

Kvantitativna analiza histoloških slika epitela površine oka

Miloš Ljubojević

JU Akademska i istraživačka mreža RS
Banja Luka, Bosna i Hercegovina
ljubojevic.milos@gmail.com

Vesna Ljubojević

Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci
Banja Luka, Bosna i Hercegovina
ljubojevic.v@gmail.com

Zdenka Babić

Elektrotehnički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci
Banja Luka, Bosna i Hercegovina
zdenka@etfbl.net

Radoslav Gajanin

Univerzitetsko klinički centar Banja Luka, Zavod za
patologiju
Banja Luka, Bosna i Hercegovina
radoslav10@yahoo.com

Sadržaj— Zbog kompleksnosti strukture histoloških uzoraka i različitih metoda njihove analize, ne postoji univerzalan metod segmentacije histoloških slika. U ovom radu je predložen metod segmentacije koji se koristi za kvantitativnu analizu dijelova tkiva pterigijuma koji imaju različitu strukturu. Izračunavanjem nukleocitoplazmatskog odnosa, tj. odnosa površine jedara i citoplazme epitelnih ćelija, za različite dijelove epitelnog tkiva pterigijuma, te poređenjem sa rezultatima dobijenim za kontrolne grupe uzoraka, utvrđeno je koje ćelije svojim umnožavanjem učestvuju u nastanku pterigijuma. Dobijeni rezultati kvantitativne analize histoloških slika epitela površine oka su potvrđeni deskriptivnom histološkom analizom.

Ključne riječi - analiza histoloških slika; segmentacija; matematička morfologija

I. UVOD

Kvantitativna analiza slika histoloških tkivnih rezova omogućuje sveobuhvatnije razumijevanje karakteristika i uzroka promjena u analiziranom tkivu. Najčešće se analizira struktura tkiva, boja, tekstura i morfologija objekata od interesa. Primjena različitih procedura bojenja i specijalnih boja omogućuje isticanje obilježja objekata od interesa koji imaju jednaku biološku strukturu. Segmentacija histoloških slika jedan je od najvažnijih zadataka i preduslov za njihovu kvantitativnu analizu.

Segmentacijom objekata od interesa se izdvajaju različiti regioni koji se ne preklapaju i koji ispunjavaju dva ključna uslova. Prvi je da postoji homogenost unutar regiona, a drugi je izražena heterogenost između regiona, pri čemu se te karakteristike kod histoloških slika najčešće zasnivaju na boji i teksturi [1].

Manuelno izdvajanje objekata od interesa, prebrojavanje i izračunavanje površine izdvojenih objekata je veoma težak ili čak nemoguće ostvariv zadatak. Imajući u vidu kompleksnu prirodu histoloških slika, automatska analiza značajno olakšava rad operatera i daje nove informacije korisne za dopunu

tradicionalnih dijagnostičkih metoda. Zato je automatizacija procesa analize, uz prihvatljiv nivo greške, od velike važnosti za analizu histoloških slika. Automatsku identifikaciju objekata od interesa je moguće ostvariti sa tačnošću dovoljnom za određene metode analize, npr. 77% kao u [2] i to za samo nekoliko milisekundi, dok je manuelnom metodom potrebno nekoliko minuta za obradu uzorka.

Automatska segmentacija histoloških slika je složen i često analiziran problem [3]. Najčešći faktori koji utiču na kvalitet segmentacije su nepravilna struktura slike tkivnog reza, neravnomjerno osvjetljenje, nekonzistentno bojenje različitih struktura tkivnog reza, nefokusiranost komponenti i prisustvo većeg broja različitih struktura [4].

Kompleksnost strukture tkiva i različiti metodi analize otežavaju pronalaženje univerzalnog algoritma segmentacije za sve vrste histoloških slika. Na osnovu prethodnih istraživanja može se izdvojiti nekoliko najvažnijih metoda segmentacije slika: segmentacija pomoću praga, segmentacija pomoću klasterizacije, segmentacija pomoću rasta regiona, segmentacija pomoću granica regiona, segmentacija teksture i segmentacija upotrebom morfoloških operacija [5].

