

Avtomatska segmentacija Golgijevih aparatov v volumetričnih podatkih z grobo označenim zlatim standardom

Eva Boneš

Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani, Večna pot 113, 1000 Ljubljana
eb1690@student.uni-lj.si

Automatic Segmentation of Golgi Apparatus in Volumetric Data with Roughly Annotated Ground Truth

Golgi apparatus (GA) is a cellular organelle involved in the processing and sorting of proteins in all eukaryotic cells. Due to its numerous functions, structural complexity and organizational dynamics, the role of GA in normal and pathological processes is still under intensive research. Electron microscopy enables direct visualization of GA, yet only recent development of dual beam microscopes (i.e. focused ion beam combined with scanning electron microscope) enabled its organizational studies within relatively large volume of the cell. The bottle neck of the process is manual GA segmentation in the volumetric data. In this work, we present a tripartite approach to automatic segmentation of GA based on a pipeline consisting of i) neural network trained on roughly annotated data, ii) active contours for a more precise segmentation and iii) filtering of false positive results. Using the pipeline on the volume derived from urinary bladder epithelial cell, all of GAs were marked, with only a few false positives where stacks of fusiform vesicles were detected as GA. The proposed algorithm is able to annotate a vast majority of GAs with 89% sensitivity and 99% specificity and 20% of time needed for manually annotating the input data.

1 Uvod

Evkariontske celice so celice, ki gradijo vse mnogocelične organizme. Za razumevanje njihovega delovanja moramo natančno poznati strukturo ter funkcijo številnih celičnih organelov v njihovi notranjosti, vključno z njihovo prostorsko razporeditvijo in velikostjo.

V naši raziskavi se osredotočamo na urotelijske celice, ki sestavljajo urotelijo – specializirano krovno tkivo, ki pokriva sečni mehur. V teh celicah se nahajajo fuziformni vezikli (FV), ki vsebujejo, shranjujejo in prenašajo urotelijske plake, ki so pomemben faktor pri vzpostavitvi krvno-urinske pregrade sečnega mehurja sesalcev. Še vedno ni povsem jasno kako nastajajo, dokazano pa je bilo, da pri tem sodeluje tudi Golgijev aparat (GA).

GA je organel biosintetske poti, kjer potekata funkcionaliziranje in razvrščanje membranskih proteinov, hkrati pa predstavlja križišče ekso- in endocitotske poti v celici. Poznavanje njegove prostorske razporeditve, ki

jo pridobimo s segmentacijo v volumetričnih podatkih, bi pripomoglo k boljšemu razumevanju temeljnih procesov delovanja celic.

Razvoj nove tehnologije za zajemanje volumetričnih mikroskopskih slik z metodo usmerjenega ionskega snopa in vrstične elektronske mikroskopije (FIB-SEM, angl. *focused ion beam combined with scanning electron microscopy technique*) je omogočil neposredno opazovanje GA-jev in možnost njihovega raziskovanja v večjem volumnu celice.

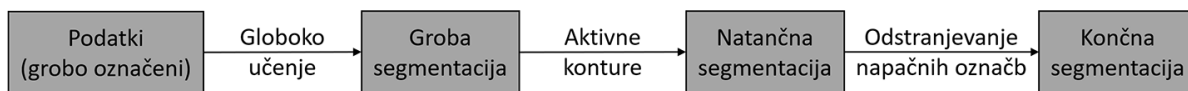
Ročna segmentacija tovrstnih tridimenzionalnih volumnov poteka z občrtavanjem organela na vsaki od rezin, kar zahteva izurjenega uporabnika in predstavlja veliko časovno obremenitev. V članku zato predstavljamo postopek za avtomatsko segmentacijo GA-jev v volumetričnih podatkih elektronske mikroskopije, ki uporablja grobo označen zlati standard za učenje globokega segmentacijskega modela, s čimer smo pohitrili pridobivanje učnih podatkov.

