

Mikroskopik Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Görüntülerde Çoklu Seviye Eşikleme Tabanlı Bölütleme Yöntemi

A Multi-level Thresholding Based Segmentation Method for Microscopic Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Images

Kaan A. Kabakçı¹, Abdulkerim Çapar², B. Uğur Töreyn², Mertkan Akkoç¹, Ozan Borazan¹, İlknur Türkmen³, Lütfiye Durak Ata²

¹Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği Bölümü, İstanbul Teknik Üniversitesi
{kabakcik, akkocm, borazan}@itu.edu.tr

²Bilişim Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi
{capar, toreyin, durakata}@itu.edu.tr

³Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul Medipol Üniversitesi
{iturkmen}@medipol.edu.tr

Özetçe— Kanser tanısında yaygın olarak kullanılan Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği, kromozom bölgelerinin özel boya ile boyanarak FISH sinyalleri hâlinde görüntülenmesine dayanır. Bu çalışmada, FISH tekniğiyle elde edilmiş görüntüler üzerinde, çoklu seviye eşiklemeye dayanan yeni bir FISH sinyali bölütleme yöntemi önerilmiştir. Floresan mikroskop ile yüksek büyütmede elde edilmiş görüntüler üzerinde hücre çekirdeklerinin bölütlenmesi için uyarlamalı eşikleme, uzaklık dönüşümü ve “su bölümü çizgisi” (watershed) yöntemleri kullanılmıştır. Geliştirilen özgün bölütleme yöntemiyle, hücre sınırları içine düşen bölgelerdeki FISH sinyalleri, çoklu seviye eşiklemeye ve morfolojik art işlemlere tabi tutularak belirlenmektedir. Önerilen yöntemin gerçek hastalardan alınmış 49 adet FISH görüntüsü üzerinde ölçülen tespit başarımının, literatürde yaygın olarak kullanılan diğer yöntemlere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler — mikroskopik görüntü işleme, floresan in situ hibridizasyon (FISH), hücre bölütleme, FISH sinyali tespiti.

Abstract— Fluorescence in situ hybridization (FISH) technique widely used in cancer diagnosis is based on displaying chromosomal regions as FISH signals by staining with specific dyes. In this study, a new multi-level thresholding based FISH signal segmentation method is proposed for images produced by FISH technique. Cell nuclei are segmented on images, that are grabbed from fluorescence microscopes at high resolution, with adaptive thresholding, distance transform and watershed methods. FISH signals falling in cell boundaries are detected by applying multi-level thresholding and morphological post processes thanks to proposed segmentation method. It is

observed that the detection rate of the proposed method on 49 FISH images taken from real patients, are higher than other widely used techniques in the literature.

Keywords — microscopic image analysis, fluorescence in situ hybridization (FISH), cell segmentation, FISH signal detection.

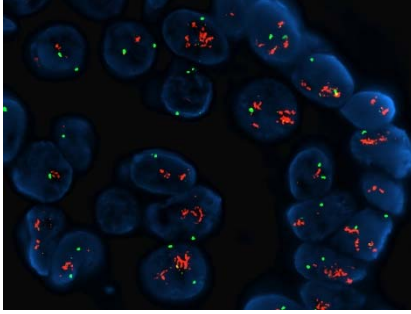
I. GİRİŞ

Kanser vakalarının giderek arttığı günümüzde, patolojik tanının hızı, güvenilirliği ve hassasiyeti; erken teşhisi ve uygun ilaç tedavisinin seçilmesini kolaylaştırmaktadır. Patolojik tanının konulmasında aydınlık alan mikroskopi, uzun yıllardır kullanılmaktadır. Floresan mikroskopinin patolojik görüntüleme kullanılması ise nispeten yenidir. Doku üzerinde bulunan kromozomların belirli bölgeleri floresana tepki veren boya ile işaretlenerek numune hazırlanır. Hazırlanan bu numuneler belirli dalga-boylarında çalışabilen floresan ışık düzeneklerine sahip mikroskoplarla görüntülenir (Şekil 1) ve analizler yapılarak patolojik tanı konur. Bu yöntem FISH (Fluorescence in situ hibridizasyon) adı verilir. FISH tekniği, fizikten madencilğe, biyolojiden sitometriye birçok alanda 1930 lardan bu yana kullanılmaktadır [1].

