas – tekstūros blokas, kurį sudaro 2 lygiagretūs srautai, o kiekvienas iš jų yra sudarytas iš 3

nuosekliai sujungtų konvoliucinių sluoksnių, kurie, kaip tikimasi, padidina segmentavimo tikslumą. Siūlomas modelis lyginamas su gerokai sudėtingesniais U-net ir Micro-Net modeliais. Be to, tiriamas susiglaudusių ląstelių branduolių atskyrimas. Į vaizdų anotacijas įterpiamas aktyvaus kontūro sluoksnis ir branduolių segmentavimo modelis išmokomas tiek segmentuoti branduolius, tiek ir kiekvieno branduolio kontūrą, o tai, tikimasi, padidins segmentavimo tikslumą. Po segmentavimo tiriamas limfocitų identifikavimas segmentuotų branduolių imtyje taikant RDF, MLP ir CNN klasifikatorius. Siūlomo metodo schema apibendrinta 4.1 paveiksle.



4.1 pav. Siūlomo metodo schema.

Po segmentavimo modelio apmokymo (4.1 pav. 1A žingsnis) ir klasifikatoriaus apmokymo (4.1 pav. 2A žingsnis), metodas gali priimti naujus vaizdus, sugeneruoti jų segmentavimo kaukes (4.1 pav. 1B žingsnis), išsegmentuotus ląstelių branduolius perduoti klasifikatoriui ir atskirti limfocitus nuo kitų branduolių (4.1 pav. 2B žingsnis). Visas limfocitų segmentavimo ir klasifikavimo metodas

(4.1 pav. 1B → 2B žingsniai) įvertinamas tiriant viešą duomenų rinkinį.

Duomenų rinkiniai. Šiame eksperimente panaudoti 5 HE dažyti PKV vaizdai – 2 krūties navikų ir 2 storosios žarnos navikų (Valstybinis patologijos centras) ir 1 krūties naviko PKV iš TCGA duomenų bazės [124]. Naudotos dvi papildomos viešosios anotuotų histologinių vaizdų kolekcijos – „CRCHistoPhenotypes“ storosios žarnos navikų duomenų rinkinys [80] (CRCHP) ir krūties navikų duomenų rinkinys [86] (JAN). CRCHP yra 100 HE dažytų storosios žarnos vėžio vaizdų (500×500 taškų dydžio PKV fragmentai) su identifikuotais ląstelių branduoliais. JAN duomenų rinkinį sudaro 100 HE dažytų krūties vėžio vaizdų (100×100 taškų dydžio PKV fragmentai) su anotacijomis tik limfocituose. Iš šių vaizdų rinkinių suformuoti segmentavimo ir klasifikavimo duomenų rinkiniai (žr. 4.1 ir 4.2 lenteles).

4.1 lentelė. Segmentavimo duomenų rinkinys. BC – krūties vėžys, CRC – storosios žarnos vėžys, NCP – Valstybinis patologijos centras, TCGA – Vėžio genomo atlaso duomenų bazė.

	Naviko tipas	Neapdoroti duomenys	Augmentuoti duomenys	Duomenų šaltinis
Apmokymas	BC	192	3648	NCP
	CRC	82	1558	NCP
	Viso	274	5206	NCP
Validavimas	BC	54	54	NCP
	CRC	16	16	NCP
	Viso	70	70	NCP
Testavimas	BC	96	96	TCGA
	Viso	96	96	TCGA

4.2 lentelė. Klasifikavimo duomenų rinkinys. BC – krūties vėžys, CRC – storosios žarnos vėžys, NCP – Valstybinis patologijos centras, TCGA – Vėžio genomo atlaso duomenų bazė. CRCHP – „CRCHistoPhenotypes“ duomenų rinkinys [80], JAN – krūties vėžio duomenų rinkinys [86].

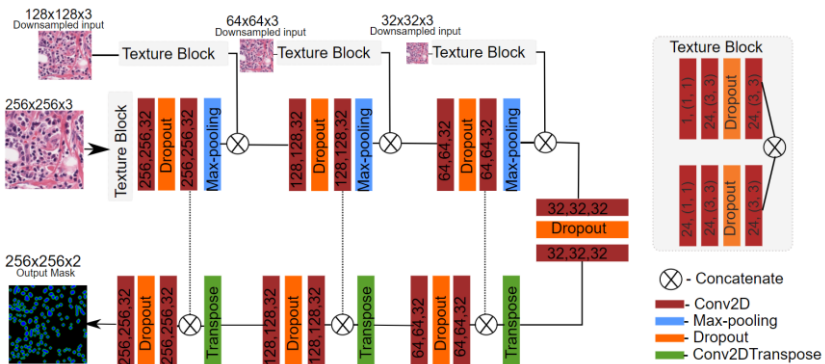
	Branduolių tipas	Neapdoroti duomenys	Augmentuoti duomenys	Duomenų šaltinis
Apmokymas	Limfocitai	11032	50950	NCP
	Kiti	10922	55825	
	Viso	21954	106775	
Validavimas	Limfocitai	2588	2588	NCP
	Kiti	2751	2751	
	Iš viso	5339	5339	
Testavimas	BC limfocitai	903	903	TCGA
	CRC limfocitai	1143	1143	CRCHP
	Iš viso limfocitų	2046	2046	TCGA + CRCHP
	BC kiti	1195	1195	TCGA
	CRC kiti	1040	1040	CRCHP
	Iš viso kitų	2235	2235	TCGA + CRCHP
	Iš viso bendrai	4281	4281	TCGA + CRCHP
Įvertinimas	BC limfocitai	2949	2949	JAN
	BC kiti	1921	1921	
	Iš viso	4870	4870	

Segmentavimo duomenų rinkinys (4.1 lentelė). Iš PKV buvo atsitiktinai parinkti 344 vaizdo stačiakampiai (256×256 taškų dydžio). Jiems pritaikyti vaizdo augmentavimo metodai (pasukimas, apvertimas, perkėlimas, RGB padidinimas, ryškumo reguliavimas, CLAHE [125]).

Klasifikavimo duomenų rinkinys (4.2 lentelė). Segmentavimo duomenų rinkinio kaukės buvo rankiniu būdu suanotuotos ir naudojamos visų rūšių ląstelių branduoliams iškirpti iš originaliųjų vaizdų. Segmentavimo kaukėje kiekvienam branduoliui nustatytos

centroido koordinatės ir iš originalaus vaizdo iškirptas 32×32 taškų dydžio vaizdo stačiakampis, centruotas ties branduolio centroidu. Vaizdo stačiakampio taškams, nepatenkantiems į branduolio anotaciją, priskirta nulinė vertė. Kiekvienas vaizdo stačiakampis paveldi klasės žymę iš anototos segmentavimo kaukės. Tokiu pat būdu papildomai iš CRCHP vaizdų sugeneruoti 1143 limfocitų branduoliai ir 1040 kitos klasės branduoliai. Vaizdo stačiakampiai toliau buvo augmentuoti pasukant ir apverčiant.

Branduolių segmentavimo modeliai. Tyrimui naudoti trys FCNN modeliai – U-net, Micro-Net ir modifikuotas U-net. Siūloma branduolių segmentavimo modelio architektūra parodyta 4.2 paveiksle.



4.2 pav. Modifikuoto U-net modelio architektūra.

Gili daugiasluoksnė U-net architektūra su praleidimo jungties elementais leidžia efektyviai atgauti įvesties erdvinę informaciją. Micro-Net modelis įveda dar papildomų skirtingos skiriamosios gebos vaizdo įvesties sluoksnių, kad būtų kompensuotas informacijos praradimas sutelkimo (pagal maksimumą) sluoksniuose. Siūloma U-net architektūros modifikacija įgyvendina 3 enkoderio-dekoderio architektūros lygius, o kiekvieną iš jų sudaro 2 konvoliuciniai sluoksniai, iškritimo (50 %) ir sutelkimo (pagal maksimumą) sluoksniai. Modifikacija po kiekvieno maksimalaus kaupimo veiksmo

priima kelis mažesnio dydžio vaizdo įvesties sluoksnius, kurie iš pradžių pasiūlyti Micro-Net modelyje. Eksponentinė tiesinė aktyvavimo funkcija (ELu, [126]) buvo naudojama po kiekvieno konvoliucijos sluoksnio, o sigmoidinė aktyvacijos funkcija [127] – išėjimo sluoksniui.

Svarbiausia U-net architektūros modifikacija pasiekama įvedant tekstūros bloką po kiekvieno vaizdo įvesties sluoksnio. Tekstūros blokas sukuria du lygiagrečius srautus modelio skaičiavimo grafe. Vienas bloko srautas yra nuoseklus plačių (standartinių) konvoliucinių sluoksnių jungimas, o kitas srautas prasideda nuo siauro konvoliucinio sluoksnio (turinčio tik vieną neuroną), kuris, tikimasi, sukurs ribojimą architektūroje ir privers skleisti skirtingus konvoliucinius požymius. Abiejų srautų požymiai sujungiami bloko išvestyje ir turi lygiavertę reikšmę modelio mokymuisi. Adam optimizatorius buvo naudojamas siekiant minimizuoti bendrą Dice ir binarinės kryžminės entropijos klaidos funkciją [128, 129]. Mokymo fazė buvo nutraukiama, kai validavimo imties klaidos funkcija nepagerinama 20 epochų iš eilės.

Branduolių klasifikatoriai. Ląstelių branduolių klasifikavimo problema buvo sprendžiama naudojant RDF, MLP ir CNN klasifikatorius. RDF ir MLP buvo apmokyti linearizuotais branduolių vaizdų vektoriais (3072-mačiais), o CNN – tiesiogiai branduolių vaizdais.

Segmentavimo modelio rezultatai. Eksperimentai parodė, kad modelio konvoliucinių sluoksnių plėtimas (16, 32, 48 neuronai kiekviename konvoliuciniame sluoksnyje) neturi didelės įtakos segmentavimo tikslumui vaizdo taškų lygyje (Dice koeficientas 0,80–0,81 ribose). Tačiau modeliui apmokyti naudotas papildomas aktyvaus kontūro sluoksnis branduolių anotacijose, kuris leido pasiekti tikslesnį branduolių segmentavimą pagal visas objektų lygio vertinimo metrikas (tikslumas – 0,75 lyginant su 0,73, taiklumas – 0,85 lyginant su 0,84, atkūrimas – 0,86 lyginant su 0,85, F1-įvertis – 0,85 lyginant su 0,84).

Nustatyta, kad geriausiai veikiantis branduolių segmentavimo modelis naudoja ELu aktyvacijas paslėptuose tinklo sluoksniuose,

sigmoidinę aktyvaciją išėjimo sluoksnyje, 16 neuronų kiekviename konvoliuciniame sluoksnyje, 0,2 iškritimo dažnį, apmokant modelį anotacijomis su papildomu aktyvaus kontūro sluoksniu.

Klasifikatorių rezultatai. Per eksperimentus MLP su 4096/2048/1024 sluoksnių konfigūracija ir ReLu aktyvacijomis [127] paslėptuose sluoksniuose, 2 imties normalizavimo sluoksniais, 0,2 iškritimo dažniu ir softmax išvesties aktyvinimo funkcija pasiekė aukščiausią klasifikavimo tikslumą – 0,78 (palyginimui RDF – 0,77, o CNN – 0,76). MLP klasifikavimo modelio supainiojimo matrica rodo, kad iš 2046 limfocitų 84,85 % teisingai identifikuoti kaip limfocitai, o 15,15 % – klaidingai identifikuoti kaip kitos klasės branduoliai. Iš 2235 kitos klasės branduolių 99,4, t. y. 2 %, teisingai identifikuoti kaip kitos klasės, o 0,58 % – klaidingai identifikuoti kaip limfocitai.

Viso metodo rezultatai. Pasiūlytas limfocitų identifikavimo metodas yra dviejų pakopų algoritmas – branduolių segmentavimo modelis ir segmentuotų branduolių klasifikatorius. Jis išbandytas su viešuoju limfocitų duomenų rinkiniu (JAN). Rezultatai parodė, kad segmentavimo modelis gerai aptinka visus vaizduose esančius branduolius (vertinta vizualiai), tačiau klasifikatorius jautriai reaguoja į HE dažymo intensyvumą ir prasčiau išskiria limfocitų branduolių klasę, todėl prieš klasifikavimo žingsnį įvestas Reinhard spalvų norminimas [130], o tai leido gauti 0,1 (10 %) aukštesnį limfocitų identifikavimo tikslumą (žr. 4.3 lentelę).

4.3 lentelė Limfocitų identifikavimo rezultatų palyginimas.

	Tikslumas	Taiklumas	Atkūrimas	F1
Pasiūlytas metodas	0,71	0,76	0,75	0,70
Pasiūlytas metodas su spalvų norminimu	0,81	0,80	0,81	0,80
Janowczyk ir Madabhushi (2016) [86]	–	0,89	–	0,90
Alom ir kt. (2019) [87]	0,90	–	–	0,91

Tas pats duomenų rinkinys naudotas kitų autorių apmokant ir vertinant jų siūlomus modelius Janowczyk [86], ir Alom [87] (autoriai bandymams rezervavo 10 % duomenų rinkinio). Pasiūlytas metodas visą šį duomenų rinkinį naudojo išskirtinai tik įsivertinimui. Pasiiektas rezultatas (F1-įvertis = 0,80) rodo geras metodo generalizacijos savybes ir pasiekia sulyginamą tikslumą su kitų autorių metodais.

Skirias išvados. Pasiūlytas giliuoju mokymu pagrįstas metodas ląstelių branduoliams segmentuoti ir limfocitams identifikuoti HE dažytuose krūties ir kolorektalinio vėžio navikų audinių PKV. Metodas pademonstravo geras generalizacijos savybes. Atlikti eksperimentai rodo, kad:

Pasiūlytas FCNN architektūros struktūrinis elementas – konvoliucinės tekstūros blokas, leidžia pasiekti Dice branduolių segmentavimo įvertį, panašų į moderniausių modelių. Siūlomas modelis yra mažesnio sudėtingumo ir pasiekė 1 % aukštesnį testavimo Dice koeficientą. Be to, papildomas aktyvaus kontūro sluoksnis branduolių anotacijose padidina tiek vaizdo taškų lygio branduolių segmentavimo tikslumą (Dice koeficientas pakyla nuo 0,80 iki 0,81), tiek objekto lygio tikslumą (F1-įvertis pakyla nuo 0,84 iki 0,85).