Problem segmentacije v izbrani vrsti celic je posebej kompleksen, saj so FV-ji v citoplazmi diferenciranih urotelijskih celic organizirani v skladovnice, ki so po teksturah zelo podobne skladovnicam GA-jev. Zato kljub temu, da smo pristop ovrednotili samo na tej vrsti celic, pričakujemo, da bi bil predlagan postopek dovolj splošen in uporaben tudi za segmentacijo GA-jev v drugih vrstah celic.

1.1 Segmentacija biomedicinskih slik

Z razvojem novih metod za zajem biomedicinskih slik se hitro razvija tudi analiza le-teh. Ker je ročna segmentacija volumetričnih podatkov časovno zelo zahtevna, raziskovalci razvijajo avtomatske metode, ki segmentacijo pohitrijo. Kot na vseh področjih analize slik večina trenutnih najsodobnejših pristopov za segmentacijo biomedicinskih slik temelji na globokih konvolucijskih nevronskih mrežah.

Prve sodobne metode, kot sta FCN [1] in U-Net [2], so bile ustvarjene za segmentacijo 2D podatkov, z novimi načini zajemanja slik pa se je kmalu pokazala potreba po izkoriščanju informacij, prisotnih v 3D volumetričnih podatkih. V ta namen so kmalu razvili več arhitektur, vsaka izmed njih je bila razvita za svojo vrsto podatkov, npr.: 3D U-Net kot nadgradnjo U-Net [3] so razvili za slike ledvic, V-Net [4] za segmentacijo prostate, DeepMedic



Slika 1: Predlagani pristop k avtomatski segmentaciji Golgijevih aparatov

[5] za segmentacijo lezij v možganih.

Vse omenjene arhitekture na svojih področjih dosežajo vrhunske rezultate, kar pa ne pomeni, da najboljše rezultate dosežajo na vseh vrstah podatkov. Zato je pri razvoju novih pristopov pomembno, da upoštevamo lastnosti ciljnega področja [6]. Nedavno je bila za segmentacijo mitohondrijev in endolizosomov v volumetričnih podatkih elektronske mikroskopije predstavljena arhitektura HighRes3DZMNet [7], ki kot nadgradnja HighRes3DNet [8] dodaja uporabo kontrastnih konvolucijskih filtrov na prvih nivojih konvolucijske nevronske mreže za izenačevanje svetlosti vhodnih podatkov, kar je pomembno predvsem pri mikroskopskih slikah, pri katerih hitro pride do svetlobnih artefaktov. Čeprav je na področju segmentacije celičnih organelov tovrstnih namenskih arhitektur veliko, pa pristopa za avtomatsko segmentacijo GA-jev v volumetričnih podatkih po nam znanih podatki še ni.

V tem članku zato predlagamo nov pristop k reševanju tega problema, ki poleg avtomatske segmentacije tudi pohitri označevanje vhodnih podatkov, kar je uporabno za segmentacijo vseh vrst vhodnih podatkov.

2 Segmentacija

Globoke arhitekture za učenje navadno potrebujejo veliko množico označenih podatkov. Zaradi velike raznolikosti GA-jev znotraj celice in zaradi njihovega razgibanega roba je njihovo natančno ročno označevanje v volumetričnih podatkih časovno zelo zahtevno, prav tako pa zelo hitro pride do napak.

Zato predlagamo pristop v treh korakih. V prvem koraku globoko arhitekturo nadzorovano učimo na grobo označenih podatkih, kar nam kot rezultat vrne model, ki je sposoben avtomatsko grobo označiti območja, kjer se nahajajo GA-ji. Na teh podatkih nato uporabimo metodo aktivnih kontur za pridobitev bolj natančnih robov GA-jev. Na koncu iz dobljene segmentacije še odstranimo napačne označbe. Pristop je v celoti avtomatski in je prikazan na Sliki 1.

Posamezni deli predlaganega pristopa so bolj podrobno opisani v naslednjih podpoglavjih.