FISH tekniğinin biyoloji ve tıp alanında uygulamaları ise her geçen gün artmaktadır (karyotip analizi, gen haritalaması, DNA çoğaltma ve yeniden birleştirme, klinik tanı, hastalık takibi, kemoterapi/radyoterapi dozaj tayini, doğum öncesi tanı vb.)[2]. FISH teknikleri ve uygulama alanları hakkında iki genel çalışma, Carter [2] ile Levsky ve Singer [3] tarafından yapılmıştır. Levsky ve Singer in

yaptığı saptama oldukça kritiktir: FISH teknolojisi biyoloji alanında 1980 lerden beri kullanılmaktadır, o tarihten bu yana biyo-kimyasal olarak büyük bir değişim olmamasına rağmen gerek optik ve görüntüleme gerek de görüntü analiz yöntemlerinin gelişmesiyle FISH tekniğinin hastalık teşhisine katkısı oldukça artmıştır [3]. FISH tekniğinin yaygınlaşmasıyla birlikte otomatik FISH görüntü analiz yöntemlerinin de önemi artmıştır. Bu yöntemlerin amacı, FISH görüntüler üzerinde hücre çekirdeklerini bölütleyerek, çekirdek içerisinde bulunan farklı renklere boyanmış gen bölgelerini (FISH sinyali) saptamaktır.

Literatürde sinyal saptama için yapılan çalışmalar incelendiğinde uyarlamalı eşikleme yöntemleri [4]-[10], sinyal bölge şablonları ile karşılaştırma [11]-[13] ve 3-boyutlu sinyal modelleme [14]-[17] temelli yöntemlere rastlanmaktadır.



Şekil 1. Meme kanseri tanısına yönelik hazırlanmış örnek bir FISH görüntüsü

Bildiride, FISH görüntülerinin tam otomatik analizinin yapılması amaçlanmıştır. Hücre bölütleme ve sinyal saptama adımları gerçekleştirilmiş, sinyal saptama için yeni bir yaklaşım ortaya atılmıştır.

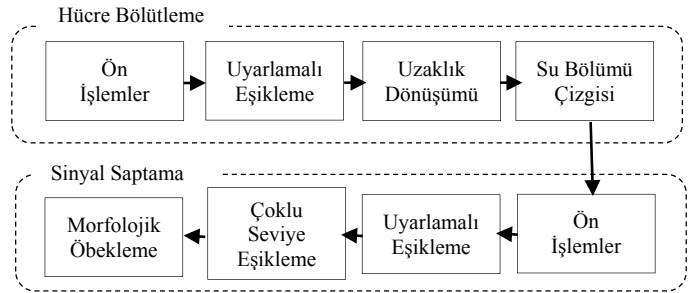
Küresel yapıdaki hücre çekirdeklerinin içinde parlayan sinyallerin yoğunlukları, alınan kesite bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu durum tek bir eşikle tüm sinyallerin ayrıştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu noktadan hareketle sinyal saptamak için çoklu seviye eşikleme ve morfolojik analiz tabanlı bir yöntem geliştirilmiştir. Sinyallerin birden fazla eşik seviyesi kullanılarak saptanması yaklaşımı Ravkin ve Temov'un yaptığı çalışmada kullanılmıştır [6]. Çalışmada sinyal saptama için iki aşamalı bir yöntem önerilmiştir. Deneysel olarak belirlenen bir eşik seviyesinden başlayan ilk aşamada eşik seviyesi yükseltilerek birbirine dokunan öbeklerin ayrıştırılması hedeflenmiş, ikinci aşamada ise eşik seviyesi azaltılarak sinyal sınırlarının daha iyi saptanmasına çalışılmıştır. İlgili yöntemin sonuçları ile uzmanların işaretlediği sonuçlar 28 örnek üzerinde karşılaştırılmış ve %90 civarı bir uyuma sağlanmıştır. Yöntem örneklerin sadece %49'u için tahminde bulunmuştur. Yöntemde kritik olan başlangıç eşiklerinin yanında en küçük / en büyük sinyal büyüklüğü, form faktör limiti gibi değerlerin nasıl belirlendiği anlatılmamıştır. Yöntemin başarısı bu değerlerin uygun belirlenmesine ve örnekten örneğe uyarlanabilmesine bağlıdır.