Siūlomu metodu pasiekiamas 0,78 limfocitų klasifikavimo tikslumas privačiame duomenų rinkinyje (TCGA + CRCHP) ir 0,71 viešame duomenų rinkinyje (0,81 su Reinhard spalvų norminimu), kuris sulyginamas su pažangiausiai limfocitų aptikimo metodais. Pasiiektas rezultatas rodo geras modelio generalizacijos savybes ir papildomai užtikrina limfocitų segmentavimo galimybę.

5. KOLAGENO STRUKTŪRŲ SEGMENTAVIMAS

Šiame skyriuje nagrinėjamas kolageno skaidulinių struktūrų segmentavimas iš įprastų krūties naviko audinio šviesaus lauko histologinių vaizdų, naudojant FCNN modelį. Kolagenas yra trečiasis šiame darbe nagrinėjamas taikiny, atsirandantis iš navikų mikroaplinkos. Kolagenas yra pagrindinis TME komponentas, turintis milžinišką kietojo naviko diagnostikos potencialą. Tačiau, kiek mums

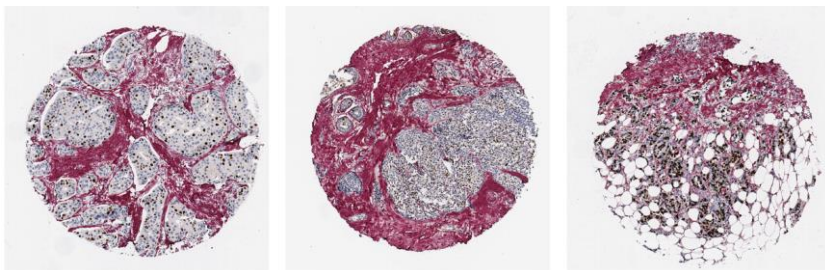
žinoma, kolageno struktūros vertinimui trūksta metodų, kurie nebūtų visiškai priklausomi nuo specializuotų ir brangių vaizdinimo būdų. Šis faktas įkvepia ir motyvuoja ieškoti patikimų ir prieinamų metodų, leidžiančių įvertinti biologinę kolageno architektūroje esančią informaciją iš lengvai prieinamų šviesinės mikroskopijos vaizdų (įprastai naudojamų diagnostinėje patologijoje visame pasaulyje). Dėl savo sudėtingos struktūros ir gausos jungiamajame audinyje, pluoštinį kolageną yra gana sudėtinga anotuoti rankiniu būdu. Netgi yra sudėtinga apibrėžti kolageną kaip segmentavimo užduoties tikslą. Todėl šiame eksperimente kolagenui išryškinti krūties navikų audiniuose naudojamas kitas dažnas audinių dažymo metodas – Sirijaus raudonasis (SR) dažymas. Šio eksperimento metu įgytos žinios bus pritaikytos 6 skyriuje, siekiant toliau tirti ir išbandyti kolageno segmentavimą įprastai HE dažytuose navikų audinių PKV.

Eksperimento dizainas. Pirmoji šiame skyriuje nagrinėjama užduotis yra anotacijų generavimas kolagenui segmentuoti. Iš 48 navikų vaizdų atsitiktinai generuojamas 116 nepersidengiančių 256×256 taškų dydžio vaizdo stačiakampių rinkinys. Anotacijos gaunamos iš trijų skirtingų šaltinių (du visiškai rankiniai anotavimai ir vienas pusiau automatinis). Žmogaus vizualaus suvokimo veikiamas šališkumas anotuojant duomenis atskleidžiamas Bland-Altman skirtumų analizėje [131, 132], o anotacijose sutampanti informacija atskleidžiama orientuotų gradientų histograma (HOG [133]).

Kolageno segmentavimo užduočiai spręsti pagrindiniu modeliu pasirenkama U-net architektūra. Skaidulinis kolagenas pasižymi išskirtine tekstūra, todėl U-net architektūra modifikuojama papildomu tekstūros bloku (pristatytas 4 skyriuje). Trys modeliai yra apmokomi skirtingai anotuotais vaizdo stačiakampiais. Kolageno skaidulinės struktūros segmentuojamos visais apmokytais modeliais visame 92-jų navikų audinių vaizdų rinkinyje. Skirtingų ekspertų anotacijomis apmokytų modelių segmentavimo rezultatai palyginami sankirtos virš sąjungos, persidengimo ir plotų santykio analizėje. Vėliau iš kolageno segmentavimo žemėlapių (CSM, iš angl. *collagen segmentation map*) gaunami kolageno skaidulų morfometrijos, tankio, orientacijos,

tekstūros ir fraktaliniai požymiai. Norint suprasti bendras kolageno struktūrų architektūros savybes, atliekama faktorių analizė [120]. Kolageno skaidulų požymiams, susijusiems su pacientų prognoze, atskleisti taikomas Kaplan-Meier įverčių modeliavimas [134]. Dispersijos analizė (ANOVA) ir Tukey HSD post hoc reikšmingų skirtumų testas [135] yra naudojami siekiant atskleisti reikšmingus kolageno struktūrų požymių skirtumus krūties navikų histologinėse grupėse. Galiausiai, atliekant Cox regresijos analizę [136] gaunami pacientų prognozės modeliai, išskiriantys kolageno struktūrų požymius, turinčius nepriklausomą nuo gerai žinomų klinikinių rodiklių įtaką krūties vėžio pacientų prognozei.

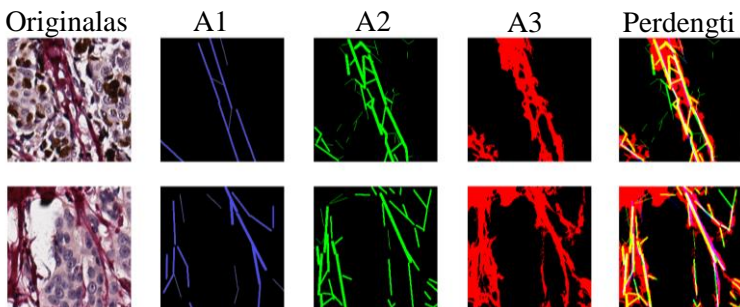
Duomenų rinkinys. Analizėms buvo naudojami naviko audinių mėginiai iš 92 pacientų. Lietuvos bioetikos komitetas patvirtino šį tyrimą (nuorodos numeris: 40, data 2007-04-26, atnaujinta 2017-09-12).



5.1 pav. Audinių mikrodalelių (TMA) mėginiai. Kiekvienos TMA dėmės skersmuo yra 1 mm.

Tyrimui buvo naudojami audinių mikrogardelių mėginiai (1 mm skersmens audinio fragmentas vienam pacientui). Pavieniai navikų vaizdai buvo centruoti 2800×2800 taškų vaizde (žr. 5.1 pav.).

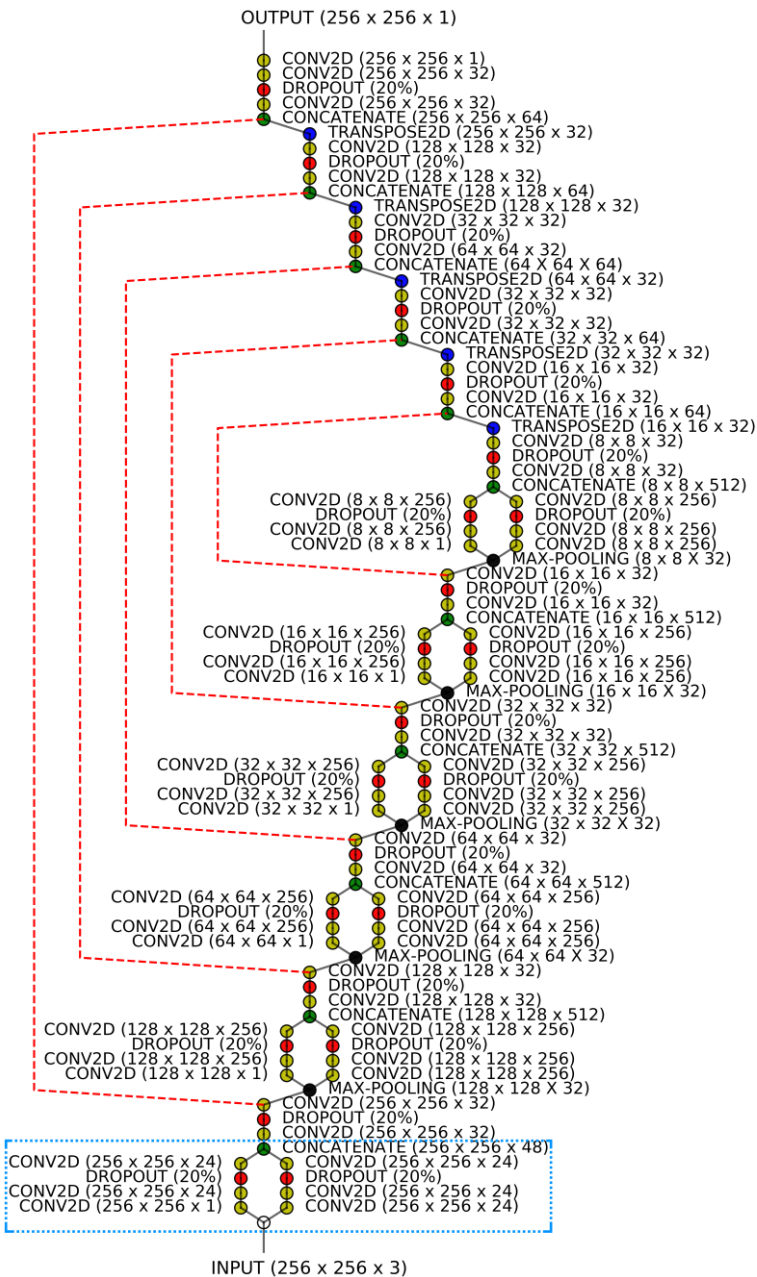
Iš 48 navikų vaizdų buvo atsitiktinai sugeneruotas 116 nepersidengiančių 256×256 taškų dydžio vaizdo stačiakampių rinkinys (žr. 5.2 pav.) ir anotuotas dviejų vienas nuo kito nepriklausomų ekspertų.



5.2 pav. Vaizdo anotacijų, gautų iš skirtingų šaltinių, pavyzdžiai.

Ekspertai galėjo apytiksliai pažymėti kolageno struktūros motyvus tiesiomis skirtingo storio linijomis (savo nuožiūra), o trečiasis anotacijų rinkinys sukurtas eksperto taikant vaizdams slenkstinį metodą bei rankinį kuravimą. Kairiajame 5.2 paveiklo stulpelyje pavaizduoti 256×256 taškų dydžio SR nudažyti krūties navikų vaizdų stačiakampiai, ir anotacijų kaukės – mažo detalumo (5.2 pav. A1) ir didelio detalumo (5.2 pav. A2) rankinės anotacijos bei pusiau automatiškai gautos (5.2 pav. A3). Anotuotų vaizdų rinkinys buvo išplėstas iki 696 vaizdo stačiakampių taikant augmentavimą apverčiant ir pasukant.

Segmentavimo modelis. Šiame tyrime originali U-net modelio architektūra modifikuota įvedant papildomą tekstūros bloką (pristatytas 4 skyriuje) architektūros enkoderio kelyje, po kiekvieno sutelkimo (pagal maksimumą) sluoksnio. Detali modelio schema pateikta 5.3 paveiksle. Modelis apmokytas naudojant Adam optimizatorių siekiant minimizuoti binarinės kryžminės entropijos klaidos funkciją. Anotuotų vaizdo stačiakampių duomenų rinkinys padalytas į mokymo (80 %) ir validavimo imtis (20 %). Mokymo fazė buvo nutraukiama, kai validavimo imties klaidos funkcija nepagerinama 20 epochų iš eilės.



5.3 pav. Detali modifikuotos U-net architektūros schema.

Trys modeliai (M1, M2, M3 – žr. 5.2 lentelę) apmokyti naudojant iš skirtingų šaltinių gautas anotacijas.

5.2 lentelė. Trys kolageno segmentavimo modeliai apmokyti remiantis skirtingų ekspertų pateiktų anotacijų rinkiniais.

Modelis	Mokymo vaizdai (256×256 taškų dydžio)	Mokymo kaukės (256×256 taškų dydžio)
M1	696 augmented vaizdo stačiakampiai (5.2 pav.	696 žemo detalumo anotacijų kaukės (5.2 pav. A1)
M2	Originalas) mokymo imtis: 556	696 aukšto detalumo anotacijų kaukės (5.2 pav. A2)
M2	validavimo imtis: 140	696 pusiau automatinių anotacijų kaukės (5.2 pav. A3)

Kolageno struktūrų segmentavimo principas. Navikų vaizdai buvo analizuojami iš dalies persidengiančiais 256×256 taškų dydžio vaizdo stačiakampiais, imamais iš originalaus vaizdo 128 taškų žingsniu. Segmentavimo modelis kiekvienam vaizdo stačiakampiui generuoja kolageno struktūros tikimybių žemėlapius, kuriems pritaikoma 0,5 slenkstinė vertė. Kolageno struktūrų predikcijos agreguotos į binarinius viso naviko vaizdo kolagenų struktūrų žemėlapius (CSM). Objektai, kurių plotas mažesnis nei 50 taškų, pašalinti.

Kiekybinių požymių išskyrimas. Kolageno struktūros buvo analizuojamos apskaičiuojant 37 požymius. Vaizdo elementų lygio požymiai – tokie kaip kolageno struktūros briaunų orientacija. Objektų (kolageno skaidulų) lygio požymiai – morfometriniai (formos) matavimai. Vaizdo lygio požymiai – viso CSM tekstūros charakteristikos (žr. 5.3 lentelę). Požymiai išskiriami visais trimis modeliais (M1, M2, M3) gautoms kolageno struktūroms atskirai.

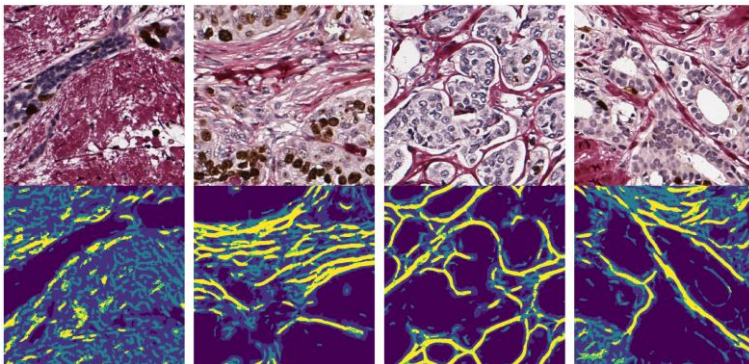
Ekspertų anotacijų nuoseklumo analizės rezultatai. Rankiniu būdu anotuotų duomenų Blando-Altmano analizė atskleidė reikšmingus detalumo lygio ir pažymėtų objektų orientacijos skirtumus (p-vertė > 0,05 visiems įvertinimams).

