



CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA BIOMEDICA

TESI DI LAUREA

**Sviluppo di un algoritmo per il riconoscimento
automatico di tessuto neoplastico prostatico a
partire da parametri cito-architetturali**

Pierluigi Cabiddu

Relatori

Prof. Filippo MOLINARI

Ing. Massimo SALVI

Indice

1	Il Carcinoma della prostata	8
1.1	Epidemiologia, eziologia e fattori di rischio	8
1.2	Anatomia patologica e classificazione	9
1.3	Il referto istologico: le agobiopsie prostatiche e la prostatectomia . .	12
1.4	Diagnosi e stadiazione	14
2	Scopo della tesi	17
3	Materiali e metodi	18
3.1	Workflow overview	18
3.2	Definizione del dataset	20
3.3	Features Extraction	20
3.3.1	Features morfologiche	20
3.3.2	Features cromatiche	23
3.3.3	Features strutturali	25
3.3.4	Features di tessitura	33
3.4	Gland Selection	34
3.5	Features Selection	38
3.6	Training e Testing delle reti neurali	45
3.7	PostProcessing	45
4	Risultati	49
4.1	Dataset 1	49
4.2	Dataset 2	53
4.3	Dataset 3	57
5	Discussione e conclusioni	61

Abstract

Nei paesi occidentali il carcinoma prostatico rappresenta la neoplasia più frequentemente diagnosticata e presenta un'incidenza in continuo aumento. Attualmente la biopsia rappresenta l'unica metodica che consente di confermare la diagnosi di neoplasia prostatica. Le biopsie vengono esaminate visivamente, questo tipo di analisi è dipendente dall'esperienza dell'anatomopatologo e perciò soggetta a problemi di variabilità intra ed inter operatore, inoltre richiede molto tempo per essere eseguita. Lo studio descritto in questa tesi di laurea si pone come obiettivo l'implementazione di un algoritmo automatico per la classificazione del tessuto prostatico in modo da poter fornire all'anatomopatologo un supporto per l'ottimizzazione dei tempi della diagnosi. Il classificatore è stato progettato in modo da avere una sensibilità elevata ed essere in grado di fornire una classificazione indipendente dal tipo di segmentazione. Per la caratterizzazione delle ghiandole prostatiche oltre ai descrittori spesso usati in letteratura (cromatici, morfologici e di tessitura) sono stati calcolati anche dei descrittori che rappresentassero la distribuzione nello spazio delle varie componenti della ghiandola (lume, nuclei e citoplasma) in maniera indipendente dal tipo di segmentazione. A partire dal dataset completo sono stati ricavati due subset rimuovendo i campioni che potessero polarizzare il classificatore. In seguito sono state ricavate le features rilevanti per ogni dataset i che sono state poi utilizzate per il training di tre reti neurali. Sono stati confrontati i risultati ottenuti con le 3 reti fornendo in input immagini di tessuto prostatico con ghiandole segmentate automaticamente. La rete con le performance migliori presenta un'accuratezza pari a 87.67% nella classificazione dei pixel, ed un'accuratezza pari a 84.80% e una sensibilità superiore al 95.83% nella classificazione delle immagini. Il test ha quindi dimostrato che il classificatore è in grado di rilevare la quasi totalità delle immagini in cui è presente tessuto tumorale indipendentemente da come sono state segmentate le regioni ghiandolari e per questo può fornire un'utile e versatile strumento di supporto alla diagnosi per l'anatomopatologo.

Introduzione

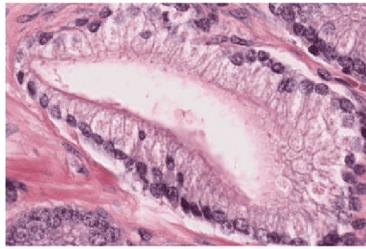
Nei paesi europei il carcinoma prostatico è la neoplasia più frequentemente diagnosticata nei maschi adulti e rappresenta la terza causa di morte, inoltre la maggior parte dei Registri Tumori rileva un aumento dell'incidenza di questo carcinoma. Lo stato della prostata è valutato attraverso diversi step che comprendono una dettagliata intervista medica, rettoscopia ed antigene specifico per la prostata (PSA). In caso di anomalie nel risultato dell'esplorazione rettale o nel caso in cui il livello del PSA sia sopra il valore di circa 4ng/ml, viene richiesta una biopsia della prostata per verificare che anomalie in questi due esami siano dovute ad un carcinoma [1]. I campioni di tessuto che vengono prelevati durante la biopsia sono fissate con formalina ed incluse in paraffina, che viene sezionata in sottili fette utilizzando un microtomo. Queste sezioni vengono deparafinizzate e colorate con ematossilina ed eosina (H&E) in modo da poter essere esaminate al microscopio dal patologo [2].