Bu bildiride önerilen yaklaşım ise, eşik seviyelerinden çıkartılan bilgiler ve bilgilerin tümeleştirilmesi açısından literatürdeki mevcut yöntemlerden tamamıyla farklıdır. Kullanılan eşik limit değerleri, deneysel olarak değil, uyarlamalı eşikleme değerlerine bağlı olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin, literatürde sinyal saptamak için kullanılan eşikleme temelli diğer yöntemlere göre daha başarılı olduğu deneylerle de ortaya konulmuştur.

Bildirinin ikinci bölümünde geliştirilen yöntem anlatılmış, üçüncü bölümde elde edilen deneysel sonuçlardan bahsedilmiştir. Dördüncü bölümde yapılan çalışmalar ve sonuçları irdelenerek tartışılmıştır.

II. YÖNTEM

Yapılan çalışmalar hücre bölütleme ve sinyal saptama olarak iki kısma ayrılabilir (Şekil 2). Hücre bölütleme aşamasında, giriş görüntüsü gürültü giderme ve kontrast artırma amaçlı ön işlemlere tabi tutulduktan sonra OTSU yöntemi ile eşiklenmiş ve uzaklık dönüşümü sonuçlarını tohum noktaları olarak kabul eden "su bölümü çizgisi" (watershed) yöntemi ile bölütlenmiştir.



Şekil 2. Bildiride geliştirilen otomatik FISH görüntü analiz yönteminin akış şeması

Sinyal saptama aşamasında uyarlamalı eşikleme yöntemi ile limitleri belirlenmiş çoklu seviye eşikleyiciler ile sinyal merkezleri belirlenmiş, parçalanmış sinyaller morfolojik öbekleme ile birleştirilerek nihai sinyal kümesi bulunmuştur.

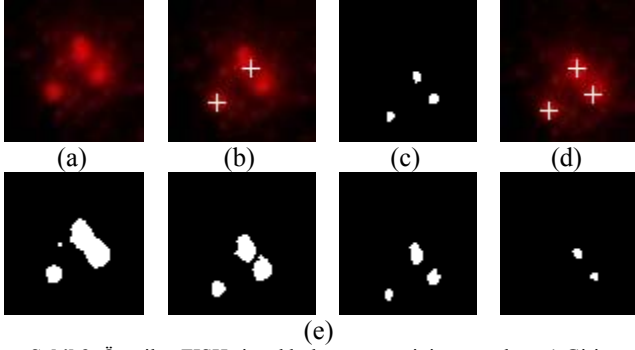
Sinyal saptama algoritması şu şekilde özetlenebilir:

- 1) Sinyal görüntüsünü hücre sınırından kes
- 2) Medyan filtre ile gürültü gider
- 3) Uyarlamalı eşikleme ile eşik değeri (E_{ue}) hesapla
- 4) FOR Eşik değeri E : 255 den E_{ue} ye kadar
 - a) 8-bağlı bölgeleri bul
 - b) Her bağlı bölge için
 - i) Yeni sinyal bölgesi mi kontrol et
 - ii) Sinyal ise Sinyal Listesi SL_1 e ekle
 - c) $E = E - 1$
- 5) SL_1 deki sinyal merkezlerinden yeni bir görüntü oluştur
- 6) Morfolojik süpürme yöntemi ile yakın sinyal bölgelerini birleştir

7) 8-bağlı öbekleri bularak sonuç sinyal listesini (SL_2) oluştur.

4.b.1 aşamasında bulunan bölgenin sinyal olup olmadığına karar verilmesi için, SL_1 listesindeki elemanlarla iç içe geçmeme şartı aranır.

Önerilen yöntemin aşamaları örnek bir görüntü üzerinde Şekil 3'te gösterilmiştir. Uyarlamalı eşikleme ile bulunan ilk sonuçta (Şekil 3.b) yakın iki sinyal tek sinyal olarak bulunmuşken, çoklu seviye eşikleme adımları ile (Şekil 3.e) birbirine değen sinyaller ayrıştırılmıştır (Şekil 3.d).