5.3 lentelė. Kolageno struktūrų požymiai.

Orientacija (vaizdo taškų lygio požymiai)		
LDM	Vidutinė kryptis (angl. <i>linear directional mean</i>)	
CV	Krypties dispersija (angl. <i>circular variance</i>)	
CSD	Krypties standartinis nuokrypis (angl. <i>circular standard deviation</i>)	
mMag	Vidutinis krypties stiprumas	
stdMag	Krypties stiprumo standartinis nuokrypis	
Morfometrija (skaidulų lygio požymiai)		
mFL	Ilgis (atstumas tarp galų)	Vidurkis
mdFL		Mediana
stdFL		Standartinis nuokrypis
mFP	Vidurio linijos ilgis	Vidurkis
mdFP		Mediana
stdFP		Standartinis nuokrypis
mFS	Tiesumas (ilgio ir vidurio linijos santykis)	Vidurkis
mdFS		Mediana
stdFS		Standartinis nuokrypis
mFW	Plotis	Vidurkis
mdFW		Mediana
stdFW		Standartinis nuokrypis
Tankis (skaidulų lygio požymiai)		
FD	Tankis	taškų skaičius kaukėje
nENDP	Galinių taškų skaičius	
mD	Atstumas tarp visų galinių taškų	Vidurkis
mdD		Mediana
stdD		Standartinis nuokrypis
Tekstūra (vaizdo lygio požymiai)		
13 R. Haraliko tekstūros charakteristikų – energija, kontrastas ir kt. [119]		
Fraktalinės savybės (vaizdo lygio požymiai)		
Fraktalinė dimensija		
Lakunariškumas		

Modelio prognozavimo nuoseklumo analizės rezultatai. Skirtingai anotuotais duomenimis apmokyti modeliai (M1, M2, M3) pasiekė gerą prognozavimo sutapimą, pasiekiantį 0,6 pagal sankirtą virš sąjungos. Persidengimo analizė rodo, kad M1 kolageno žemėlapiai yra didele dalimi (daugiau kaip 95 %) uždengiami M2 ir M3, o segmentuotų kolageno struktūrų plotų santykis svyruoja nuo 0,5 iki 1,2.

Išsegmentuotų kolageno struktūrų vizualinės analizės rezultatai. M3 segmentavimo modelio CSM dažniausiai užfiksuoja kolageno sankaupas, M1 ir M2 modelių segmentacijose kolageno struktūros susideda iš pavienių struktūrinių elementų, besiskiriančių skaičiumi ir išvaizda.



5.4 pav. CSM pavyzdžiai. Kolageno karkaso segmentavimo kaukės (apatinė eilutė), ištrauktos iš TMA vaizdų (viršutinė eilutė).

Skirtingų modelių CSM perdangoje (5.4 pav.) ryškiai geltona spalva nurodo regionus, kuriuos prognozuoja visi 3 modeliai (M1, M2 ir M3), o tamsiausia mėlyna spalva rodo foną. Šviesesni mėlynos atspalviai rodo M2 ir M3 predikcijas.

Kolageno struktūrų požymių faktorių analizės rezultatai atskleidžia latentinius ryšius, nusakančius kolageno organizavimą krūties navikuose. Aštuoni nepriklausomi faktoriai (su eigenvertėmis ≥ 1) paaiškina 86,2 % variacijų duomenyse. Požymiai, gauti iš visų trijų skirtingai apmokytų segmentavimo modelių (M1, M2, M3), susijungia tuose pačiuose faktoriuose. Tankio požymiai (mD, stdD, žr. 5.5 B pav.) sudaro 3 faktorių (paaiškina > 10 % duomenų variacijų), o 6 ir 7 faktoriuose atitinkamai susijungia lakuniškumo (lac) ir orientacijos (CSD) požymiai (abu paaiškina po ~ 7 % duomenų variacijų). Šie rezultatai atitinka kitais tyrimais pastebėtus kolageno organizavimo audiniuose principus [137, 138].

Kolageno požymių skirtumų navikų grupėse analizės rezultatai atskleidė statistiškai reikšmingus kolageno struktūrų požymių skirtumus tarp naviko diferenciacijos laipsnio grupių. Visų modelių kolageno struktūrų požymiai leido patikimai (remiantis ANOVA testu su $p < 0,05$) išskirti agresyvių navikų grupę.

Prognozinio modeliavimo rezultatai parodė, kad požymiai, išskirti iš įprastų šviesinės mikroskopijos vaizdų, leidžia patikimai suskirstyti krūties vėžio pacientus į skirtingos prognozės grupes. Surasti kolageno struktūrą nusakantys požymiai gauti iš kiekvieno skirtingai apmokyto segmentavimo modelio (M1, M2, M3), kuriais remiantis galima patikimai prognozuoti krūties vėžio pacientų prognozę – tikėtiną bendrą išgyvenimo laiką (visi gauti prognoziniai modeliai su $p < 0,05$).

Skyriaus išvados. Pasiūlytas modifikuota FCNN architektūra pagrįstas navikų mikroaplinkos kolageno segmentavimo principas. Skirtingai apmokyti modeliai leido gauti gerai atitinkančias kolageno segmentavimo kaukes. Vidutinis viso duomenų rinkinio kolageno segmentacijų sankirtos virš sąjungos rodiklis svyravo nuo 0,4 iki daugiau kaip 0,6, vidutinis segmentacijų plotų santykis svyravo nuo 0,5 iki 1,2, o vidutinis segmentacijų persidengimas svyravo nuo 0,6 iki 1,0.

Faktorių analize patvirtintas kolageno struktūrų organizavimą navikų audiniuose nusakančių principų atitikimas su gerai žinoma kolageno parašų paradigma. Aštuoni nepriklausomi faktoriai (su eigenvertėmis ≥ 1) paaiškina 86,2 % duomenų dispersijos. Visų vertintų modelių tankio, fraktalų ir orientacijos požymiai susijungia ortogonaliai nepriklausomuose veiksmuose (su koreliacijos koeficientais $> 0,7$).

Iš kolageno struktūrų architektūros išskirti požymiai reikšmingai skyrėsi ($p < 0,05$) tarp naviko diferenciacijos laipsnio grupių. Šis faktas rodo, kad visi segmentavimo modeliai nepriklausomai (skirtingais požymiais) nusako agresyvių navikų augimą.

Atsižvelgiant į tai, kaip sudėtinga apibūdinti kolageną šviesinės mikroskopijos vaizduose, biologinis išsegmentuotų kolageno

struktūrų prasmingumas turėjo būti įrodytas prognozinium modeliavimu. Morfometriniai kolageno segmentacijų požymiai, išskirti visų skirtingai apmokytų CNN modelių, leido pasiekti patikimus prognozinius modelius (su tikėtinumo santykiu intervale 14,11–22,99 ir $p < 0,05$), o krūties vėžiu sergančių pacientų prognozavimui nereikėjo jokių įprastinių klinikinių-patologinių rodiklių.

6. KELIŲ KLASIŲ HISTOPATOLOGIJOS OBJEKTŲ SEGMENTAVIMAS NAVIKŲ KLASIFIKAVIMUI

Ankstesni skyriai apėmė skirtingų histologinių objektų navikuose aptikimą, segmentavimą ir klasifikavimą: 3 skyrius nagrinėjo navikų audinių vaizdų klasifikavimą į du pagrindinius tipus – naviko epitelį ir stromą, 4 skyrius pristatė imuninio infiltrato (limfocitų) aptikimą ir tikslų segmentavimą, o 5 skyrius įvedė metodą skaidulinio kolageno struktūrų segmentavimui navikų mikroaplinkoje. Šis skyrius skirtas iširti iškart kelių histopatologinių objektų segmentavimą iš įprastų krūties navikų audinių šviesinės mikroskopijos histologinių vaizdų, naudojant FCNN parentą modelį. Motyvacija atlikti išsamią naviko dekonstrukciją į histologinius primityvus kyla iš siekio gebėti formuluoti pacientams taikomus medicininius sprendimus vadovaujantis objektyviai, tiksliai ir standartizuotai nustatytais mikroskopinių ligos apraiškų fenotipais.

Ekspimento dizainas. Šis skyrius pristato metodą, leidžiantį vienu metu segmentuoti ir identifikuoti limfocitų branduolius ir tankius imuninius infiltratus, naviko ląstelių branduolius ir naviko audinio zoną, stromos ląstelių branduolius ir stromos audinių zoną bei navikų mikroaplinkos kolageno struktūras iš HE dažytų krūties navikų audinių PKV.

Pirmiausia, pasiūloma vaizdo regionų atrankos tyrimui strategija, taikant audinių detektorius. Iš pilno kadro vaizdų sugeneruojamas mokymo duomenų rinkinys, vienodai reprezentuojantis įvairius audinių tipus, siekiant segmentavimo modelį mokyti kuo įvairesniais

vaizdais. Paruoštas 256×256 taškų dydžio vaizdo stačiakampių duomenų rinkinys kruopščiai anotuojamas eksperto išskiriant keturias objektų klases – limfocitų branduolius, naviko ląstelių branduolius, stromos ląstelių branduolius ir kolageno skaidulas. Kiekvieno vaizdo, kiekvienos klasės anotacijų kaukės agreguojamos į vieną daugiasluoksnę anotacijų kaukę. Papildomai automatiškai generuojami dar keturi anotacijų sluoksniai – kiekvieno tipo branduoliams (ir visiems branduoliams kartu), užpildant erdvę tarp tankiai išsidėsčiusių branduolių.

Tuomet pasiūloma U-net tinklo modifikacija, naudojanti daugiasluoksnes anotacijų kaukes ir daugiasluoksnę modelio predikcijų išvestį. Modelis leidžia vienu metu segmentuoti kelių klasių histologinius objektus. Šiam tikslui pritaikomas U-net modelis detaliai aprašytas 5 skyriuje (5.3 pav.). Modelis apmokomas minimizuojant svertinę kompleksinę klaidų funkciją.

Segmentuoti histologiniai objektai charakterizuojami iš segmentavimo kaukių išgaunant 20-ies morfometrinių audinio požymių rinkinį, tokių kaip branduolių tankis, kolageno skaidulų geometrija, orientacija, tankis ir tekstūra.

Norint išanalizuoti visą naviko audinį, užfiksuotą PKV naudojamas audinių detektorius, gaunamos viso naviko audinio regionų (256×256 taškų dydžio) koordinatės ir segmentavimui pateikiamas kiekvienas audinio regionas. Segmentuotų histologinių objektų morfometrinės savybės agreguojamos į požymių žemėlapius. Norint sugeneruoti visą naviko audinį apibendrinančias patologijos tyrimo išvalgas taikomas mašininis mokymas. MM algoritmams apmokyti visada reikalingi struktūrizuoti duomenys. Nors pasiūlyti morfometriniai žemėlapiai yra labai informatyvūs ir gali būti intuityviai vertinami vizualiai, dėl skirtingų vaizdo plokštumos dydžių, skirtingų audinio formų bei skirtingo išdėstymo mikropreparate PKV negalima laikyti struktūrizuotais duomenimis. Dėl tų pačių priežasčių pasiūlytas morfometrinis žemėlapis, kaip PKV atvaizdas, negali būti tiesiogiai naudojamas MM klasifikatoriuose.

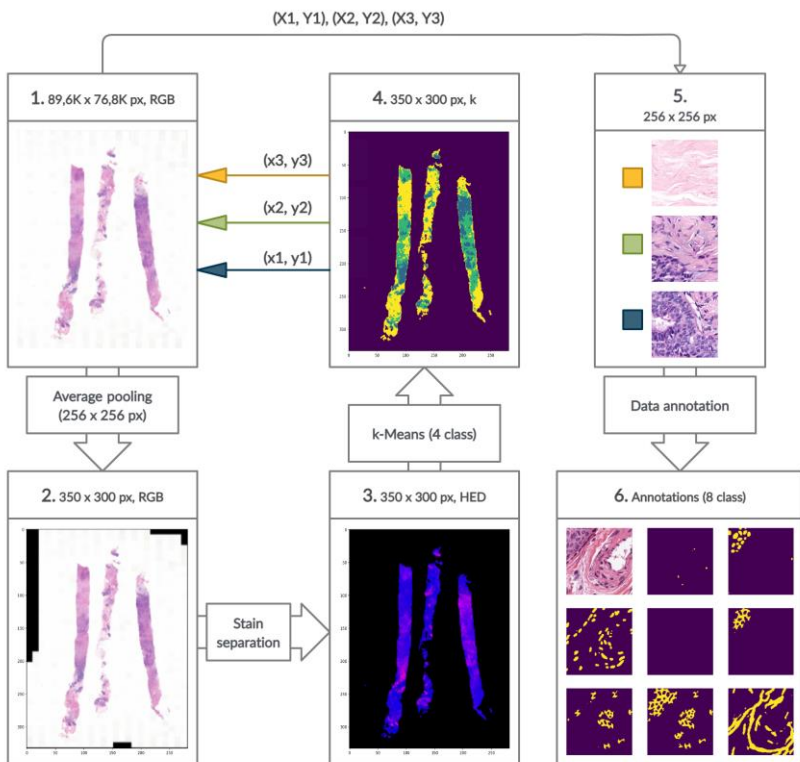
Šiai problemai spręsti, siūloma erdvinius ryšius tarp histologinių objektų išsauganti PKV transformacija.

Pasiūlytas metodas išbandytas tarptautiniame iššūkyje, kuriame buvo iškeltas uždavinys iš rutininių HE PKV vaizdų nuspėti specifinio krūties navikų biožymens HER2 būseną. HER2 būsena – vienas iš galutinių krūties navikų patologijos tyrimo rezultatų, galiojantis visam navikui ir skirtas atrinkti pacientus, kuriems bus naudinga taikinių terapija. Atliekant diagnostinį krūties navikų tyrimą, šis rezultatas gaunamas tik naudojant papildomus ir specifinius audinių dažymo būdus, o tai reiškia, kad srities ekspertas, gydytojas patologas, negali patikimai spręsti dėl HER2 biožymens būsenos vien iš audinių morfologijos, užfiksuotos rutininiuose HE nudažytuose mikropreparatuose.