Le caratteristiche strutturali delle ghiandole cambiano in base alla progressione del carcinoma comunque, nonostante questi cambiamenti, tutte le regioni ghiandolari condividono delle caratteristiche che possono essere utilizzate per identificarle:

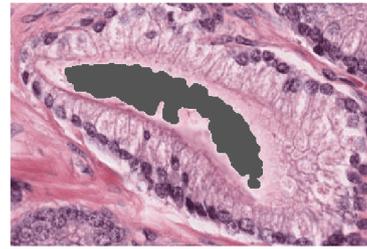
- i valori di colore identificano le strutture di interesse, il lume appare bianco, il citoplasma appare rosa ed i nuclei appaiono viola.
- ogni ghiandola presenta delle strutture organizzate in maniera sequenziale: il lume è circondato dal citoplasma delle cellule epiteliali, con un anello di nuclei che definisce il bordo della regione ghiandolare.

In Figura 1 vengono mostrate le 3 regioni che compongono una ghiandola: lume circondato da cellule epiteliali (Figura 1b), il citoplasma delle cellule che circondano il lume (Figura 1c), i nuclei delle cellule che circondano il lume (Figura 1d). Queste strutture durante la progressione del carcinoma vanno incontro a diversi cambiamenti che dovranno essere analizzati per descriverne la malignità.

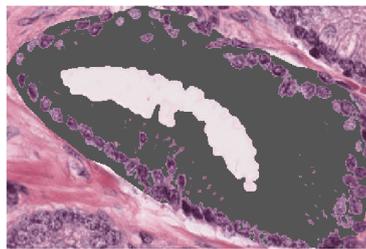
Nel caso in cui il patologo abbia il sospetto della presenza del carcinoma, basato sull'assenza del microepitelio o del layer di cellule basali, vengono osservati i cambiamenti nel livello di malignità del tessuto, che cambiano l'apparenza del tessuto



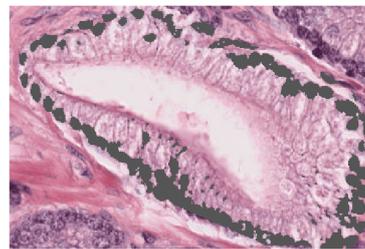
(a) Ghiandola



(b) Lume



(c) Citoplasma



(d) Nuclei

Figure 1: Struttura ghiandolare del tessuto prostatico.

stesso: le ghiandole nel tessuto canceroso diventano più piccole, regolari e assumono una forma impacchettata man mano che il tumore diventa sempre più maligno.

La malignità del carcinoma alla prostata viene misurata utilizzando il sistema di grading di Gleason. Il Gleason score è la somma di due gradi di Gleason corrispondenti ai due pattern maggiormente presenti all'interno del tessuto esaminato. I gradi di Gleason assumono valori che vanno da 1 (tessuto relativamente benigno) a 5 (tessuto canceroso e tumore altamente aggressivo) e misurano l'aggressività del carcinoma tramite l'osservazione di caratteristiche qualitative come il grado di separazione ghiandolare ed i pattern strutturali del tumore.

Le ghiandole classificate con il Gleason score di grado 1 si presentano uniformi e di medie dimensioni, gli acini sono fitti ma distinti. Le ghiandole classificate con il Gleason score di grado 2 presentano delle minime infiltrazioni e sono disposte in

maniera meno uniforme. Le ghiandole classificate con il Gleason score di grado 3 sono raggruppate in maniera più ravvicinata rispetto alle ghiandole di un tessuto sano. In caso di Gleason score di valore 4 le ghiandole si fondono tra loro, creando quelle che appaiono come grandi ghiandole contenenti molteplici lumi, questo è anche noto come pattern cribriforme. In caso di Gleason score di valore 5 le ghiandole difficilmente differenziabili e presentano un sottile layer di cellule epiteliali viste nello stroma. Nonostante il sistema di grading secondo Gleason sia andato incontro ad alcune revisioni da quando è stato proposto continua a rimanere un forte indicatore prognostico. Tanti studi sono stati eseguiti con l'obiettivo di sviluppare sistemi automatici basati sul Gleason score per l'analisi di immagine istologiche colorate con H&E. Gli approcci adottati da questi studi possono essere classificati in due categorie: quelli basati sulla classificazione e quelli basati sulla segmentazione. I metodi associabili al primo gruppo utilizzano diverse features estratte dall'immagine per produrre un Gleason score senza bisogno che l'immagine venga segmentata. Queste features includono la tessitura delle immagini H&E ([3]) ed immagini multispettrali. I metodi associabili al secondo gruppo sono composti da due step. Il primo step è l'estrazione delle porzioni di tessuto da analizzare dalle immagini H&E, il secondo step consiste nel calcolo dei descrittori a partire dal tessuto segmentato in precedenza. Infine viene creato un classificatore per il calcolo del Gleason score. La maggioranza dei metodi utilizzati si basano sull'estrazione di caratteristiche morfologiche ([4], [5]) per caratterizzare e classificare i campioni di tessuto, altri studi utilizzano la trasformata di Fourier, la trasformata Wavelet ([6]) e l'analisi frattale per estrarre le caratteristiche di tessitura ([7]). Alcune caratteristiche delle immagini H&E di tessuto prostatico rappresentano un ostacolo nello sviluppo di un algoritmo automatico per la segmentazione delle regioni ghiandolari e nella ricerca dei descrittori appropriati per una corretta classificazione.