U segmentaciji medicinskih slika vrlo čestu primjenu ima metod segmentacije pomoću klasterizacije. Ova tehnika koristi višedimenzionalna obilježja za formiranje klastera. Kod segmentacije histoloških slika u boji ova tehnika segmentacije daje bolje rezultate nego tehnika bazirana na analizi histograma [6]. Postoje različiti pristupi rješavanju problema segmentacije zasnovane na klasterizaciji.

Jedan od jednostavnijih metoda klasterizacije za segmentaciju slika u boji koristi k-means algoritam koji iterativnim postupkom dijeli sliku u k klastera [7]. Autori u [8] izdvajaju homogene regione uz pomoć FCM (fuzzy c-means) klasterizacije pri čemu broj klastera određuje broj pravila odlučivanja. Metod segmentacije histoloških slika opisan u [9] lokalne distribucije intenziteta slike karakteriše Gusovim

mixture modelom, da bi se one iskoristile za označavanje piksela koji pripadaju pojedinim klasama.

Zbog toga što je boja najvažnije obilježje objekata od interesa u histološkim slikama, posebnu pažnju je potrebno obratiti na upotrebu odgovarajućeg kolor prostora. Prethodna istraživanja pokazuju da se bolji rezultati postižu upotrebom CIE $L^*a^*b^*$ kolor prostora. Za razliku od RGB kolor prostora, koji se koristi u većini sistema za akviziciju i prikaz slika, upotreba $L^*a^*b^*$ kolor prostora omogućuje predstavu boja bližu ljudskoj percepciji [10].

U automatskoj analizi histoloških slika vrlo često se primjenjuju metode matematičke morfologije, koje se osim za segmentaciju koriste i za kvantitativnu analizu uzoraka [11].

Univerzalnost algoritma segmentacije je važan predmet istraživanja. Često je poželjno je da se isti algoritam koristi za analizu različitih dijelova iste vrste tkiva. U ovom radu je predložen metod segmentacije koji se koristi za kvantitativnu analizu dijelova epitelnog tkiva pterigijuma čija se struktura razlikuje po gustini jedara epitelinih ćelija. Posmatraju se tkiva glave i tijela pterigijuma, ali i tkiva normalne konjunktive i rožnjače koja predstavljaju kontrolne grupe. Tkiva kontrolnih grupa takođe imaju različitu gustinu jedara epitelinih ćelija.

Izračunavanjem nukleocitoplazmatskog odnosa jedara epitelinih ćelija i citoplazme epitelinih ćelija, za različite dijelove epitelnog tkiva pterigijuma, i poređenjem sa rezultatima dobijenim za kontrolne grupe uzoraka utvrđuje se koje ćelije svojim umnožavanjem učestvuju u nastanku pterigijuma. Njihovom identifikacijom u odgovarajućem tkivu kontrolne grupe se doprinosi boljem poznavanju ovog oboljenja.

Rad je organizovan tako da je nakon uvodnih razmatranja, u drugom poglavlju data deskriptivna histološka analiza pterigijuma u cilju utvrđivanja njegovih morfoloških karakteristika i predložen metod automatske kvantitativne analize. U trećem poglavlju su predstavljeni eksperimentalni rezultati, a u četvrtom je izveden zaključak.

II. AUTOMATSKA ANALIZA HISTOLOŠKIH KARAKTERISIKA PTERIGIJUMA

A. Deskriptivna histološka analiza pterigijuma

Pterigijum je oboljenje koje izaziva iritaciju oka, smanjenje vida i kod teških slučajeva gubitak vida usljed zatvaranja vidne osovine. On se sastoji od epitela i veoma vaskularizovanog rastresitog vezivnog tkiva. Porijeklo epitela koji prekriva pterigijum nije u potpunosti poznato [12].