Kiekvienam PKV mokymo ir testavimo rinkiniuose sukuriama PKV projekcijos taikant pasiūlytą metodą. Norint numatyti HER2 biožymens būseną, PKV projekcijomis apmokomas gilusis neuroninis tinklas (pasirinkta Xception [139] architektūra) ir pritaikomas nuspėti HER2 būseną testavimo rinkinio PKV.

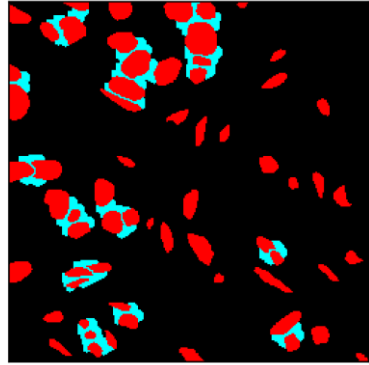
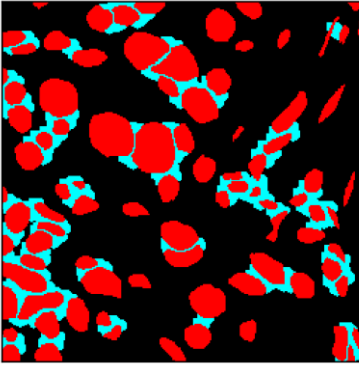
Duomenų rinkinys. Šiame eksperimente naudotas 510 HE dažytų krūties vėžio navikų audinių PKV rinkinys. Vaizdai buvo gauti iš „The HEROHE Challenge“ [140] iššūkio. Organizatoriai pateikė du PKV duomenų rinkinius – apmokymo rinkinį, kurį sudarė 360 atvejų (144 HER2 teigiami), ir testavimo rinkinį, sudarytą iš 150 nežinomo HER2 būsenos atvejų, MIRAX duomenų formatu.

Bendra duomenų paruošimo schema pateikta 6.1 paveiksle. Pirmiausia, sukuriama audinių žemėlapis, kuriame atvaizduotos trys apytikriai numatytos audinių zonos: navikas, stroma ir tarpinė zona, kurioje susimaišo navikas ir stroma. Kiekvienas audinių žemėlapio taškas (6.1 pav., 4 langelis) atitinka 256×256 taškų dydžio vaizdo stačiakampį originaliame PKV (6.1 pav., 5 langelis).



6.1 pav. Duomenų rengimo schema.

Duomenų anotavimas. Iš šešių PKV imamas 126 atsitiktinių 256×256 taškų dydžio vaizdo stačiakampių rinkinys ir pateikiamas ekspertui anotuoti, išskiriant keturias objektų klases – limfocitų branduolius, naviko ląstelių branduolius, stromos ląstelių branduolius ir kolageno skaidulas. Be to, automatiškai sugeneruoti papildomi keturi anotacijų sluoksniai – užpildant spragas tarp tankiai išsidėsčiusių branduolių (6.1 pav., 6 langelis). Tarpbranduolinės erdvės užpildymo procedūra taikoma kiekvieno tipo branduolių kaukėms – atskirai limfocitams, naviko ląstelėms, stromos ląstelėms ir bendrai visų tipų branduoliams.



6.2 pav. Branduolių anotacijų kaukių pavyzdžiai. Arti vienas kito esantys branduoliai nustatomi automatiškai ir tarp jų esanti erdvė užpildoma, sukuriant atskirą anotacijų sluoksnį.

Modifikuota U-net segmentavimo modelio architektūra.

Modifikuota U-net modelio architektūra (aprašyta 5 skyriuje) pritaikyta taip, kad išvestų 8 sluoksnių segmentavimo žemėlapi (po vieną segmentavimo sluoksnį kiekvienai rankinių anotacijų klasei ir po vieną – kiekvienai automatiškai sugeneruotai klasei. Modelis apmokytas naudojant Adam optimizatorių siekiant sumažinti svertinę kompleksinę klaidos funkciją (žr. 6.2 formulę) – skirtingomis svertinėmis vertėmis subalansuotą klaidų funkcijų derinį – sankirtos virš sąjungos (žr. 6.1 formulę), binarinės kryžminės entropijos, vidutinės kvadratinės paklaidos ir bendrosios dispersijos klaidų funkcijas [129, 141].

$$IoUL = 1 - \frac{TP}{FP+TP+FN} \quad (6.1),$$

$$loss = w1 * BCL + w2 * MSE + w3 * TVL + w4 * IoUL \quad (6.2),$$

kur BCL – binarinės kryžminės entropijos klaida, MSE – vidutinė kvadratinė paklaida, TVL – bendros dispersijos klaida, IoUL – sankirtos virš sąjungos klaida.

Modelis mokytas apsunkintomis sąlygomis – duomenų rinkinys padalytas į mokymo ir validavimo imtis santykiu 1:1, daugiau įtakos perkeliant į validavimo etapą. Algoritmas nustatytas nutraukti mokymo fazę po to, kai validavimo klaida nepagerėja 100 epochų iš eilės arba praėjus 200 epochų.

Mokymų metu išrinktas geriausių rezultatą užtikrinęs (didžiausią vidutinį visų klasių segmentavimo tikslumą IoU 0,6849) kompleksinės klaidų funkcijos svertinių reikšmių rinkinys: $w_1 = 2$, $w_2 = 1$, $w_3 = 0,1$, $w_4 = 2$.

Apmokytu modifikuotu U-net modeliu segmentuojami visi PKV vaizdo stačiakampius iš originalo imant pagal sugeneruotus audinių žemėlapius (6.1 pav., 4 langelis) iš viso audinio ploto.

Audinių morfometrija. Morfometrija buvo taikoma visiems segmentavimo rezultatams, sukuriant 20 histologinio audinio požymių rinkinį (žr. 6.1 lentelę). PKV morfometriniai požymiai suagreguojami į morfometrinius žemėlapius, kurių 1 taškas atitinka 256×256 taškų dydžio regioną originaliame PKV.

PKV transformacija. Kad mašininio mokymo klasifikatoriais būtų galima klasifikuoti pilnus navikų audinių vaizdus, įvedama PKV transformacija į fiksuoto dydžio (pakankamai mažo dydžio) vaizdo projekciją. Siūloma PKV projekcija remiasi kovariacijos matricos principu. Kiekvienas ankstesniame etape sugeneruoto morfometrinio žemėlapio taškas atitinka tam tikrą audinio plotą originaliame naviko PKV, kurį galima apibrėžti pagal jame esančio naviko audinio dalį (t %) ir jį supančio stromos audinio (s %) dalį. Kadangi t % ir s % yra procentinės išraiškos, projekcija visada bus 100×100 masyvas, o t % ir s % nustato taško vietą projekcijoje. Didelių ir nevienodų vaizdo plokštumos matmenų PKV vaizdavimas mažoje projekcijos plokštumos erdvėje lemia didelį dimensijų padidėjimą. Projekcija užpildoma vertėmis sluoksnis po sluoksnio iš kiekvieno morfometrinio žemėlapio požymių sluoksnio. Taškai, kurių t % ir s % deriniai yra vienodi, į PKV projekciją agreguojami pagal vidurkį, medianą ir standartinę nuokrypį. Tokiu būdu PKV vaizduojama 100×100×60 matmenų projekcija.

6.1 lentelė. Morfometrinių požymių sąrašas.

Branduolių tankis	Šaltinis
Limfocitų branduolių tankis	Limfocitų segmentavimo kaukė
Naviko ląstelių branduolių tankis	Naviko branduolių segmentavimo kaukė
Stromos ląstelių branduolių tankis	Stromos branduolių segmentavimo kaukė
Audinių plotas	
Imuninio infiltrato plotas	Limfocitų segmentavimo kaukė, limfocitų tarpląstelinė erdvė
Naviko audinio plotas	Naviko branduolių segmentavimo kaukė, naviko branduolių tarpląstelinė erdvė
Stromos audinio plotas	Stromos branduolių segmentavimo kaukė, stromos branduolių tarpląstelinė erdvė
Bendras audinio plotas	Visų branduolių tipų ir tarpląstelinės erdvės kaukės
Kolageno gijų orientacija	
Krypties dispersija (angl. <i>circular variance</i>)	Kolageno gijų kaukė
Krypties standartinis nuokrypis (angl. <i>circular standard deviation</i>)	
Vidutinis krypties stiprumas	
Krypties stiprumo standartinis nuokrypis	
Kolageno gijų morfometrija	
Vidutinis gijos ilgis	Kolageno gijų kaukė
Vidutinis gijos vidurio linijos ilgis	
Vidutinis gijos tiesumas	
Vidutinis gijos plotis	
Kolageno gijų tankis	
Vaizdo taškų skaičius kaukėje	Kolageno gijų kaukė
Galinių taškų skaičius	
Vidutinis atstumas tarp visų galinių taškų	
Kolageno gijų tekstūra	
Koreliacija	Kolageno gijų kaukė
Entropija	

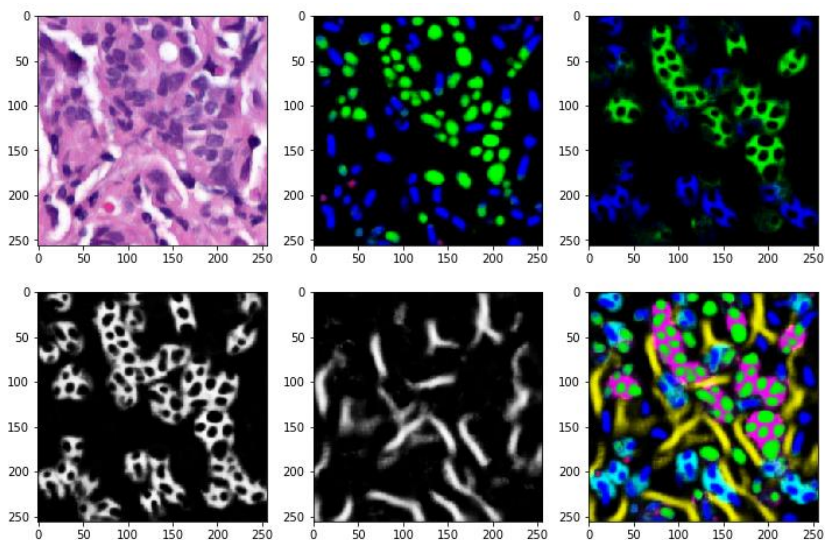
PKV projekcijos vis dar yra tiesiogiai interpretuojamos ir iš esmės išlaiko vizualų morfometrinių žemėlapių paprastumą. Pažymėtina,

kad šis PKV atvaizdavimas struktūrizuoja skirtingo dydžio vaizdus ir leidžia jais apmokyti iš esmės bet kurį MM klasifikatoriaus modelį.

PKV klasifikavimas. Xception [139] modelis apmokytas numatyti naviko HER2 biožymens būseną iš PKV projekcijos. Mokymo duomenų rinkinys atsitiktinai suskirstytas į mokymo (80 %) ir validavimo (20 %) imtis ir apmokytas minimizuojant binarinę kryžminės entropijos klaidą. Algoritmas nustatytas nutraukti mokymo fazę po to, kai validavimo klaida nepagerėjo 20 epochų iš eilės.

Rezultatai. Norint numatyti naviko HER2 būklę, PKV buvo analizuojami šiame skyriuje pasiūlytu metodu – kiekvienam PKV mokymo ir testavimo rinkiniuose sukurti morfometriniai žemėlapiai, sugeneruotos PKV projekcijos ir jomis apmokytas gilusis neuroninis tinklas Xception. Po klasifikatoriaus apmokymo nustatytas testavimo rinkinio vaizdų HER2 statusas.

Segmentavimo rezultatai. Išmokytas segmentavimo modelis įvertintas su 20 papildomai anotuotų 256×256 vaizdo stačiakampių.



6.3 pav. Segmentavimo rezultatai.

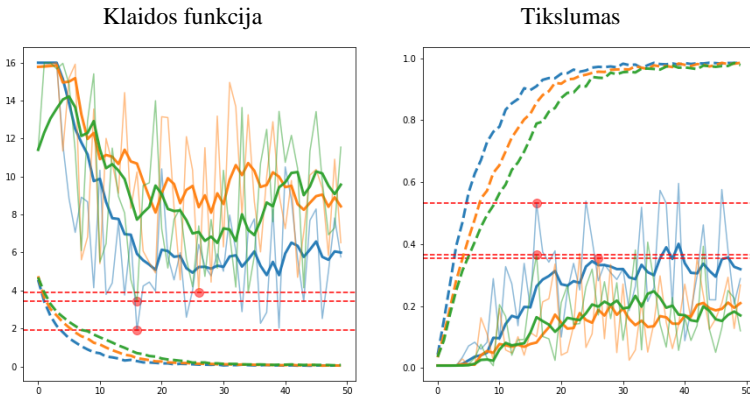
Vizualų segmentavimo kaukių pavyzdį galima įvertinti 6.3 paveiksle, o keturių rankiniu būdu anotuotų objektų klasių segmentavimo efektyvumo metrika pateikta 6.2 lentelėje.

6.2 lentelė. Segmentavimo modelio efektyvumo metrika.

	Tikslumas	Taiklumas	Atkūrimas	F1	IoU
Limfocitai	0,9970	0,8770	0,7251	0,7827	0,6642
Naviko branduoliai	0,9942	0,8652	0,9357	0,8743	0,8264
Stromos branduoliai	0,9807	0,8322	0,8177	0,8182	0,7029
Kolageno gijos	0,9309	0,5060	0,8891	0,6127	0,4715

Klasifikavimo rezultatai. Kaip HER2 statuso klasifikatorius PKV projekcijomis apmokytas Xception architektūros modelis, naudojant apmokymo rinkinį, sudarytą iš 360 PKV vaizdų (144 su teigiamu HER2 statusu). Mokymo duomenų rinkinys atsitiktinai padalytas į mokymo (280 PKV, 80 %) ir validavimo (80 PKV, 20 %) imtis, o modelio apmokymas išbandytas su trimis optimizatorius (žr. 6.4 pav.) – stochastiniu gradiento nusileidimu (SGD [142]), Adam [143] ir Adadelta [144] su numatytosiomis parametru reikšmėmis (pateikiama Keras bibliotekoje [145]).

Xception modelis, apmokytas naudojant SGD optimizatorių, pasiekė didesnę validavimo tikslumą (0,5327, po 16 epochų) už Adam (0,3645, po 16 epochų) ar Adadelta (0,3556, po 26 epochų) optimizatorius (žr. 6.4 pav.).