2.1 Podatki

Mikroskopski podatki, ki smo jih uporabili, so del podatkovne baze UroCell [7]. Pridobljeni so bili z elektronskim mikroskopom FIB-SEM in prikazujejo krovne celice iz epitelija mišjega mehurja. Dimenzija enega voksla je približno $16 \times 16 \times 15 \text{ nm}$. Celoten volumen je bil razdeljen na manjše dele velikosti $256 \times 256 \times 256$

vokslov, tako da vsak izmed podvolumnov zavzema približno $4 \times 4 \times 4 \mu\text{m}$. Slika 2a prikazuje enega izmed podvolumnov.

GA-je smo ročno označili z odprtokodnim orodjem Slicer3D [9]. Ročne oznake smo naredili za 9 podvolumnov. Na Sliki 3a je vidno, da imajo GA-ji razgiban rob, ki smo ga mi le grobo obkrožili. Vse označbe je pregledal strokovnjak s področja celične biologije.

2.2 Globoko učenje

Za segmentacijski model smo uporabili globoko arhitekturo HighRes3DZMNet [7], ki je bila razvita na podatkih, ki jih za segmentacijo GA-jev uporabljamo tudi mi. HighRes3DZMNet je konvolucijska nevronska mreža, sestavljena iz 20 slojev, ki na izhodu določijo pripadnost posameznega voksla ciljnim razredom.

Za učenje smo uporabili 9 podvolumnov, ki smo jih razdelili na učno (7) in testno (2) množico. Volumni so vsebovali od 0 do 3 GA-je. Ker HighRes3DZMNet uporablja obogatitev podatkov, se je, kljub sicer majhni učni množici, izkazalo, da so rezultati zadovoljivi.

2.3 Aktivne konture

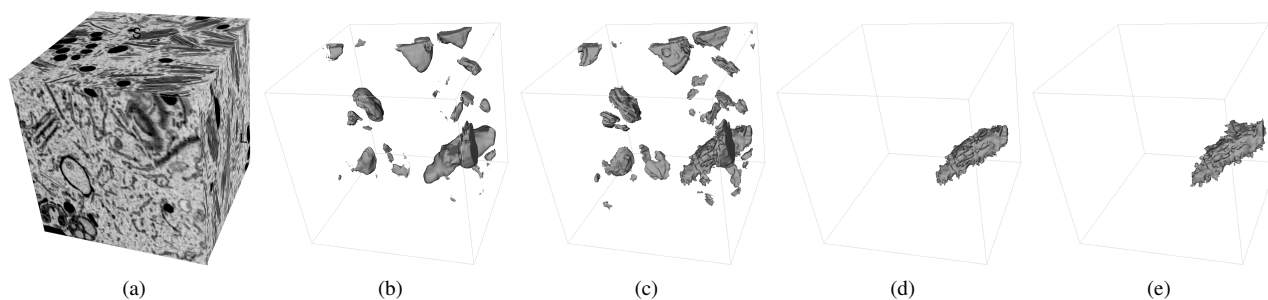
Aktivne konture [10] se pogosto uporabljajo pri obdelavi medicinskih slik, predvsem za segmentacijo in določanje meja objektov. Algoritem glede na prvotno oceno meje objekta to mejo iterativno prilagaja, pri čemer minimizira energijsko funkcijo in se s tem približuje dejanski meji.

Ker metoda deluje na 2D podatkih, jo izvedemo na vsaki izmed rezin volumetričnih podatkov (po vseh treh dimenzijah), kjer za prvotno oceno meje objekta uporabimo grobo mejo segmentiranih GA-jev, pridobljeno z globokim modelom. Na koncu združimo podatke o novih mejah tako, da voksle, ki so bili vsaj na eni izmed dimenzij označeni kot GA, označimo kot GA tudi na končni segmentaciji.