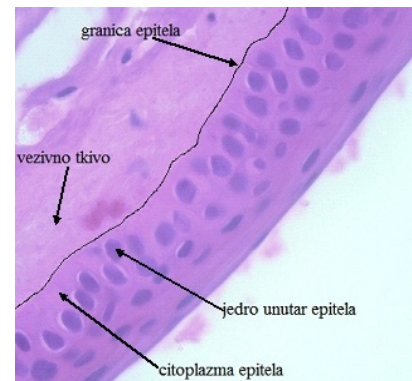
Morfološke karakteristike epitela pterigijuma se mijenjaju kroz glavu i tijelo pterigijuma što je upravo predmet automatske analize. Prema podacima iz literature [13] pterigijum je najvećim dijelom prekriven epitelom nalik konjunktivalnom, dok u predjelu prednjaćeg dijela glave pokazuje morfologiju modifikovanog pločastoslojevitog epitela rožnjače. U novijim istraživanjima je pokazano da samo konjunktivalni epitel prekriva pterigijum [14], [15].

Nukleocitoplazmatski (NC) odnos ćelija epitela pterigijuma je morfološka karakteristika koja ukazuje na njima slične ćelije koje učestvuju u nastanku pterigijuma. Odnos površine jedara u

epitelu i površine citoplazme u epitelu posmatranog uzorka pterigijuma predstavlja NC odnos. Na osnovu NC odnosa se utvrđuje sličnost epitela glave i tijela pterigijuma sa konjunktivom i rožnjačom kao uzorcima kontrolnih grupa.

Hematoksilin-eozin (HE) bojenjem se strukture uzoraka boje različitim nijansama crvene i plave boje. Identifikuju su tri vrste objekata od interesa: vezivno tkivo, citoplazma i jedra unutar epitela, Sl. 1.

Na slikama koje se analiziraju je vizuelno moguće jasno razgraničiti granicu oblasti epitela unutar kojeg je potrebno izdvojiti citoplazmu i jedra, a zatim izračunati odnos njihovih površina – nukleocitoplazmatski odnos.



Slika 1. Objekti od interesa identifikovani HE bojenjem

Radi boljeg razumijevanja procesa segmentacije, na Sl. 1 je ručno ucrtana granica epitela. Cilj je pronaći automatski metod izdvajanja epitela a zatim i izračunavanja nukleocitoplazmatskog odnosa u dijelovima glave i tijela pterigijuma, odnosno pri različitim gustinama jedara u epitelu.

B. Automatska analiza histoloških slika

U cilju segmentacije sve tri vrste objekata od interesa i eventualne primjene metoda automatske segmentacije za različito bojene uzorke tkiva slične strukture, ostavljena je mogućnost da se vizuelna obilježja boje pojedinih dijelova uzorka formiraju na osnovu manualnog obilježavanja. Manualno obilježavanje se sastoji u označavanju malih uzoraka regiona od interesa, koji odgovaraju jedru epitelne ćelije, citoplazmi epitelne ćelije i vezivnom tkivu.

Nakon manualnog izdvajanja uzorka regiona od interesa, koji odgovaraju jedru epitelne ćelije, citoplazmi epitelne ćelije i vezivnom tkivu strome, određuju se a^* i b^* kolor markeri kao srednje a^* i b^* vrijednosti svakog obilježenog područja. Klasterizacijom baziranom na upotrebi pravila najbližeg susjeda, svakom pikselu slike se pridruži kolor labela. Pikseli sa jednakim kolor labelama se grupišu čime se postiže segmentacija slike na jedra, citoplazmu i preostale dijelove uzorka koji nisu od interesa (vezivno tkivo). Zahvaljujući karakteristikama CIE $L^*a^*b^*$ kolor prostora i Hematoksilin-eozin (HE) bojenju histoloških uzoraka, pikseli koji predstavljaju regione vezivnog tkiva, citoplazme i jedra, se grupišu u dobro definisane klasterne u CIE $L^*a^*b^*$ kolor prostoru.

Prilikom segmentacije tkiva epitela ostaju i mali dijelovi vezivnog tkiva koji ne predstavljaju ni jedro ni citoplazmu. Primjenom matematičke morfologije vrši se uklanjanje tih malih objekata i dobijeni rezultat se koristi za formiranje maske za izdvajanje samo onog dijela slike koji odgovara epitelu.