Il processo di colorazione rappresenta un ostacolo per il pre-processing dell'immagine da dare successivamente in ingresso ad un algoritmo automatico, questo perché, nonostante l'anatomopatologo sia in grado di controllare la concentrazione del colorante e il bilanciamento dei colori, le minime variazioni modificano i risultati della colorazione, per questo motivo è necessario un processing delle immagini

prima che queste vengano fornite in input ad un algoritmo automatico. Diverse variabili come il tempo di esposizione, l'ingrandimento, lo spettro di illuminazione e la concentrazione di colore devono essere normalizzate in modo da avere consistenza dal punto di vista cromatico nelle diverse immagini ([8], [9]). È necessario aggiungere che non è stato ancora "trovato" un metodo universale su come la normalizzazione deve essere eseguita e su quali devono essere i suoi risultati([10]).

Il carcinoma alla prostata è un tumore multifattoriale caratterizzato dalla presenza di pattern di crescita eterogenei ([11]), per questo un tessuto classificato con un Gleason score può avere diversi pattern per quanto riguarda le cellule, i nuclei o le ghiandole. All'interno del carcinoma prostatico esistono diverse varianti istologiche ed alcune varianti non possono essere ricondotte a nessun valore del Gleason score ([12]). Inoltre il sistema di grading secondo Gleason non fornisce dei buoni risultati dal punto di vista del rischio della metastasi e si correla debolmente con le scelte effettuate dai clinici, per queste ragioni è stato corretto più volte da quando è stato introdotto ([13], [14]) e potrebbe andare incontro ad altri cambiamenti. Questi cambiamenti hanno come effetto quello di aumentare la variabilità delle diagnosi effettuate da diversi patologi e rendono molto difficoltoso costruire un sistema di grading automatico. Nonostante la diagnosi delle biopsie alla prostata da parte di un esperto anatomopatologo sia considerato essere il "gold standard" per la diagnosi del carcinoma della prostata e per lo sviluppo del corretto piano di trattamento, questa tecnica presenta molte problematiche. Data la sua importanza deve essere eseguita da un anatomopatologo esperto e richiede molto tempo per essere eseguita. Inoltre quando un anatomopatologo valuta un campione di tessuto osserva le immagini H&E ottenute dalla biopsia e compara il tessuto osservato con quelli osservati nella sua esperienza pregressa. In sostanza quello che viene fatto è un matching dei pattern strutturali tra i campioni osservati richiamando mentalmente la diagnosi assegnata ai campioni osservati in precedenza, per questo motivo, a prescindere dall'esperienza e dalle competenze dell'anatomopatologo, è ancora presente un'elevata variabilità intra ed inter-osservatore ed esistono ancora delle aree controverse ([14]).

Per questi motivi un algoritmo automatico in grado di differenziare il tessuto prostatico sano e tumorale potrebbe fornire un utile strumento di supporto alla dia-

gnosi, in grado di ottimizzarne i tempi tramite la selezione delle sole immagini in cui è rilevata la presenza di tessuto canceroso.