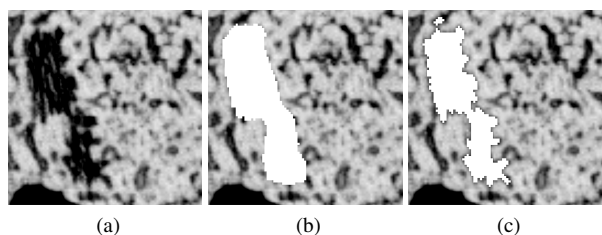
Pristop se je izkazal kot primeren za reševanje našega problema. Kot je vidno na Sliki 3, pristop dobro deluje tudi v primeru, ko je del začetne obrobe znotraj objekta, ki ga želimo obkrožiti. Z minimiziranjem energije se namreč na tistem mestu obroba razširi navzven.

2.4 Odstranjevanje napačnih označb

V urotelijskih celicah se nahajajo tudi FV-ji, ki na mestih, kjer so združeni v sklade, teksturno izgledajo zelo podobno kot GA-ji, kar se vidi na Sliki 4a. Posledično predlagana metoda proizvede tudi nekaj napačno pozitivnih segmentacij, kjer sklade FV-jev označi kot GA-je. Z analizo napačnih segmentacij smo odkrili, da lahko tovrstne napake v veliki meri odpravimo že s filtriranjem po



Slika 2: Vhodni podatki in segmentacija GA-ja na enem podvolumnu. (a) Vhodni podatki. (b) Rezultat globokega učenja. (c) Rezultat metode aktivnih kontur. (d) Končna segmentacija – rezultat odstranjevanja napačnih označb. (e) Zlati standard.



Slika 3: (a) Del 2D rezine enega izmed podvolumnov z GA-jem. (b) Segmentacija GA-ja pred uporabo aktivnih kontur. (c) Segmentacija GA-ja po uporabi aktivnih kontur.

velikosti, saj so skladi navadno manjši. Tako odstranimo vse segmentirane predelke, ki so po volumnu manjši od 80 % velikosti najmanjšega GA-ja (pribl. $0,19 \mu\text{m}^3$).

3 Rezultati

3.1 Vrednotenje

Za vrednotenje smo uporabili mere uspešnosti, ki se najpogosteje uporabljajo pri analizi biomedicinskih slik: Diceov koeficient (DSC, angl. *Dice Similarity Coefficient*), stopnja pravilno pozitivnih primerov – občutljivost (TPR, angl. *true positive rate*) in stopnja pravilno negativnih primerov – specifičnost (TNR, angl. *true negative rate*). Mere so definirane v članku Taha et. al. [11]. Izmerili smo tudi čas, ki ga porabimo za grobo in natančno ročno označevanje volumnov.

3.2 Rezultati

Stopnja metode	DSC	TPR	TNR
Po globokem učenju	0,515	0,861	0,983
Po uporabi aktivnih kontur	0,501	0,876	0,982
Končna segmentacija	0,926	0,885	0,999

Tabela 1: Rezultat na različnih stopnjah naše metode. Zадnja vrstica predstavlja rezultat celotnega predlaganega pristopa.

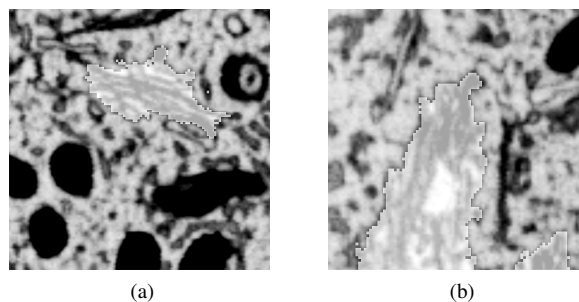
Rezultati so prikazani v Tabeli 1. Izračunali smo jih na dveh podvolumnih, ki smo ju uporabili kot te-

stno množico. Za potrebe evalvacije smo oba podvolumna ročno označili z natančnim robom. Rezultati v Tabeli 1 predstavljajo povprečni rezultat obeh testnih podvolumnov. Ker druge metode za avtomatsko segmentacijo GA-jev v volumetričnih podatkih še nismo zasledili, našega pristopa nismo mogli primerjati z drugimi.