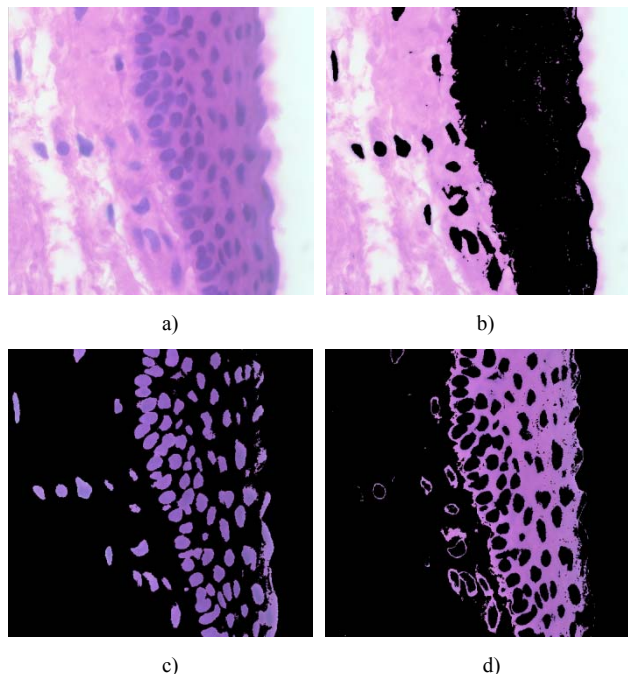
U procesu segmentacije, na osnovu odgovarajućih kolor markera, se takođe izdvajaju regioni koji odgovaraju jedrima i citoplazmi. Upotrebom prethodno formirane maske segmentirani su samo jedra i citoplazma koji pripadaju epitelu posmatranog uzorka. Oni se koriste za određivanje nukleocitoplazmatskog odnosa. Nukleocitoplazmatski odnos se dobije kao odnos površina svih jedara i ukupne citoplazme u epitelu.

Dobijeni rezultati pokazuju da je nastanak pterigijuma usko vezan za promjene ćelija koje daju epitel rožnjače što je u skladu sa ranijim medicinskim istraživanjima.

III. EKSPERIMENTALNI REZULTATI

U okviru eksperimenta su analizirane slike tri grupe uzoraka. Testnu grupu čini 15 hirurški odstranjenih pterigijuma. Prvu kontrolnu grupu čini 5 uzoraka normalne rožnjače, a drugu kontrolnu grupu 15 uzoraka normalne konjunktive. U okviru laboratorijske obrade uzoraka je urađeno rutinsko Hematoksilin-eozin (HE) bojenje. Za mikroskopsku analizu je korišten binokularni mikroskop Leica DM 2500, a tkivni rezovi su slikani digitalnom kamerom Leica Microsystems DFC290H.

Nakon kolor segmentacije izdvajaju se regioni koji odgovaraju jedrima epitelnih ćelija, citoplazmi epitelnih ćelije i vezivnom tkivu strome, Sl. 2.



Slika 2. Kolor segmentacija histološke slike pterigijuma. a) Originalna slika tijela pterigijuma, b) Segmentirano vezivno tkivo, c) Segmentirana jedra, d) Segmentirana citoplazma

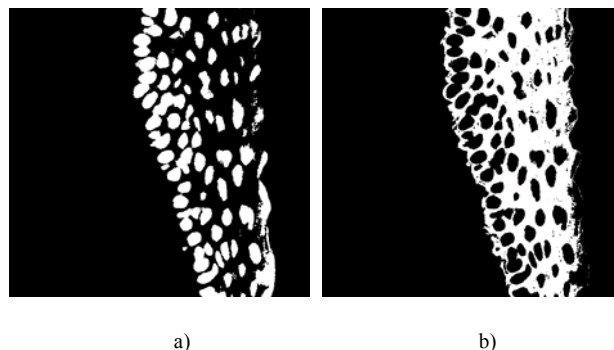
Segmentacijom vezivnog tkiva i morfološkim operacijama kojima se uklanjanaju mali objekti ostvaruju se preduslovi za formiranje maske koja predstavlja samo oblast epitela, Sl. 3. Kao ni jedna segmentacija ni ova ne daje idealne rezultate, ali mali preostali nesegmentirani dijelovi ne utiču značajno na nukleocitoplazmatski odnos. Upotrebom dobijene maske se izdvajaju samo jedra i citoplazma u epitelu čija se ukupna površina koristi za izračunavanje nukleocitoplazmatskog odnosa, Sl. 4.