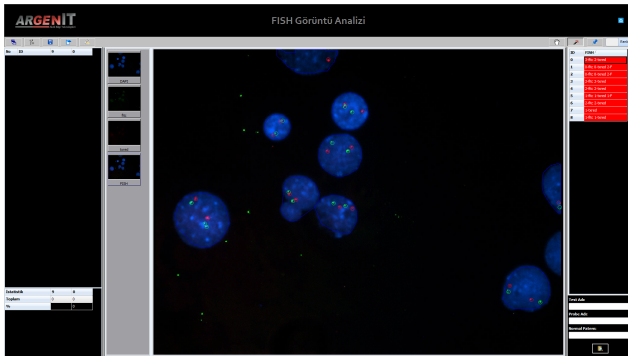


Şekil 3. Önerilen FISH sinyal bulma yönteminin aşamaları. a) Giriş görüntüsü, b) uyarlamalı eşik sinyal saptama sonucu, c) çoklu seviye eşikleme sonucu, d) çoklu seviye eşikleme sinyal saptama sonucu, e) örnek çoklu seviye eşikleme sonuçları

III. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Geliştirilen yöntemlerin başarılarını sınamak üzere BURÇ Genetik Laboratuvarından FISH görüntüleri temin edilmiştir. Görüntüler DAPI (Soğurma: 350 nm, Işıma: 460 nm), FITC (Soğurma: 480 nm, Işıma: 530 nm) ve TEXASRED (Soğurma: 580 nm, Işıma: 620 nm) floresan filtreleri ile Argenit AKAS sistemini kullanarak elde edilmiştir.

Alınan görüntülerdeki gerçek hücre sınırları ve FISH sinyalleri geliştirilen program arayüzü (Şekil 4) kullanılarak genetik uzmanlar tarafından işaretlenmiştir. Yöntemlerin başarımları, işaretlenmiş alanlarla karşılaştırılarak ölçülmüştür.



Şekil 4. FISH işaretleme arayüzü

Oluşturulan veri kümesinde bulunan 49 adet FISH görüntüsü üzerinde toplam 366 adet hücre, 1387 adet FISH sinyali bulunmaktadır.

IV. DENEYSEL SONUÇLAR

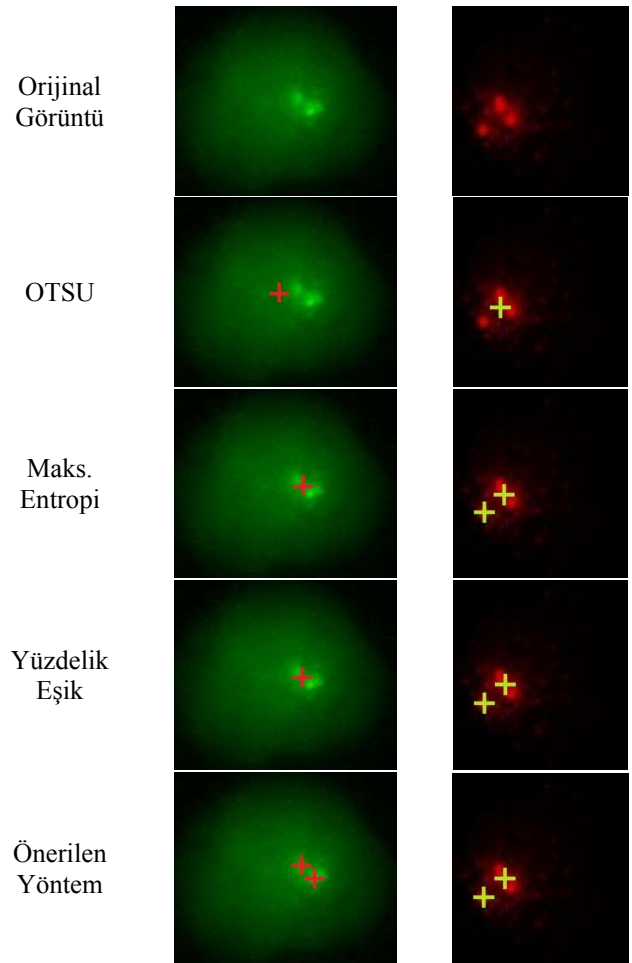
Geliştirilen yöntemin başarısı 49 adet FISH görüntüsü üzerinde farklı uyarlamalı eşikleme tabanlı yöntemlerle (OTSU, Maksimum Entropi, Yüzelik (Percentile) Eşik) karşılaştırılarak ölçülmüştür. Ölçüm başarımları Tablo 1 de verilmiştir.