Čas natančnega ročnega označevanja povprečno velikega GA-ja je bil 2,5 ure, medtem ko je čas grobega ročnega označevanja znašal 0,5 ure, kar je petkratna po-hitritev.

3.3 Razprava

Rezultati po globokem učenju, uporabi aktivnih kontur in odstranjevanju napačnih označb dosegajo visoke mere uspešnosti. Diceov koeficient je 0,92, prav tako je zelo visok TNR, nekoliko nižji pa je TPR. To lahko pripišemo sledečim pomankljivostim.



Slika 4: Napačne napovedi segmentacije. (a) FV označen kot GA. (b) Prazen prostor v sredini, označen kot GA.

Problem, ki se še vedno pojavlja, so napačne označbe, ki jih tudi filtriranje ni odstranilo. V vseh primerih so to označbe FV-jev, kot je prikazano na Sliki 4a.

Prav tako del napak, kot je vidno na Sliki 4b, doprinejajo tudi prazni prostori na sredini GA-jev, ki jih ročno označimo kot ozadje, ker pa je naš globoki model naučen na grobo označenih podatkih, sredinskih prostorov ne odstrani. Slednje sicer ni velika težava, saj nam zunanje meje GA-jev že dajejo veliko informacij – število GA-jev v celici, njihova prostorska razporeditev in odnosi med njimi. Notranja struktura GA-jev nas trenutno ne zanima toliko, je pa to eden izmed vidikov, ki ga želimo obravnavati v prihodnosti.

Nizke mere uspešnosti pred uporabo odstranjevanja napačnih označb so razumljive, saj je v celicah precej skladov FV-jev, ki so zelo podobni GA-jem, vendar jih s filtriranjem večino odstranimo. Zanimivo pa je, da vidimo zmanjšanje uspešnosti po uporabi metode aktivnih kontur. Do tega pride predvsem zaradi napačno označenih skladov FV-jev, kjer je samo del sklada označen kot GA, torej rob segmentacije na nekaterih delih poteka znotraj sklada, kar povzroči širjenje roba pri uporabi aktivnih kontur in s tem še večje število napačno segmentiranih vokslov.

Kljub temu da rezultatov nismo mogli primerjati z ostalimi pristopi, nam tudi kvalitativna analiza kaže, da pristop deluje dobro. Na Sliki 2 so prikazani zlati standard in rezultati algoritma na enem izmed testnih podvolumnov.

Izkazalo se je, da naša metoda na testni množici nikoli ni zgrešila celotnega GA-ja, razen v enem primeru, ko je bil znotraj podvolumna samo njegov manjši del in je bila posledično njegova velikost manjša kot meja filtriranja pri odstranjevanju napačnih označb. Pri segmentiranju celotnega volumna celice do takih napak ne bi prišlo.

Prednost predlaganega pristopa je tudi pohitren postopek ročnega označevanja. Pri povprečno velikem GA-ju smo za natančno ročno označevanje porabili petkrat več časa kot za grobo označevanje, ki ga uporabljamo pri globokem učenju. To pomeni, da bi za podatke, na katerih smo testirali naš pristop, z natančnim označevanjem porabili približno 50 ur več. Kljub temu da uporabljamo grobo označen zlati standard, je predlagan segmentacijski pristop popolnoma avtomatski.