6.4 pav. Klasifikatoriaus mokymo metrika. Brūkšninė linija vaizduoja mokymo etapą, ištisinė linija – validavimo etapą (paryškintos validavimo kreivės rodomos kaip eksponentiniai slankieji vidurkiai, siekiant pabrėžti tendenciją). Raudoni taškai rodo paskutinį validavimo klaidos pagerėjimą. Mėlyna – SGD, žalia – Adam, oranžinė – Adadelta.

Metodo įvertinimas. Testavimo rinkinys, sudarytas iš 150 nežinomų HER2 būklės atvejų, išanalizuotas, kaip aprašyta šiame skyriuje, o rezultatai pateikti iššūkio organizatoriams įvertinti. Pažymėtina, kad iš 863 dalyvių tik 21 sugebėjo pateikti rezultatus, o tai rodo, kad pilnų PKV klasifikavimas navikų biožymenų būsenai prognozuoti nėra paprasta užduotis. Pasiūlytas metodas užėmė 6-tą vietą pagal tikslumą (0,535), 10-tą pagal AUC (0,628), tik 17-tą vietą pagal atkūrimą (0,383) ir 16-tą vietą pagal F1 įvertį (0,447).

Skyriaus išvados. Šiame skyriuje pristatyta į naviką orientuotų ir į naviko mikroaplinką orientuotų segmentavimo metodų integracija, panaudojant ankstesnių eksperimentų metu įgytą patirtį ir žinias.

Pristatytas generalizuotas segmentavimo metodas. Skirtingų histologinių objektų segmentavimas viename FCNN pagrįstame modelyje pasiektas pritaikant daugiasluoksnes anotacijų kaukes ir daugiasluoksnę modelio išvestį. Mokymų metu modelis pasiekė vidutinį daugiaklašį sankirtos virš sąjungos segmentavimo tikslumą – 0,6849.

Pasiūlyta patologijos pilno kadro vaizdo transformacija, leidžianti apmokyti gilųjį neuroninį tinklą bet kokio vaizdo plokštumos dydžio PKV vaizdais bei išlaikanti erdvinius ryšius tarp audinių klasių. Pasiūlyta transformacija leidžia pasiekti konkurencingus navikų biožymens būsenos prognozavimo rezultatus: 0,6276 AUC ir 0,4646 F1-įvertį.

7. BENDROSIOS IŠVADOS

Literatūros analizė atskleidė, kad skaitmeninėje patologijoje trūksta naviko mikroaplinkos objektams pritaikytų segmentavimo ir klasifikavimo metodų, ypač analizuojant įprastai patologijos diagnostikoje naudojamus HE dažytų audinių pilno kadro vaizdus.

Pristatytas vaizdo superelementais pagrįstas HE dažytų audinių PKV duomenų anotavimo metodas naviko epiteliui-stromai klasifikuoti. Tradiciniai klasifikatoriai, tokie kaip atraminiai vektoriai, atsitiktinių sprendimų miškas ir daugiasluoksnis perceptronas, pademonstravo gana panašių klasifikavimo rezultatų, svyruojančių nuo AUC 0,9533 iki 0,9666. Geriausią rezultatą pasiekė daugiasluoksnis perceptronas. Spalvų erdvė turi įtakos vaizdo superelementų klasifikavimo tikslumui. Pridėjus vaizdo superelementų spalvų požymius, klasifikavimo tikslumas pagal AUC padidėja nuo 0,9542 iki 0,9666, palyginti tik su tekstūros požymiais. Vis dėlto, geriausią AUC 0,9895 pasiekė ir geriausias generalizacijos savybes tarp visų tirtų klasifikatorių pademonstravo konvoliucinio neuroninio tinklo klasifikatorius, apmokytas vaizdais.

Pasiūlytas nesudėtingos konstrukcijos metodas, pasižymintis geromis ląstelių branduolių segmentavimo ir limfocitų klasifikavimą generalizuojančiomis savybėmis HE dažytų krūties ir kolorektalinio vėžio navikų PKV.

- Modifikuota supaprastinto U-net modelio architektūra, papildyta daugybiniais įvesties sluoksniais ir įdiegtais konvoliucinės tekstūros blokais leido gauti didesnę branduolių Dice segmentavimo tikslumą 0,80 už 0,78 ir 0,79, gautus atitinkamai naudojant U-net ir Micro-Net

modelius, apmokant modelius tik anotuotų branduolių kaukėmis. Papildomai pasiūlytos architektūros segmentavimo tikslumas padidintas iki 0,81, mokymui naudojant anotuotų branduolių kaukes, papildytas aktyvaus kontūro sluoksniu.

- Daugiasluksnis perceptronas pasiekė geriausią klasifikavimo tikslumą – 0,78, tarp tirtų limfocitų klasifikatorių, didesnę už atsitiktinio miškų klasifikatoriaus ir konvoliucinio neuroninio tinklo, atitinkamai siekiančius 0,77 ir 0,76.

- Pasiūlytas branduolių segmentavimo ir klasifikavimo metodas modifikuota U-net architektūra ir daugiasluksniu perceptronu išbandytas su viešuoju duomenų rinkiniu ir parodė geras generalizacijos savybes. Gautas 0,71 limfocitų klasifikavimo tikslumas pagerintas iki 0,81 pritaikius spalvų normalizavimo procedūrą. Gauti rezultatai lyginami su pažangiausiai limfocitų aptikimo metodais, tačiau papildomai suteikia limfocitų segmentavimo galimybę.

Pasiūlyta gilus neuroninio tinklo architektūra naviko mikroaplinkos kolageno segmentavimui.

- Labai skirtingomis anotacijomis nepriklausomai apmokyti modeliai pasiekė gerai sutampančius kolageno segmentavimo rezultatus, siekiančius iki 0,4–0,6 vertinant pagal IoU, 0,5–1,2 – pagal plotų santykį ir 0,6–1,0 – pagal persidengimą. Analizė atskleidė, kad naviko diferenciacijos laipsnį – savybę, kurią įprastoje praktikoje tik vizualiai nustato gydytojas patologas, galima nustatyti ir pagal kolageno požymius. Apmokyti modeliai unikalčiai nusako agresyvų naviko augimą, išryškindami skirtingus kolageno požymius skirtingose navikų grupėse, kaip nustatyta ANOVA testu su $p < 0,05$. Po segmentavimo atlikta faktorių analizė patvirtino pagrindinius kolageno organizavimo audiniuose principus.

- Kolageno požymiai, tokie kaip skaidulų orientacija ir morfometrija, šiuo metu prieinami tik naudojant specializuotus audinių vaizdinimo metodus, gauti iš kolageno segmentavimo žemėlapių, sugeneruotų pasiūlytu metodu, o jų patikimumas patvirtintas prognostiniais modeliais su gautu tikėtimumo santykiu

intervale 14,11–22,99, esant $p < 0,05$. Rezultatai rodo, kad pirmiau paminėti požymiai, atlikus kruopštų validavimą, gali būti pritaikyti patologijos diagnostikoje.

Kolagenui segmentuoti pasiūlyta modifikuota U-net architektūra pritaikyta segmentuoti aštuonias naviko audinio komponentų klases iš įprastų HE dažytų krūties audinių PKV viename žingsnyje, naudojant daugiasluoksnes anotacijų kaukes. Apmokytu modeliu pasiektas geras kelių klasių segmentavimo IoU tikslumas – 0,6849. Pristatyta pilno kadro vaizdo transformacija, išlaikanti erdvinius santykius tarp segmentuotų naviko audinio komponentų ir paremta vaizdo požymių erdve, sukonstruota remiantis aiškiomis morfometrijos taisyklėmis, pritaikytomis aštuonioms išsegmentuotų navikinio audinio objektų klasėms. Įvesta transformacija įterpia visą naviko vaizdą į fiksuotų matmenų projekciją, kuri leidžia bet kokiam mašininio mokymosi klasifikatoriui, kuris dirba su iš anksto nustatytais įvesties duomenų dydžiais, apsimokyti pilnais bet kokio dydžio PKV vaizdais. Visas metodas, susidedantis iš apibendrinto daugelio klasių segmentavimo modelio, pasiūlytos PKV transformacijos ir PKV projekcijomis apmokyto klasifikatoriaus, pasiekė konkurencingus naviko biožymenų prognozavimo rezultatus, siekiančius 0,6276 AUC ir 0,4446 F1-įvertį.

II. SUMMARY

1. Research Context

As humanity dwells in the age of data, a considerable part of our daily activities is captured digitally and gets analyzed. A vast amount of digital information is acquired in a clinical setting as image data using well-established medical imaging techniques such as X-ray, magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), ultrasound, and many more. Digital image analysis (DIA) is used to extract meaningful information contained in images. When applied to medical images, DIA informs treatment decisions and directly affects patients' lives. Therefore, DIA algorithms particularly those based on machine learning (ML) whose use is intended for specific medical purposes qualify as medical or diagnostic devices and have to undergo regulatory clearances. There are hundreds of DIA-based medical devices cleared for clinical use worldwide for automated labeling, visualization, and quantification of organ (brain, lung, breast, prostate, cardiovascular system, thyroid) structures, documentation of abnormalities, tumor contouring for therapy planning from CT scans, X-ray or MR images, retinal diseases diagnosis from ophthalmic images, assistance in the analysis of ultrasound images.

In this context, cancer diagnoses often rely on analyzing visual information contained in the microscopic anatomy (histology) of surgically removed tumor tissues. In a standard diagnostic workup, laboratory-processed tissue specimens are placed on glass slides and routinely stained with hematoxylin and eosin (H&E) stains to color otherwise transparent tissue sections [1]. Alternative staining techniques are available and commonly are referred to as "special stains". Stained slides are presented for pathologist manual review under an optical microscope. Differential diagnosis of tumors aims to classify a malignancy into clinically relevant categories. Hence, a pathology diagnosis implies a label that is applied to a patient and enables further decisions about treatment and prognosis in the context

of other clinical information. To arrive at a diagnosis, pathologists must consider many biological factors of pathology, usually presented as manual or digital assessment endpoints such as qualitative or quantitative evaluation of the size and shape, density, and alignment of tumorous tissue components. Objective, accurate, and standardized phenotyping of microscopic manifestations of the disease (histopathology) is a convenient system to guide treatment decisions.

Specialized hardware (high-capacity high-resolution bright-field microscopy scanners) can digitize a glass slide into a virtual slide or Whole-Slide Image (WSI). DIA-driven assessment of a pathology starts with pixel-level data of a tissue specimen image. It expands to object-level data by aggregating similar pixels into biologically meaningful and recognizable tissue components. Finally, object-level endpoints are employed to suggest an opinion at a patient level, be it a probability of disease recurrence or susceptibility to a specific treatment, or even a genetic condition.

Digitizing histopathology offers faster and more precise analytical approaches, also free from known sources of visual bias (optical illusions of size, color, hue, and shadow; inattentional blindness). Few digital slide scanners have been marketed in Europe under the Conformité Européenne (CE) mark since 2014, and in 2016 WSI technology was approved for primary diagnosis in the USA. Concordantly, in Europe, several ML-based pathology-specific DIA algorithms are already marked CE; however, to date, there are no regulatory clearances for pathology-related ML-based medical devices in the USA.

2. Relevance of the Research

Advanced comprehensive analysis of solid tumors brings benefits to cancer patients. Tumor profiling by DNA, RNA, and protein biomarkers leads towards personalized curative decisions in oncology [2]. Targeted medications are proving invaluable for precisely pre-selected groups of patients. Therefore, medical pathologists use well-

established methods to analyze solid tumor histology under an optical microscope to define groups of susceptible patients.

For a long time, diagnostic pathology was mainly focused on tumor cells. Tumor cell genetics explains many aspects of cancer development, but a growing tumor progresses while closely interacting with the patient's body (host). The tumor microenvironment (TME) can be understood as an interface of this interaction (the most proximal microscopic environment of the tumor) together with the host-allied interacting counterparts – cells of the inner and outer surface of organs and blood vessels, cells of connective, muscle, fatty, and neural tissues, cells of immune origin, and the material filling space in between cells (extracellular matrix (ECM)). Aggressive tumors exploit these interactions to benefit their growth by ensuring the supply of oxygen and nutrients, creating favorable conditions for the movement and spread of metastatic cells. TME has become a special topic in oncology due to our growing understanding of its function and role in tumor development. It is undisputed that TME assessment can provide critical therapeutic information [146-148], especially when dealing with tumors with ambiguous histology. Recent research reveals TME as an emerging target for personalized anti-cancer therapy [149-152].

In fact, digital pathology is even more tumor cell-centric than diagnostic pathology and largely ignores the TME. A plethora of DIA methods is available for tumor cell detection, segmentation, and classification. Nevertheless, methods targeting TME cells are being researched. For example, tumor-infiltrating immune cells (particularly lymphocytes) are important TME-born targets that can efficiently be detected, counted, and their density in tissue can be estimated by existing DIA methods [82, 84, 153, 154]. However, lymphocyte segmentation is merely mentioned in a few research papers. Similarly, connective tissue cells (stromal cells) are often mentioned in the context of cell segmentation problems not as a primary target but rather as hard-to-recognize cells negatively impacting the

segmentation of tumor cells [155, 156]. Therefore, DIA methods specifically targeting TME-born cell types need to be developed.

Expert annotations drive cell detection (segmentation and classification) methods; however, the ECM component of TME is hard to annotate if at all possible. Although specialized imaging modalities (second harmonic generation microscopy [157], polarized light microscopy [158], fluorescent microscopy [159]) have been used to image ECM at high resolution and can be used as a source of ground truth, their capacity is limited. Meanwhile, more accessible bright-field microscopy methods cannot offer comparable precision. Therefore, robust and affordable methods for assessing biological information contained in ECM need to be developed for standard and readily available H&E-stained histology images.

The endpoints of pathology DIA (typically continuous variables) are further used by pathologists to profile individual patients and to stratify them into clinically relevant categories (by disease severity, adequacy of therapy, or treatment plan). There is accumulating evidence of successful application of unsupervised or weakly supervised methods for predicting patient therapeutic biomarker status, susceptibility to treatment, and disease recurrence [94-96]. Unsupervised ML promises to improve pathology DIA development by reducing heavy dependency upon experts' manual input. For example, a model predicting patient survival times with greater discriminatory power than an optimal combination of all classical domain expert-provided features (explicit features) offers a unique opportunity to standardize the diagnosis. However, building completely human-independent pathology DIA comes at the cost of reduced transparency and interpretability of predictions and accompanying ethical and professional issues. This motivates to explore an interplay between tumor-oriented and TME-oriented digital methods to improve the efficiency of explicitly developed methods, and at the same time, to avoid the lack of explainability of unsupervised techniques.