Önerilen yöntemin kesinlik (precision) ve geri çağırma (recall) oranları birlikte ele alındığında diğer yöntemlere göre daha başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. Karşılaştırılan yöntemler arasında yüzelik (percentile) eşik yönteminin diğer uyarlamalı eşikleme yöntemlerine göre daha başarılı olduğu raporlanmıştır.

Yöntem	Kesinlik (%)	Geri Çağırma (%)
OTSU	42,4	51,75
Maks. Entropi	89,30	88,65
Yüzelik Eşik	90,59	93,05
Önerilen Yöntem	92,05	93,70

Tablo 1. FISH Sinyallerinin Tespit Başarımları

Örnek iki spot görüntüsü için incelenen dört yöntemin sinyal bulma sonuçları Şekil 5'te sunulmuştur.



Şekil 5. Örnek iki spot görüntüsü için sinyal bulma sonuçları

V. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bildiride, patolojik kanser tanısında sık kullanılan Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği ile hazırlanmış görüntüler üzerinde aranan kromozom bölgelerinin oluşturduğu sinyalleri saptamak üzere, çoklu seviye eşikleme tabanlı yeni bir yöntem önerilmiştir. Geliştirilen yöntemin sinyal tespit başarımının, literatürde kullanılan başlıca diğer uyarlamalı eşik tabanlı yöntemlere göre daha iyi olduğu gerçek hasta deneyleriyle ortaya konulmuştur. Başarım testleri gerçek hastalara ait 49 adet FISH görüntüsü içerisinde bulunan 1387 adet FISH sinyali üzerinden yapılmıştır.

Geliştirilen sinyal saptama yöntemi en yüksek başarıma sahip uyarlamalı eşikleme yönteminin bulunduğu eşik değerinin çevresinde farklı eşik seviyelerini değerlendirerek birbirine yakın sinyalleri ayrıştırma ve soluk sinyalleri saptama yeteneğini arttırmayı amaçlamıştır. Yöntemin en önemli avantajı bu şekilde herhangi bir uyarlamalı eşikleme yönteminden daha yüksek başarımla gösterebilmesidir.

Önerilen yöntemin bir diğer avantajı da en yakın sinyal uzaklığının (kullanılan FISH boyasına bağlı olarak) dışardan atanabilmesidir. Çoklu seviyeli eşiklerle bulunan sinyal merkezleri öbeklenirken bu uzaklık değeri kullanılmıştır.

FISH yönteminde hücrelerde görülen gen alanlarını temsil eden sinyallerin göz ile analiz edilmesi oldukça zahmetlidir. Ayrıca, aynı örneğe ilişkin farklı uzman doktorlar tarafından yapılan incelemelerin, farklı tespit sonuçları üretebildiği bilinmektedir.

Bu bildiride sunulan çalışmanın, kanser gibi birçok hastalığın tanı ve tedavi süreçlerinde kullanılan FISH örneklerinin, nesnel olarak analiz edilmesini sağlayacak otomatik/yarı-otomatik karar destek sistemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan FISH örneklerini sağlayan BURÇ Genetik Laboratuvarları'na ve örneklerin görüntülenmesi amacıyla geliştirdikleri AKAS Görüntü Analiz Sistemi'nin kullanılmasına olanak tanıyan Argenit Firmasına teşekkür ederiz.