4 Zaključek

Z razvojem tehnologije za zajem vse bolj natančnih mikroskopskih podatkov se kaže vedno večja potreba po pristopih za analizo le-teh, predvsem tistih, katerih raziskovanje je bilo prej zaradi nezadostne tehnologije oteženo. V članku smo zato predstavili pristop za avtomatsko segmentacijo Golgijevih aparatov v volumetričnih podatkih elektronske mikroskopije, ki je po nam znanih podatkih prvi na tem področju. Poleg uspešne segmentacije naš pristop z uporabo grobo segmentiranih učnih podatkov znatno zmanjša čas ročnega označevanja, ki je potrebno za nadzorovano globoko učenje. Predlagani pristop bo lahko uporabljen tudi na drugih področjih analize slik, kjer želimo segmentirati objekte z zapletenimi robovi, katerih ročno označevanje bi sicer vzelo preveč časa.

Pri nadaljnjem delu bomo izboljšali način odstranjevanja napačnih označb z vključevanjem dodatnih parametrov. Nadaljevali bomo tudi z izboljšanjem same segmentacije in pristop preizkusili na drugih podatkovnih zbirkah.

Celice sestavljajo vsa živa bitja, pa vendar njihovega delovanja še ne razumemo popolnoma. S predlaganim pristopom olajšujemo nadaljnje raziskovanje celičnih struktur in njihovih odnosov.

Zahvale

Za vso pomoč, podporo in spodbudo pri izdelavi dela se zahvaljujem asist. Manci Žerovnik Mekuč in mentorju izr. prof. dr. Matiju Maroltu iz Laboratorija za računalniško grafiko in multimedije na Fakulteti za računalništvo in informatiko ter doc. dr. Samu Hudoklinu iz Inštituta za biologijo celice na Medicinski fakulteti.

Literatura

- [1] E. Shelhamer, J. Long, and T. Darrell, "Fully convolutional networks for semantic segmentation," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 39, pp. 1–1, 2016.
- [2] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, "U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation," *LNCS*, vol. 9351, pp. 234–241, 2015.
- [3] Çiçek, A. Abdulkadir, S. Lienkamp, T. Brox, and O. Ronneberger, "3d u-net: Learning dense volumetric segmentation from sparse annotation," pp. 424–432, 2016.
- [4] F. Milletari, N. Navab, and S.-A. Ahmadi, "V-net: Fully convolutional neural networks for volumetric medical image segmentation," pp. 565–571, 2016.
- [5] K. Kamnitsas, C. Ledig, V. F. Newcombe, J. P. Simpson, A. D. Kane, D. K. Menon, D. Rueckert, and B. Glocker, "Efficient multi-scale 3d cnn with fully connected crf for accurate brain lesion segmentation," *Medical Image Analysis*, vol. 36, pp. 61 – 78, 2017.
- [6] G. Litjens, T. Kooi, B. E. Bejnordi, A. A. A. Setio, F. Ciompi, M. Ghafoorian, J. A. [van der Laak], B. [van Ginneken], and C. I. Sánchez, "A survey on deep learning in medical image analysis," *Medical Image Analysis*, vol. 42, pp. 60 – 88, 2017.
- [7] M. Žerovnik Mekuč, C. Bohak, S. Hudoklin, B. H. Kim, R. Romih, M. Y. Kim, and M. Marolt, "Automatic segmentation of mitochondria and endolysosomes in volumetric electron microscopy data," *Computers in Biology and Medicine*, vol. 119, p. 103693, 2020.
- [8] W. Li, G. Wang, L. Fidon, S. Ourselin, M. J. Cardoso, and T. Vercauteren, "On the compactness, efficiency, and representation of 3d convolutional networks: Brain parcellation as a pretext task," pp. 348–360, 2017.
- [9] R. Kikinis, S. Pieper, and K. Vosburgh, *3D Slicer: A Platform for Subject-Specific Image Analysis, Visualization, and Clinical Support*, 2014, vol. 3.
- [10] M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos, "Snakes: Active contour models," *International Journal of Computer Vision*, vol. 1, no. 4, pp. 321–331, 1988.
- [11] A. A. Taha and A. Hanbury, "Metrics for evaluating 3d medical image segmentation: analysis, selection, and tool," *BioMed Central*, vol. 15, p. 29, 2015.