Diagnostic pathology mainly focuses on tumor cells. Inherently, pathology DIA (and, in a broader sense, digital pathology as a research field) is even more tumor cell-centric, with the methods targeting TME cells being underresearched. A considerable part of this dissertation is designated to develop and analyze DIA methods targeting TME-borne tissue objects traditionally not covered by existing pathology DIA methods and even by human pathologists.

The dissertation introduces digital pathology by a literature review of DIA methods in pathology, both historically important and state-of-the-art ones. The research part of the dissertation considers problems of tumor tissue classification into compartments, segmentation of cell nuclei, classification of segmented nuclei, segmentation of tissue collagen carcass, and feature space engineering to detect tissue characteristics indicative of pathologic condition.

3. Object of the Dissertation

The object of this dissertation is tumor microenvironment compartment analysis in the whole-slide routinely stained histopathological images.

4. Aim and Tasks of the Dissertation

The aim of this dissertation is to investigate and propose new histopathology image segmentation and classification methods by targeting tumor microenvironment-related histologic tissue components.

With the view of realizing this aim, the following research tasks must be completed:

1. Develop and evaluate a colorectal tumor epithelium-stroma compartment classification method.

2. Propose a lightweight state-of-the-art tumor cell nuclei segmentation and classification method for the analysis of the microenvironment of breast and colorectal tumors.
3. Inspect existing collagen framework analysis methods and network features and develop a method to capture fibrous tumor microenvironment collagen framework in bright-field histopathological microscopy images and investigate whether obtained framework quantitative features can be used to predict differences in survival between different groups of breast cancer patients.
4. Develop and generalize a deep convolutional neural network method enabling simultaneous segmentation and classification of tumor microenvironment tissue compartments of the varying input WSI sizes for breast cancer patient therapeutic biomarker status classification.

5. Bioethics

The results obtained in Chapter 5 involved analysis of patient follow-up data, therefore the Lithuanian Bioethics Committee approved this study (reference number: 40, date 2007-04-26, updated 2017-09-12). Other studies did not require bioethics approval.

6. Scientific Novelty of the Research

1. It was experimentally demonstrated that a convolutional neural network (CNN) based model trained directly on image data classifies colorectal tumor tissue more accurately than a support vector machine (SVM), random forest classifier (RDF), or multilayer perceptron (MLP) models trained on color and texture features of the same images.
2. Extensive research provides unequivocal evidence of fully convolutional neural networks (FCNN) being a state-of-the-art method for cell nuclei segmentation tasks. A novel modified

FCNN-based algorithm for cell nuclei segmentation and a consecutive lymphocyte identification using MLP was developed and evaluated. The method performs comparably to state-of-the-art methods in terms of lymphocyte detection while at the same time enabling lymphocyte segmentation, which, in the case of lymphocytes, was previously not considered.

3. Theoretical analysis identified fibrous TME-collagen as a novel target for segmentation in bright-field images of tumorous tissue. An FCNN-based approach to segment collagen was developed and applied to capture collagen in breast tumor tissue images. It was experimentally demonstrated that the prognostic power of morphometric TME-collagen features is significantly higher than conventional clinical indicators. To the best of our knowledge, this has been the first method to capture collagen compartments in bright-field microscopy images.
4. The theoretical analysis revealed that FCNN could address the simultaneous segmentation of multiple object classes. Therefore, the approaches considered previously were aggregated into a single model capable of segmenting both tumor-related and TME-related objects of breast tumor tissue. Subsequently, segmentations were employed to engineer morphometric tissue image features to build and evaluate a breast tumor tissue component spatial relationship preserving WSI projection. WSI projections provided transformation of a tissue image into a fixed-size representation allowing classifier training on complete whole-slide images and enabled accurate predictions of breast cancer patients' therapeutic biomarker status.

7. Defended Statements

1. A CNN trained for segment-based colorectal cancer tumor tissue compartment classification directly from image data is more accurate on HE stained histopathological images than other ML approaches trained on engineered segment-level features.

2. An FCNN-based approach for cell nuclei segmentation and lymphocyte identification in breast and colorectal tumor images performs comparably to state-of-the-art methods in terms of lymphocyte detection at the same time enabling lymphocyte segmentation, is lightweight and shows good generalization properties.
3. An FCNN-based method is suitable for collagen framework segmentation from routinely stained bright-field microscopy images. Segmented collagen possesses indicative information of differences in survival between distinct groups of breast cancer patients.
4. Aggregated segmentation of tumor-related and TME-related components in routinely-stained WSI is possible in an FCNN-based model utilizing multi-layer annotation masks while treating each class segmentation as a binary pixel-level classification problem and providing a basis for spatial relationship preserving WSI projection. The proposed WSI projection built upon morphometric tissue features enables ML classifier training on complete whole-slide images and allows accurate breast cancer patient therapeutic biomarker status predictions from routinely stained pathology images.

8. General Conclusions

Literature analysis revealed that tumor microenvironment related object segmentation and classification is somewhat neglected in digital pathology, especially when analysing commonly in routine pathology diagnostics H&E-stained tissue WSI scans.

A superpixel-based annotation approach of H&E-stained tissue WSI data for tumor epithelium-stroma classification was introduced. Conventional classifiers such as support vector machine, random decision forest, and multilayer perceptron showed quite similar performance ranging from AUC 0.9533 to 0.9666. The best result was

obtained by a multilayer perceptron. Color space has an impact on superpixel classification accuracy. Adding superpixel color features allows an increase of classification accuracy in terms of AUC from 0.9542 up to 0.9666 when compared to texture features only. However, the best AUC of 0.9895 was obtained by the CNN classifier trained on patched image data and showed the best generalization properties among investigated classifiers.

A lightweight method having good generalization properties for cell nuclei segmentation and consecutive lymphocyte classification in H&E-stained breast and colorectal cancer WSIs was proposed.

- The modified shallow U-Net architecture supplemented with multiple-input layers and the introduced convolutional texture blocks allowed to obtain a lower model complexity than original U-Net and Micro-Net models and achieved higher nuclei segmentation Dice accuracy reaching 0.80 compared to those 0.78 and 0.79 obtained by the U-Net and Micro-Net models respectively while training on nuclei masks only. Further the architecture performance was increased to 0.81 when trained on nuclei masks supplemented with an active contour layer.
- Multilayer perceptron produced the best results among the tested lymphocytes classifiers with a classification accuracy of 0.78 – higher than those obtained by the random forest classifier and CNN producing accuracy of 0.77 and 0.76 respectively.
- The proposed method for nuclei segmentation and classification by modified U-Net architecture was tested on a public dataset and showed good generalization properties. The obtained 0.71 lymphocyte classification accuracy was even more increased up to 0.81 by introducing stain normalization procedure. The obtained results are comparable to the state-of-the-art lymphocyte detection methods but provide an additional lymphocyte segmentation capability.

A deep neural network architecture was introduced for tumor microenvironment collagen segmentation.

- Independent instances of models were trained on highly differing annotations and reached consensus by producing highly concordant collagen segmentation masks as assessed by *IoU* (0.4 – 0.6), the ratio of segmentation areas (0.5 – 1.2), and the common area covered by all segmentations (0.6 – 1.0). The analysis revealed that tumor grade, a feature of a tumor that in routine practice is only inferred visually by a human expert, can be determined by collagen features. Trained models independently captured aggressive tumor growth patterns by significantly emphasizing different collagen features as determined by the analysis of collagen feature variance between tumor grade groups with ANOVA test having *p*-value <0.05. Accomplished factor analysis confirmed collagen arrangement governing principles after the segmentation step.
- Collagen features such as fiber orientation and morphometry currently available only by specialized tissue imaging techniques were extracted from collagen segmentation maps produced by the proposed method and were confirmed to be reliable by prognostic modeling with obtained likelihood ratio interval 14.11-22.99, at *p*-value <0.05. The results suggest that the above-mentioned features after careful analysis have the potential to be implemented in routine pathology diagnostics.

A modified U-Net architecture proposed for collagen segmentation was further generalized to segment eight tumorous tissue components from routine H&E-stained breast tissue WSIs at the same step by utilizing multi-channel ground truth masks. The trained model achieved a reasonably accurate multi-class segmentation IoU of

0.6849. A whole-slide image transformation that retains spatial relationships between the segmented tumor tissue components was introduced by constructing an image feature space based on explicit morphometry rules applied to the eight segmented object classes of the tumorous tissue. The introduced transformation embeds a whole-slide image into a projection of fixed dimensions that allows any machine learning classifier that works on predefined input data sizes to be trained on complete whole-slide images of arbitrary sizes. The complete workflow consisting of a generalized multi-class segmentation model, proposed WSI transformation, and a trained WSI projection classifier achieved competitive tumor biomarker prediction results having AUC and F1 scores 0.6276 and 0.4466 respectively.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] A. T. Feldman ir D. Wolfe, "Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining," in *Histopathology: Methods and Protocols*, C. E. Day Ed. New York, NY: Springer New York, p. 31-43, 2014.
- [2] E. R. Malone, M. Oliva, P. J. B. Sabatini, T. L. Stockley ir L. L. Siu, "Molecular profiling for precision cancer therapies," *Genome Medicine*, 12:8, 2020.
- [3] J. B. T. M. Roerdink ir A. Meijster, "The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies," *Fundamenta Informaticae*, 41:187-228, 2000.
- [4] J. Canny, "A computational approach to edge detection," *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 8:679-698, 1986.
- [5] R. O. Duda ir P. E. Hart, "Use of the Hough transformation to detect lines and curves in pictures," *Communications of the ACM*, 15:11-15, 1972.
- [6] Y. Wang, Q. Guo ir Y. Zhu, "Medical Image Segmentation Based On Deformable Models And Its Applications," in *Deformable Models: Theory and Biomaterial Applications*, J. S. Suri and A. A. Farag Eds. New York, NY: Springer New York, p. 209-260, 2007.
- [7] M. A. Guevara, A. Silva, H. Oliveira, M. de Lourdes Pereira ir F. Morgado, "Segmentation and Morphometry of Histological Sections Using Deformable Models: A New Tool for Evaluating Testicular Histopathology," in *Progress in Pattern Recognition, Speech and Image Analysis*, Berlin, Heidelberg, A. Sanfeliu ir J. Ruiz-Shulcloper, Eds. Springer Berlin Heidelberg, p. 282-290, 2003.
- [8] H. Irshad, A. Veillard, L. Roux ir D. Racoceanu, "Methods for nuclei detection, segmentation, and classification in digital histopathology: a review-current status and future potential," *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 7:97-114, 2014.
- [9] Y. L. Li ir Y. Shen, "Fuzzy c-means clustering based on spatial neighborhood information for image segmentation,"

- Journal of Systems Engineering and Electronics*, 21:323-328, 2010.
- [10] X. Xu *ir kt.*, "Automated Brain Region Segmentation for Single Cell Resolution Histological Images Based on Markov Random Field," *Neuroinformatics*, 18:181-197, 2020.
- [11] R. Azmi *ir N. Norozi*, "A New Markov Random Field Segmentation Method for Breast Lesion Segmentation in MR images," *J Med Signals Sens*, Article 1:156-164, 2011.
- [12] J. Xu, J. P. Monaco, R. Sparks *ir A. Madabhushi*, "Connecting Markov random fields and active contour models: application to gland segmentation and classification," *J Med Imaging (Bellingham)*, 4:p. 021107, 2017.
- [13] A. B. Ashraf, S. C. Gavenonis, D. Daye, C. Mies, M. A. Rosen *ir D. Kontos*, "A multichannel Markov random field framework for tumor segmentation with an application to classification of gene expression-based breast cancer recurrence risk," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 32:637-648, 2013.
- [14] H. Erfankhah, M. Yazdi, M. Babaie *ir H. R. Tizhoosh*, "Heterogeneity-Aware Local Binary Patterns for Retrieval of Histopathology Images," *IEEE Access*, 7:18354-18367, 2019.
- [15] R. Alomari, S. Ghosh, V. Chaudhary *ir O. Al-Kadi*, *Local binary patterns for stromal area removal in histology images* (SPIE Medical Imaging). SPIE, 2012.
- [16] R. Peyret, A. Bouridane, F. Khelifi, M. A. Tahir *ir S. Al-Maadeed*, "Automatic classification of colorectal and prostatic histologic tumor images using multiscale multispectral local binary pattern texture features and stacked generalization," *Neurocomputing*, 275:83-93, 2018.
- [17] Rahmadwati, G. Naghdy, M. Ros, C. Todd *ir E. Norahmawati*, "Cervical Cancer Classification Using Gabor Filters," in *2011 IEEE First International Conference on Healthcare Informatics, Imaging and Systems Biology*, p. 48-52, 2011.