Prethodno opisani postupak je korišten za izračunavanje nukleocitoplazmatskog odnosa epitelnih ćelija u glavi i tijelu pterigijuma, kao i u epitelu konjunktive i rožnjače koji predstavljaju uzorke kontrolne grupe.

Analizom slika testne grupe pterigijuma (15 uzoraka) i kontrolnih grupa rožnjače (5 uzoraka) i konjunktive (15 uzoraka) dobijeni su rezultati predstavljeni u Tabeli I.



Slika 3. Maska koja predstavlja samo oblast epitela



Slika 4. Izdvojena jedra i citoplazma unutar epitela. a) Segmentirana jedra u epitelu, b) Segmentirana citoplazma u epitelu

Statističkom analizom, uz pomoć t-testa, je pokazano da je NC odnos epitelnih ćelija glave pterigijuma statistički značajno manji u odnosu na NC odnos epitelnih ćelija tijela pterigijuma ($t=3,87$; $p<0,05$).

Takođe je pokazano da se NC odnos epitela glave pterigijuma statistički značajno ne razlikuje od NC odnosa epitela rožnjače ($t=0,248$; $p>0,05$), a da se NC odnos epitela tijela pterigijuma statistički značajno ne razlikuje od NC odnosa epitela konjunktive ($t=1,53$; $p>0,05$). Stoga se na osnovu automatske segmentacije i kvantitativne analize zaključuje da

je epitel glave pterigijuma sličan epitelu rožnjače, a da je epitel tijela pterigijuma sličan epitelu konjunktive.

TABELA I. VRIJEDNOSTI NUKLEOCITOPLAZMATSKOG ODNOSA

	Testni zorc pterigijuma		Kontrolna grupa 1	Kontrolna grupa 2
	NC odnos glave pterigijuma	NC odnos tijela pterigijuma	NC odnos rožnjače	NC odnos konjunktive
Srednja vrijednost	0,305	0,565	0,286	0,472
Standardna devijacija	0,165	0,203	0,098	0,119

Čelijska mjerenja epitela pterigijuma, realizovana digitalnom obradom slike, pokazuju da je nukleocitoplazmatski odnos epitelnih ćelija glave manji od epitelnih ćelija tijela pterigijuma. Dobijeni rezultati su potvrđeni deskriptivnom histološkom analizom koja pokazuje da se u glavi pterigijuma pločastoslojeviti epitel sastoji od 3 do 7 slojeva epitelnih ćelija, sa značajno obilnijom citoplazmom u odnosu na epitelne ćelije tijela pterigijuma, koje daju 6 do 9 slojeva epitela.

IV. ZAKLJUČAK

U radu je predložen automatski metod kvantitativne analize histoloških slika namijenjen za izračunavanje nukleocitoplazmatskog odnosa, tj. odnosa površine jedara i citoplazme epitelnih ćelija, za različite dijelove epitelnog tkiva pterigijuma. Korišten je metod segmentacije slika koji se bazira na klasterizaciji po pravilu najbližeg susjeda, sa manuelnim izdvajanjem uzoraka regiona od interesa, radi određivanja $a \cdot b^*$ kolor markera svakog obilježenog područja. Time se slika segmentira na jedra, citoplazmu i vezivno tkivo. Posebna pažnja je posvećena izdvajanju epitela, jer je za analizu bitan samo nukleocitoplazmatski odnos u epitelu. Rezultati automatske kvantitativne analize epitela pterigijuma i epitela tkiva kontrolnih grupa su u osnovi potvrđeni rezultatima deskriptivne histološke analize. Automatski segmentirane kompleksne slike histoloških uzoraka zasigurno sadrže dodatne informacije koje bi mogle biti od interesa u budućim medicinskim istraživanjima epitela površine oka kao dopuna tradicionalnih dijagnostičkih metoda. U budućem radu će se ispitati primjena predloženog metoda na slike dobijene različitim metodama bojenja i slike histoloških tkivnih rezova sa slabom diferenciranim strukturama. Primjena različitih metoda za segmentaciju i uporedna analiza dobijenih rezultata će takođe biti jedan od pravaca budućih istraživanja.