KAYNAKÇA

- [1] Restif, C., "Segmentation and Evaluation of Fluorescence Microscopy Images", Doktora Tezi, Oxford Brookes University, 2006
- [2] Carter, N. P., "Fluorescence in situ hybridization – state of the art", *Bioimaging*, 4, 41-51, 1996
- [3] Levisky, J.M., Singer, R.H., "Fluorescence in situ hybridization: past, present and future", *Journal of Cell Science*, 116, 2833–2838, 2003.
- [4] Du, X. Dua, S., "Segmentation of Fluorescence Microscopy Cell Images Using Unsupervised Mining", *Open Med Inform J.*, 41-49, 2010
- [5] Zheng, B. Wang, X.H. Surti, U. Bhargava, R. Gur, D., "Computer-Aided Detection of HER2 Amplification Status Using FISH Images: A Preliminary Study", *SPIE Proceedings*, 7260, 281-289, 2009
- [6] Ravkin, I. Temov, V., "Automatic counting of FISH spots in interphase cells for prenatal characterization of aneuploidies", *SPIE Proceedings*, 3604, 1999
- [7] Wang, X., Zheng, B., Li, S., Zhang, R.R., Li, Y., Mulvihill, J.J., Chen, W.R., Liu, H., "Automated Segmentation and Analysis of Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) Signals in Interphase Nuclei of Pap-smear Specimens", *Proc. of SPIE*, 7176, 2009
- [8] Wang, X., Zheng, B., Li, S., Zhang, R.R., Li, Y., Mulvihill, J.J., Chen, W.R., Liu, H., "Automated Analysis of Fluorescent in situ Hybridization (FISH) Labeled Genetic Biomarkers in Assisting Cervical Cancer Diagnosis", *Technol Cancer Res Treat*, 2010
- [9] Raimondo, F. Gavrielides, M.A. Karayannopoulou, G. Lyroudia, K. Pitas, I. Kostopoulos, I., "Automated evaluation of Her-2/neu status in breast tissue from fluorescent in situ hybridization images", *IEEE Trans Image Processing* 14(9), 1288-1299, 2005
- [10] Wagner, J. Schmitt, E. Riede, F. Hausmann, M. Hesser, J., "Denoising and detection of Her2/neu gene amplification in fluorescence microscopic data". *Microscopic Image Analysis with Applications in Biology Heidelberg Germany September 2, 2011*
- [11] Nandy, K. Gudla, P.R. Meaburn, K.J. Misteli, T. Lockett, S.J., "Automatic nuclei segmentation and spatial FISH analysis for cancer detection.", *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 6718-6721, 2009
- [12] Wanga, X. Chenb, X. Lib, Y. Liub, H. Lic, S. Zhangc, R.R. Zhenga, B., "Fluorescence in situ hybridization (FISH) signal analysis using automated generated projection images", *Anal Cell Pathol*, 35(5), 395-405, 2012
- [13] Theodosiou, Z., Raimondo, F., Garefalaki, M.E., Karayannopoulou, G., Lyroudia, K., Pitas, I., "Fish Image Analysis System for Breast Cancer Studies", *European Conf. on Emergent Aspects in Clinical Data Analysis (EACDA)*, 2005
- [14] Li, Z. Zheng, B. Ren, L. Liu, H., "Interphase fluorescence in situ hybridization signal detection by computing intensity variance along the optical axis", *Proc. SPIE* 8944, 0V1- 0V6, 2014
- [15] Chawla, M.K. Lin, G. Olson, K. Vazdarjanova, A. Burke, S.N. McNaughton, B.L. Worley, P.F. Guzowski, J.F. Roysam, B. Barnes, C.A., "3D-catFISH: a system for automated quantitative three-dimensional compartmental analysis of temporal gene transcription activity imaged by fluorescence in situ hybridization", *Journal of Neuroscience Methods*, 139(1), 13-24, 2004
- [16] Umesh Adiga, P.S. Samantha, J.L.K. Chaudhuri, B.B., "Characterization and Automatic Counting of FISH Signals in 3-D Tissue Images", *Image Anal Stereol*, 20, 41-52, 2001
- [17] Bashar, M.K. Komatsu, K. Fujimori, T. Kobayashi, T.J., "Automatic extraction of nuclei centroids of mouse embryonic cells from fluorescence microscopy images", *PLoS One*, 7(5), DOI: 10.1371, 2012