- [18] O. S. Al-Kadi, "A Gabor Filter Texture Analysis Approach for Histopathological Brain Tumor Subtype Discrimination," p. arXiv:1704.05122, 2017.
- [19] G. Lu *ir kt.*, "Histopathology Feature Mining and Association with Hyperspectral Imaging for the Detection of Squamous Neoplasia," *Scientific Reports*, 9:17863, 2019.
- [20] J. Diamond, N. H. Anderson, P. H. Bartels, R. Montironi *ir* P. W. Hamilton, "The use of morphological characteristics and texture analysis in the identification of tissue composition in prostatic neoplasia," *Human Pathology*, 35:1121-1131, 2004.
- [21] L. He, L. R. Long, S. Antani *ir* G. R. Thoma, "Histology image analysis for carcinoma detection and grading," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 107:538-556, 2012.
- [22] A. D. Belsare, M. M. Mushrif, M. A. Pangarkar *ir* N. Meshram, "Breast histopathology image segmentation using spatio-colour-texture based graph partition method," *Journal of Microscopy*, 262:260-273, 2016.
- [23] J. Galaro, A. R. Judkins, D. Ellison, J. Baccon *ir* A. Madabhushi, "An integrated texton and bag of words classifier for identifying anaplastic medulloblastomas," in *2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, p. 3443-3446, 2011.
- [24] Y. Zhou, H. Chang, K. Barner, P. Spellman *ir* B. Parvin, "Classification of Histology Sections via Multispectral Convolutional Sparse Coding," *Conf Comput Vis Pattern Recognit Workshops*, 2014:3081-3088, 2014.
- [25] L. Shamir, N. Orlov, D. M. Eckley, T. Macura, J. Johnston *ir* I. G. Goldberg, "Wndchrm - an open source utility for biological image analysis," *Source Code for Biology and Medicine*, 3:13, 2008.
- [26] A. Sethi *ir kt.*, "Empirical comparison of color normalization methods for epithelial-stromal classification in H and E images," *Journal of Pathology Informatics*, Research Article 7:17, 2016.
- [27] B. Ehteshami Bejnordi *ir kt.*, "Automated Detection of DCIS in Whole-Slide H&E Stained Breast Histopathology

- Images," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 35:2141-2150, 2016.
- [28] L. Breiman, J. Friedman, C. J. Stone ir R. A. Olshen, *Classification and regression trees*. CRC press, 1984.
- [29] D. E. Rumelhart, G. E. Hinton ir J. L. McClelland, "A general framework for parallel distributed processing," *Parallel distributed processing: Explorations in the microstructure of cognition*, 1:45-76, 1986.
- [30] D. E. Rumelhart, G. E. Hinton ir R. J. Williams, "Learning representations by back-propagating errors," *Nature*, 323:533-536, 1986.
- [31] B. E. Boser, I. M. Guyon ir V. N. Vapnik, "A training algorithm for optimal margin classifiers," presented at the Proceedings of the fifth annual workshop on Computational learning theory - COLT '92, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, 1992.
- [32] H. Tin Kam, "Random decision forests," in *Proceedings of 3rd International Conference on Document Analysis and Recognition*, 1:278-282, 1995.
- [33] L. Breiman, "Random forests," *Machine Learning*, 45:5-32, 2001.
- [34] D. C. Ciresan, U. Meier, J. Masci, L. M. Gambardella ir J. Schmidhuber, "Flexible, high performance convolutional neural networks for image classification," in *Twenty-second international joint conference on artificial intelligence*, 2011.
- [35] A. Krizhevsky, I. Sutskever ir G. E. Hinton, "Imagenet classification with deep convolutional neural networks," *Advances in Neural Information Processing Systems*, 25:1097-1105, 2012.
- [36] Y. Huang, H. Zheng, C. Liu, X. Ding ir G. K. Rohde, "Epithelium-Stroma Classification via Convolutional Neural Networks and Unsupervised Domain Adaptation in Histopathological Images," *IEEE journal of biomedical and health informatics*, 21:1625-1632, 2017.
- [37] G. Litjens ir kt., "Deep learning as a tool for increased accuracy and efficiency of histopathological diagnosis," *Scientific Reports*, 6:26286, 2016.

- [38] J. Xu, X. Luo, G. Wang, H. Gilmore ir A. Madabhushi, "A Deep Convolutional Neural Network for segmenting and classifying epithelial and stromal regions in histopathological images," *Neurocomputing*, 191:214-223, 2016.
- [39] Y. Song, L. Zhang, S. Chen, D. Ni, B. Lei ir T. Wang, "Accurate Segmentation of Cervical Cytoplasm and Nuclei Based on Multiscale Convolutional Network and Graph Partitioning," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 62:2421-2433, 2015.
- [40] Y. Xu ir kt., "Large scale tissue histopathology image classification, segmentation, and visualization via deep convolutional activation features," *BMC Bioinformatics*, 18:281, 2017.
- [41] E. Shelhamer, J. Long ir T. Darrell, "Fully Convolutional Networks for Semantic Segmentation," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 39:640-651, 2017.
- [42] O. Ronneberger, P. Fischer ir T. Brox, "U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation," in *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*, Cham, N. Navab, J. Hornegger, W. M. Wells ir A. F. Frangi, Eds., Springer International Publishing, p. 234-241, 2015.
- [43] Y. Xu ir kt., "Gland Instance Segmentation Using Deep Multichannel Neural Networks," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 64:2901-2912, 2017.
- [44] L. Bi, J. Kim, A. Kumar, M. Fulham ir D. G. Feng, "Stacked fully convolutional networks with multi-channel learning: application to medical image segmentation," *Visual Computer*, 33:1061-1071, 2017.
- [45] B. Gecer, S. Aksoy, E. Mercan, L. G. Shapiro, D. L. Weaver ir J. G. Elmore, "Detection and classification of cancer in whole slide breast histopathology images using deep convolutional networks," *Pattern Recognition*, 84:345-356, 2018.
- [46] R. R. Rawat, D. Ruderman, P. Macklin, D. L. Rimm ir D. B. Agus, "Correlating nuclear morphometric patterns with

- estrogen receptor status in breast cancer pathologic specimens," *NPJ Breast Cancer*, 4:32, 2018.
- [47] S. E. A. Raza *ir kt.*, "Micro-Net: A unified model for segmentation of various objects in microscopy images," *Medical Image Analysis*, 52:160-173, 2019.
- [48] P. Bandi, M. Balkenhol, B. van Ginneken, J. van der Laak *ir G. Litjens*, "Resolution-agnostic tissue segmentation in whole-slide histopathology images with convolutional neural networks," *PeerJ*, 7:e8242, 2019.
- [49] J. T. Pontalba, T. Gwynne-Timothy, E. David, K. Jakate, D. Androutsos *ir A. Khademi*, "Assessing the Impact of Color Normalization in Convolutional Neural Network-Based Nuclei Segmentation Frameworks," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7:300, 2019.
- [50] J. C. Caicedo *ir kt.*, "Nucleus segmentation across imaging experiments: the 2018 Data Science Bowl," *Nature Methods*, 16:1247-1253, 2019.
- [51] Z. Zhou, M. M. R. Siddiquee, N. Tajbakhsh *ir J. Liang*, "UNet++: Redesigning Skip Connections to Exploit Multiscale Features in Image Segmentation," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 39:1856-1867, 2020.
- [52] G. Huang, Z. Liu, L. V. D. Maaten *ir K. Q. Weinberger*, "Densely Connected Convolutional Networks," in *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, p. 2261-2269, 2017.
- [53] R. Girshick, J. Donahue, T. Darrell *ir J. Malik*, "Rich Feature Hierarchies for Accurate Object Detection and Semantic Segmentation," in *2014 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, p. 580-587, 2014.
- [54] Y. Z. Ding, Q. Y. Tao, L. H. Wang, D. X. Li *ir M. Zhang*, "Image-based localisation using shared-information double stream hourglass networks," *Electronics Letters*, 54:496-497, 2018.
- [55] S. Ren, K. He, R. Girshick *ir J. Sun*, "Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks," *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 39:1137-1149, 2017.

- [56] K. He, G. Gkioxari, P. Dollár ir R. Girshick, "Mask R-CNN," in *2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)*, p. 2980-2988, 2017.
- [57] M. Sebai, X. Wang ir T. Wang, "MaskMitosis: a deep learning framework for fully supervised, weakly supervised, and unsupervised mitosis detection in histopathology images," *Medical and Biological Engineering and Computing*, 58:1603-1623, 2020.
- [58] S. Yousefi ir Y. Nie, "Transfer Learning from Nucleus Detection to Classification in Histopathology Images," *2019 Ieee 16th International Symposium on Biomedical Imaging (Isbi 2019)*, p. 957-960, 2019.
- [59] A. Nugaliyadde ir kt., "RCNN for Region of Interest Detection in Whole Slide Images," in *Neural Information Processing*, Cham, H. Yang, K. Pasupa, A. C.-S. Leung, J. T. Kwok, J. H. Chan ir I. King, Eds. Springer International Publishing, p. 625-632, 2020.
- [60] A. Momeni, M. Thibault ir O. Gevaert, "Deep Recurrent Attention Models for Histopathological Image Analysis," *bioRxiv*, p. 438341, 2018.
- [61] A. Cruz-Roa ir kt., *Automatic detection of invasive ductal carcinoma in whole slide images with convolutional neural networks* (SPIE Medical Imaging). SPIE, 2014.
- [62] H. Ahammer, J. M. Kropfl, C. Hackl ir R. Sedivy, "Image statistics and data mining of anal intraepithelial neoplasia," *Pattern Recognition Letters*, 29:2189-2196, 2008.
- [63] N. Linder ir kt., "Identification of tumor epithelium and stroma in tissue microarrays using texture analysis," *Diagnostic Pathology*, 7:22, 2012.
- [64] F. Bianconi, A. Alvarez-Larran ir A. Fernandez, "Discrimination between tumour epithelium and stroma via perception-based features," *Neurocomputing*, 154:119-126, 2015.
- [65] O. Maron ir A. L. Ratan, "Multiple-instance learning for natural scene classification," in *ICML*, 98:341-349, 1998.
- [66] Z. Jia, X. Huang, E. I. Chang ir Y. Xu, "Constrained Deep Weak Supervision for Histopathology Image Segmentation," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 36:2376-2388, 2017.

- [67] M. Lerousseau *ir kt.*, "Weakly Supervised Multiple Instance Learning Histopathological Tumor Segmentation," in *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2020*, Cham, A. L. Martel *ir kt.*, Eds. Springer International Publishing, p. 470-479, 2020.
- [68] C. Mercan, S. Aksoy, E. Mercan, L. G. Shapiro, D. L. Weaver *ir J. G. Elmore*, "Multi-Instance Multi-Label Learning for Multi-Class Classification of Whole Slide Breast Histopathology Images," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 37:316-325, 2018.
- [69] J. Li *ir kt.*, "A multi-resolution model for histopathology image classification and localization with multiple instance learning," *Computers in Biology and Medicine*, 131:104253, 2021.
- [70] L. Hou *ir kt.*, "Sparse Autoencoder for Unsupervised Nucleus Detection and Representation in Histopathology Images," *Pattern Recognition*, 86:188-200, 2019.
- [71] X. Y. Li, M. Radulovic, K. Kanjer *ir K. N. Plataniotis*, "Discriminative Pattern Mining for Breast Cancer Histopathology Image Classification via Fully Convolutional Autoencoder," *IEEE Access*, 7:36433-36445, 2019.
- [72] Y. Feng, L. Zhang *ir J. Mo*, "Deep Manifold Preserving Autoencoder for Classifying Breast Cancer Histopathological Images," *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 17:91-101, 2020.
- [73] M. T. Shaban, C. Baur, N. Navab *ir S. Albarqouni*, "Staingan: Stain Style Transfer for Digital Histological Images," in *2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019)*, p. 953-956, 2019.
- [74] J. Wei *ir kt.*, "Generative Image Translation for Data Augmentation in Colorectal Histopathology Images," *Proceedings of machine learning research*, 116:10-24, 2019.
- [75] N. Ing *ir kt.*, "A novel machine learning approach reveals latent vascular phenotypes predictive of renal cancer outcome," *Scientific Reports*, 7:13190, 2017.
- [76] F. Yi *ir kt.*, "Microvessel prediction in H&E Stained Pathology Images using fully convolutional neural networks," *BMC Bioinformatics*, 19:64, 2018.

- [77] L. R. Heij *ir kt.*, "Nerve Fibers in the Tumor Microenvironment Are Co-Localized with Lymphoid Aggregates in Pancreatic Cancer," *Journal of Clinical Medicine*, 10:490, 2021.
- [78] N. Harder *ir kt.*, "Tissue Phenomics for prognostic biomarker discovery in low- and intermediate-risk prostate cancer," *Scientific Reports*, 8:4470, 2018.
- [79] A. Rasmusson *ir kt.*, "Immunogradient Indicators for Antitumor Response Assessment by Automated Tumor-Stroma Interface Zone Detection," *American Journal of Pathology*, 190:1309-1322, 2020.
- [80] K. Sirinukunwattana, S. E. Ahmed Raza, T. Yee-Wah, D. R. Snead, I. A. Cree *ir N. M. Rajpoot*, "Locality Sensitive Deep Learning for Detection and Classification of Nuclei in Routine Colon Cancer Histology Images," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 35:1196-1206, 2016.
- [81] R. Turkki, N. Linder, P. E. Kovanen, T. Pellinen *ir J. Lundin*, "Antibody-supervised deep learning for quantification of tumor-infiltrating immune cells in hematoxylin and eosin stained breast cancer samples," *Journal of Pathology Informatics*, Research Article 7:38, 2016.
- [82] J. Saltz *ir kt.*, "Spatial Organization and Molecular Correlation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Using Deep Learning on Pathology Images," *Cell Reports*, 23:181-193, 2018.
- [83] N. Linder *ir kt.*, "Deep learning for detecting tumour-infiltrating lymphocytes in testicular germ cell tumours," *Journal of Clinical Pathology*, 72:157-164, 2019.
- [84] J. Chen *ir C. Srinivas*, "Automatic Lymphocyte Detection in H&E Images with Deep Neural Networks," *ArXiv*, vol. abs/1612.03217, 2016.
- [85] S. Graham *ir kt.*, "Hover-Net: Simultaneous segmentation and classification of nuclei in multi-tissue histology images," *Medical Image Analysis*, 58:101563, 2019.
- [86] A. Janowczyk *ir A. Madabhushi*, "Deep learning for digital pathology image analysis: A comprehensive tutorial with selected use cases," *Journal of Pathology Informatics*, Original Article 7:29, 2016.

- [87] M. Alom *ir kt.*, "Advanced Deep Convolutional Neural Network Approaches for Digital Pathology Image Analysis: a comprehensive evaluation with different use cases," *ArXiv*, vol. abs/1904.09075, 2019.
- [88] F. Fereidouni *ir kt.*, "Dual-mode emission and transmission microscopy for virtual histochemistry using hematoxylin- and eosin-stained tissue sections," *Biomedical Optics Express*, 10:6516-6530, 2019.
- [89] Y. Chen, Q. Yu ir C.-B. Xu, "A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software," 2017.
- [90] G. Brianezi, F. Grandi, E. Bagatin, M. M. Enokihara, and H. A. Miot, "Dermal type I collagen assessment by digital image analysis," *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90:723-727, 2015.
- [91] T. J. Dekker *ir kt.*, "Disorganised stroma determined on pre-treatment breast cancer biopsies is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy: Results from the NEOZOTAC trial," *Molecular Oncology*, 9:1120-1128, 2015.
- [92] H. Jung *ir kt.*, "Integration of Deep Learning and Graph Theory for Analyzing Histopathology Whole-slide Images," *2018 IEEE Applied Imagery Pattern Recognition Workshop (Aipr)*, p. 1-5, 2018.
- [93] A. Keikhosravi, B. Li, Y. Liu, M. W. Conklin, A. G. Loeffler ir K. W. Eliceiri, "Non-disruptive collagen characterization in clinical histopathology using cross-modality image synthesis," *Communications biology*, 3:414, 2020.
- [94] C. Saillard *ir kt.*, "Predicting Survival After Hepatocellular Carcinoma Resection Using Deep Learning on Histological Slides," *Hepatology*, 72:2000-2013, 2020.
- [95] R. Yamashita, J. Long, A. Saleem, D. L. Rubin ir J. Shen, "Deep learning predicts postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma from digital histopathologic images," *Scientific Reports*, 11:2047, 2021.
- [96] R. R. Rawat *ir kt.*, "Deep learned tissue "fingerprints" classify breast cancers by ER/PR/Her2 status from H&E images," *Scientific Reports*, 10:7275, 2020.