LITERATURA

- [1] R. C. Gonzalez, and R. E Woods, Digital Image Processing. Pearson, 3rd Ed., Prentical Hall, 2008
- [2] B. Rosidi, N. Jalil, N. M. Pista, L. H. Ismail, E. Supriyanto, and T. L. Mengko, "Classification of Cervical Cells Based on Labeled Colour Intensity Distribution," International Journal of biology and biomedical engineering, issue 2, vol. 5, 2011

- [3] A. Nedzved, A. Belotserkovsky, and S. Ablameyko, "Computer systems of histology image analysis in Belarus," Annales Academiae Medicae Bialostocensis, vol. 50, 2005
- [4] F. J. Cisneros, P. Cordero, A. Figueroa, and J. CastellanosB, "Histology Image Segmentation," International Journal Information Technologies & Knowledge, vol.5, no. 1, 2011
- [5] M. Popović, Digitalna obrada slike. Akademska misao, Beograd, 2006.
- [6] T. Acharya and A. K. Ray, Image Processing: Principles and Applications. A Wiley-Interscience Publication, London, 2005.
- [7] H. S. Prasantha, H. L. Shashidhara, K. N. B. Murthy, and L. G. Madhavi, "Medical image Segmentation," International Journal on Computer Science and Engineering, vol. 2, no. 4, pp. 1209-121, 2010
- [8] S. Dutta, and B. B. Chaudhuri, "Homogenous Region based Color Image Segmentation," Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science, vol. 2, San Francisco, October 20-22, 2009
- [9] L. He, L. R. Long, S. Antani, and G. Thoma, "Distribution Fitting-based Pixel Labeling for Histology Image Segmentation," Proc. SPIE 7963, 2011
- [10] B. Karacali, and A. Tözeren, "Automated detection of regions of interest for tissue microarray experiments: an image texture analysis," BMC Medical Imaging, vol. 7, no. 2, 2007
- [11] Z. Babić, V. Vujković, i G. Mikač, "Kompjuterska analiza slike kao metoda za kvantifikaciju mastocita u konjunktivi oka," Infoteh-Jahorina, 2002
- [12] L. Tong, J. Chew, Yang H, L. P. K. Ang, D. T. H. Tan, and R. W. Beuerman, "Distinct gene subsets in pterygia formation and recurrence: dissecting complex biological phenomenon using genome wide expression data," BMC Medical Genomics, vol. 2, no. 14, 2009
- [13] B. Džunić, P. Jovanović, G. Zlatanović, D. Veselinović, A. Petrović, and I. Stefanović, "Comparative analysis of histopathological and clinical characteristics of pterygium," Vojnosanit Pregled, vol. 67, no. 2, 2010
- [14] J. Chui, M. T. Coroneo, L. T. Tat, R. Crouch, D. Wakefield, and N. Di Girolamo, "Ophthalmic Pterygium, A Stem Cell Disorder with Premalignant Features," AJP, vol. 178, no. 2, 2011
- [15] T. Golu, L. Mogoanta, T. Streba, D. N. Pirici, D. Malaescu, G. O. Mateescu, and G. Mutiu, "Pterygium: histological and immunohistochemical aspects," Rom J Morphol Embryol, vol. 51, no. 1, 2011

ABSTRACT

Due to structure complexity of histology samples and different methods of their analysis, universal method for histology image segmentation does not exist. This paper proposes segmentation method used for quantity analysis parts of pterygium tissues which has different structure. Calculating the nucleo-cytoplasmic ratios, the ratio of the size (i.e., area) of the nucleus of a cell to the size of the cytoplasm of that cell, for different parts epithelium of a pterygium tissues, and comparing to the results obtained for control group samples, it is shown which cells with their proliferation participate in pterygium occurring. The given results of quantitative histological image analysis of ocular surface epithelium are confirmed by descriptive histological analysis.

QUANTITATIVE HISTOLOGICAL IMAGE ANALYSIS OF OCULAR SURFACE EPITHELIUM

Milos Ljubojevic, Vesna Ljubojevic,
Zdenka Babic, Radoslav Gajanin