- [97] W. Bulten *ir kt.*, "Automated deep-learning system for Gleason grading of prostate cancer using biopsies: a diagnostic study," *Lancet Oncology*, 21:233-241, 2020.
- [98] S. Svagzdys, V. Lesauskaite, D. Pavalkis, I. Nedzelskiene, D. Pranys ir A. Tamelis, "Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer," *BMC Cancer*, 9:95, 2009.
- [99] A. Laurinavicius, A. Laurinaviciene, V. Ostapenko, D. Dasevicius, S. Jarmalaite ir J. Lazutka, "Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data," *Diagnostic Pathology*, 7:27, 2012.
- [100] A. Laurinaviciene *ir kt.*, "Digital immunohistochemistry platform for the staining variation monitoring based on integration of image and statistical analyses with laboratory information system," *Diagnostic Pathology*, 9:S10, 2014.
- [101] A. Laurinavicius *ir kt.*, "Ki67/SATB1 ratio is an independent prognostic factor of overall survival in patients with early hormone receptor-positive invasive ductal breast carcinoma," *Oncotarget*, 6:41134-41145, 2015.
- [102] B. Plancoulaine *ir kt.*, "Digital immunohistochemistry wizard: image analysis-assisted stereology tool to produce reference data set for calibration and quality control," *Diagnostic Pathology*, 9:S8, 2014.
- [103] A. Kriščiukaitis *ir kt.*, "Quantitative evaluation of morphologic changes in histologic samples by means of mathematical morphology," in *7th International Workshop "Data analysis methods for software systems"–DAMSS: Druskininkai, Lithuania, December 3-5, 2015/Lithuanian Computer Society. Vilnius University Institute of Mathematics and Informatics. Lithuanian Academy of Sciences. Druskininkai: Vilnius University 2015.*
- [104] R. Petrolis *ir kt.*, "Digital imaging of colon tissue: method for evaluation of inflammation severity by spatial frequency features of the histological images," *Diagnostic Pathology*, 10:159, 2015.
- [105] D. Daunoravicius *ir kt.*, "Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology," *Diagnostic Pathology*, 9:114, 2014.

- [106] R. Asoklis, A. Kadziauskiene, R. Paulaviciene, D. Petroska ir A. Laurinavicius, "Quantitative histopathological assessment of ocular surface squamous neoplasia using digital image analysis," *Oncology Letters*, 8:1482-1486, 2014.
- [107] B. Plancoulaine *ir kt.*, "A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data," *Virchows Archiv*, 467:711-722, 2015.
- [108] J. Besusparis *ir kt.*, "Impact of tissue sampling on accuracy of Ki67 immunohistochemistry evaluation in breast cancer," *Diagnostic Pathology*, 11:82, 2016.
- [109] A. Laurinavicius *ir kt.*, "Bimodality of intratumor Ki67 expression is an independent prognostic factor of overall survival in patients with invasive breast carcinoma," *Virchows Archiv*, 468:493-502, 2016.
- [110] R. Petrolis, R. Ramonaitė, G. Kiudelis, G. Varkalaitė, L. Kupčinskas ir A. Kriščiukaitis, "Implementation of image analysis techniques in gastric cancer cell motility analysis," in *Human and Nature Safety: Proceedings of the 22nd international scientific-practice conference "Human and nature safety 2016"*, Kaunas, Lithuania/Aleksandro Stulginskio universitetas, 2016.
- [111] R. Petrolis, R. Ramonaite, D. Jocevicius, G. Kiudelis, L. Kupcinskas ir A. Kriščiukaitis, "Characterization of gastrointestinal cancer cells invasiveness by estimation of their motility," *Biomedical Engineering 2016*, , 2017.
- [112] R. Ramonaite *ir kt.*, "Mathematical morphology-based imaging of gastrointestinal cancer cell motility and 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence," *Biomedizinische Technik*, 64:711-720, 2019.
- [113] M. Lukashevich ir V. Starovoitov, "An Approach to Cell Nuclei Counting in Histological Image Analysis," Cham, Springer International Publishing, in *Computer Information Systems and Industrial Management*, p. 139-147, 2016.
- [114] A. Paulauskaite-Taraseviciene, K. Sutiene, J. Valotka, V. Raudonis ir T. Iesmantas, "Deep Learning-based Detection of Overlapping Cells," presented at the Proceedings of the

- 2019 3rd International Conference on Advances in Artificial Intelligence, Istanbul, Turkey, 2019.
- [115] D. Zilenaite *ir kt.*, "Independent Prognostic Value of Intratumoral Heterogeneity and Immune Response Features by Automated Digital Immunohistochemistry Analysis in Early Hormone Receptor-Positive Breast Carcinoma," *Frontiers in Oncology*, Original Research 10:950, 2020.
- [116] A. Nestarenkaite *ir kt.*, "Immuno-Interface Score to Predict Outcome in Colorectal Cancer Independent of Microsatellite Instability Status," *Cancers*, 12:2902, 2020.
- [117] T. Fawcett, "An introduction to ROC analysis," *Pattern Recognition Letters*, 27:861-874, 2006.
- [118] R. Achanta, A. Shaji, K. Smith, A. Lucchi, P. Fua ir S. Susstrunk, "SLIC superpixels compared to state-of-the-art superpixel methods," *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, 34:2274-2282, 2012.
- [119] R. M. Haralick, "Statistical and structural approaches to texture," *Proceedings of the IEEE*, 67:786-804, 1979.
- [120] I. T. Jolliffe, "Principal Component Analysis and Factor Analysis," in *Principal Component Analysis*, (Springer Series in Statistics. New York, Springer New York, Chapter 7, p. 115-128, 1986.
- [121] R. Malouf, "A Comparison of Algorithms for Maximum Entropy Parameter Estimation," in *COLING-02: The 6th Conference on Natural Language Learning 2002 (CoNLL-2002)*, 2002.
- [122] D. P. Kingma ir J. Ba, "Adam: A method for stochastic optimization," *arXiv preprint arXiv:1412.6980*, 2014.
- [123] R. Nava, G. González, J. Kybic ir B. Escalante-Ramírez, "Classification of Tumor Epithelium and Stroma in Colorectal Cancer Based on Discrete Tchebichef Moments," in *Clinical Image-Based Procedures. Translational Research in Medical Imaging*, Cham, C. Oyarzun Laura *ir kt.*, Eds., Springer International Publishing, p. 79-87, 2016.
- [124] R. L. Grossman *ir kt.*, "Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data," *New England Journal of Medicine*, 375:1109-1112, 2016.

- [125] K. Zuiderveld, "Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization," in *Graphics Gems*, P. S. Heckbert Ed.: Academic Press, p. 474-485, 1994.
- [126] D.-A. Clevert, T. Unterthiner ir S. Hochreiter, "Fast and Accurate Deep Network Learning by Exponential Linear Units (ELUs)," 2016.
- [127] C. Nwankpa, W. Ijomah, A. Gachagan ir S. Marshall, "Activation Functions: Comparison of trends in Practice and Research for Deep Learning," *ArXiv*, vol. abs/1811.03378, 2018.
- [128] K. H. Zou ir kt., "Statistical validation of image segmentation quality based on a spatial overlap index," *Academic Radiology*, 11:178-189, 2004.
- [129] S. Jadon, "A survey of loss functions for semantic segmentation," in *2020 IEEE Conference on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology (CIBCB)*, p. 1-7, 2020.
- [130] E. Reinhard, N. Ashikhmin, B. Gooch ir P. Shirley, "Color transfer between images," *Ieee Computer Graphics and Applications*, 21:34-41, 2001.
- [131] D. G. Altman ir J. M. Bland, "Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies," *The Statistician*, 32:307-317, 1983.
- [132] D. Giavarina, "Understanding Bland Altman analysis," *Biochemia Medica: Casopis Hrvatskoga Drustva Medicinskih Biokemicara*, 25:141-151, 2015.
- [133] N. Dalal ir B. Triggs, "Histograms of oriented gradients for human detection," in *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)*, 1:886-893 2005.
- [134] M. K. Goel, P. Khanna ir J. Kishore, "Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate," *Int J Ayurveda Res*, 1:274-278, 2010.
- [135] F. Yan, M. Robert ir Y. Li, "Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research," *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 9:157-163, 2017.

- [136] B. George, S. Seals ir I. Aban, "Survival analysis and regression models," *Journal of Nuclear Cardiology*, 21:686-694, 2014.
- [137] P. P. Provenzano, K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White ir P. J. Keely, "Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion," *BMC Medicine*, 4:38, 2006.
- [138] M. W. Conklin *ir kt.*, "Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma," *American Journal of Pathology*, 178:1221-1232, 2011.
- [139] F. Chollet, "Xception: Deep Learning with Depthwise Separable Convolutions," *30th IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (Cvpr 2017)*, p. 1800-1807, 2017.
- [140] "The HEROHE Challenge." <https://ecd2020.grand-challenge.org/>.
- [141] M. Javanmardi, M. S. M. Sajjadi, T. Liu ir T. Tasdizen, "Unsupervised Total Variation Loss for Semi-supervised Deep Learning of Semantic Segmentation," *ArXiv*, vol. abs/1605.01368, 2016.
- [142] J. Kiefer ir J. Wolfowitz, "Stochastic Estimation of the Maximum of a Regression Function," *The Annals of Mathematical Statistics*, 23:462-466, 1952.
- [143] D. P. Kingma ir J. Ba, "Adam: A Method for Stochastic Optimization," ed, 2014.
- [144] M. D. Zeiler, "Adadelta: an adaptive learning rate method," *arXiv preprint arXiv:1212.5701*, 2012.
- [145] F. Chollet, "Keras: The python deep learning library," *Astrophysics Source Code Library*, p. ascl: 1806.1022, 2018.
- [146] S. Brassart-Pasco, S. Brezillon, B. Brassart, L. Ramont, J. B. Oudart ir J. C. Monboisse, "Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression," *Frontiers in Oncology*, Mini Review 10:397, 2020.
- [147] R. Baghban *ir kt.*, "Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance," *Cell Communication and Signaling*, 18:59, 2020.
- [148] A. Labani-Motlagh, M. Ashja-Mahdavi ir A. Loskog, "The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and

- Obstructing Antitumor Immune Responses," *Frontiers in Immunology*, Review 11:940, 2020.
- [149] B. Allard *ir kt.*, "Immuno-oncology-101: overview of major concepts and translational perspectives," *Seminars in Cancer Biology*, 52:1-11, 2018.
- [150] K. C. Valkenburg, A. E. de Groot *ir* K. J. Pienta, "Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy," *Nature Reviews: Clinical Oncology*, 15:366-381, 2018.
- [151] R. R. Somani *ir* U. V. Bhanushali, "Targeting angiogenesis for treatment of human cancer," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75:3-10, 2013.
- [152] S. Y. Gun, S. W. L. Lee, J. L. Sieow *ir* S. C. Wong, "Targeting immune cells for cancer therapy," *Redox Biology*, 25:101174, 2019.
- [153] J. Galon *ir kt.*, "Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force," *Journal of Translational Medicine*, 10:205, 2012.
- [154] A. N. Basavanhally *ir kt.*, "Computerized image-based detection and grading of lymphocytic infiltration in HER2+ breast cancer histopathology," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 57:642-653, 2010.
- [155] A. Mouelhi, H. Rmili, J. B. Ali, M. Sayadi, R. Doghri *ir* K. Mrad, "Fast unsupervised nuclear segmentation and classification scheme for automatic allred cancer scoring in immunohistochemical breast tissue images," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 165:37-51, 2018.
- [156] M. Veta, P. J. van Diest, R. Kornegoor, A. Huisman, M. A. Viergever *ir* J. P. Pluim, "Automatic nuclei segmentation in H&E stained breast cancer histopathology images," *PloS One*, 8:e70221, 2013.
- [157] T. M. Bauman *ir kt.*, "Characterization of fibrillar collagens and extracellular matrix of glandular benign prostatic hyperplasia nodules," *PloS One*, 9:e109102, 2014.
- [158] M. Wolman *ir* F. H. Kasten, "Polarized light microscopy in the study of the molecular structure of collagen and reticulin," *Histochemistry*, 85:41-49, 1986.
- [159] K. A. Wegner, A. Keikhosravi, K. W. Eliceiri *ir* C. M. Vezina, "Fluorescence of Picosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of

Collagen in Tissue Sections," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 65:479-490, 2017.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijos periodinėje mokslinėje spaudoje (indeksuojama WoS duomenų bazėje):

1. M. Morkūnas, P. Treigys, J. Bernatavičienė, A. Laurinavičius & G. Korvel. "Machine Learning Based Classification of Colorectal Cancer Tumour Tissue in Whole-Slide Images," *Informatica* 29:75-90, doi:10.15388/Informatica.2018.158 (2018).
2. E. Budginaitė, M. Morkūnas, A. Laurinavičius & P. Treigys. "Deep Learning Model for Cell Nuclei Segmentation and Lymphocyte Identification in Whole Slide Histology Images," *Informatica* 32:23-40, doi:10.15388/20-INFOR442 (2021).
3. M. Morkunas, D. Zilenaite, A. Laurinaviciene, P. Treigys, A. Laurinavicius. "Tumor Collagen Framework from Bright-Field Histology Images Predicts Overall Survival of Breast Carcinoma Patients," *Scientific Reports*, priimta 2021-07-18, doi: 10.1038/s41598-021-94862-6 (2021).

Mindaugas Morkūnas

**NAVIKO MIKROAPLINKAI PRITAIKYTŲ PILNO KADRO
VAIZDO SEGMENTAVIMO IR KLASIFIKAVIMO
SKAITMENINĖS PATOLOGIJS METODŲ KŪRIMAS**

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Technologijos mokslai

Informatikos inžinerija T 007

Redaktorė Jorūnė Rimeisytė-Nekrašienė

Mindaugas Morkūnas

**DEVELOPMENT OF TUMOR MICROENVIRONMENT-
ORIENTED DIGITAL PATHOLOGY METHODS FOR
WHOLE SLIDE IMAGE SEGMENTATION AND
CLASSIFICATION**

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Technological Sciences

Informatics Engineering T 007

Editor Zuzana Šiušaitė

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p.: info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 30 egz.