In questa tesi è stato implementato un algoritmo automatico per la classificazione delle regioni ghiandolari del tessuto prostatico. Il dataset utilizzato per il training comprende 250 immagini ottenute tramite biopsie prostatiche e colorate H&E, le regioni ghiandolari presenti in queste immagini sono state segmentate manualmente e successivamente sono stati calcolati i descrittori. Sono state calcolate le features che potessero evidenziare le variazioni nell'intensità dei pixel, nella morfologia delle ghiandole e nella tessitura dell'immagine, simili a quelle che vengono utilizzate negli studi citati in precedenza, inoltre ne sono state ricavate altre in grado di misurare le variazioni nei pattern strutturali delle ghiandole in maniera quanto più possibile indipendente dalla segmentazione delle ghiandole, in modo da poter classificare correttamente le regioni ghiandolari di tessuto prostatico non tumorale che includono più di una ghiandola e che quindi presentano il pattern di fusione ghiandolare tipico delle ghiandole cancerose. In seguito a partire dal dataset contenente i descrittori calcolati su regioni ghiandolari segmentate manualmente sono stati ricavati due subset di dimensioni ridotte eliminando selettivamente alcune ghiandole. A partire dal dataset completo e dai due subset di features sono state identificate le caratteristiche rilevanti per ogni subset e sono state addestrate 3 reti neurali. Le 250 immagini sono state fornite in input ad un algoritmo per la segmentazione automatica delle regioni ghiandolari. Le regioni ghiandolari segmentate in maniera automatica sono state utilizzate per testare le reti neurali e verificare che fornissero risultati accettabili a prescindere dalla segmentazione. Nel primo capitolo viene descritto il carcinoma alla prostata ed i vari passaggi che portano alla diagnosi. Nel secondo capitolo vengono presentati i materiali ed i metodi utilizzati per lo sviluppo dell'algoritmo. Nel quarto capitolo vengono analizzati i risultati. Nel quinto capitolo vengono discussi i risultati.

1 Il Carcinoma della prostata

1.1 Epidemiologia, eziologia e fattori di rischio

Epidemiologia

Nella maggior parte dei Registri Tumori è segnalata una crescente incidenza del carcinoma alla prostata, questa rappresenta la lesione neoplastica più frequentemente diagnosticata nei maschi adulti europei (22,8%) e rappresenta la terza causa di morte (9,5%), dopo il tumore del polmone e del colon retto([15]); inoltre per i maschi con età superiore a 50 anni costituisce circa il 20% della totalità dei tumori diagnosticati. Con il passare degli anni il test del PSA è diventato uno strumento di screening dei pazienti sempre più comune, questo è stato uno dei fattori che ha provocato l'aumento dell'incidenza di questo carcinoma. Questa metodica ha inoltre introdotto importanti cambiamenti nelle metodologie diagnostiche, favorendo la diagnosi anche in casi asintomatici e preclinici, e terapeutiche del carcinoma prostatico, riducendo l'età della diagnosi e consentendo di individuare tumori in stadio iniziale aumentando complessivamente la probabilità di una guarigione completa. In Italia è presente un gradiente tra Nord e Sud per quanto riguarda l'incidenza, questo fenomeno avviene anche per altri tipi di lesioni neoplastiche, nello specifico al Sud si ha un calo del 25%. Queste variazioni possono essere messe in relazione con la minore diffusione del test del PSA come metodo di screening, ma anche con fattori di suscettibilità, riguardanti lo stile di vita e l'alimentazione. Nonostante sia al primo posto per l'incidenza, questa neoplasia rappresenta la terza causa di morte, con una mortalità di circa 35 decessi ogni 100.000 abitanti/anno, questo valore è in costante diminuzione (circa 1,9% annuo). La probabilità di sopravvivenza dei pazienti affetti da questa neoplasia aumenta costantemente in maniera sensibile e si attesta attorno al 91.4%, questo aumento è principalmente dovuto alla possibilità di anticipare la diagnosi tramite lo screening opportunistico ([16]).

Eziologia e fattori di rischio

L'eziologia del carcinoma prostatico dipende da fattori che possono essere di diverso tipo, principalmente sono di carattere genetico (relativi a razza e familiarità) o di carattere ambientale (relativi all'alimentazione ed a sostanze cancerogene).

- Età (l'incidenza del tumore aumenta con l'età [17]).
- Razza (la razza nera è maggiormente predisposta)
- Fattori ormonali.
- Familiarità (il rischio aumenta da 2 fino a 11 volte nel caso in cui familiari di primo grado risultino affetti da questa neoplasia [18]).
- Dieta (un'alimentazione ipercalorica e ricca di grassi aumenta la probabilità di sviluppare questa neoplasia [19]).

Altri fattori che presentano una correlazione con l'eziopatogenesi della neoplasia e con il suo avanzamento sono il consumo di cibo e bevande alcoliche, il comportamento sessuale, l'infiammazione cronica e l'esposizione professionale ([20]). Nonostante siano stati fatti diversi studi con l'obbiettivo di dimostrare che i fattori di carattere ambientale sono più incisivi rispetto a quelli di carattere genetico ([21]) non ci sono abbastanza evidenze per raccomandare cambiamenti nello stile di vita o nella dieta per diminuire il rischio di sviluppare la neoplasia.

1.2 Anatomia patologica e classificazione

L'adenocarcinoma della prostata è solitamente multifocale e si localizza nel 70% dei casi nella zona periferica della ghiandola, in questo caso è rilevabile tramite esplorazione rettale e risulta essere asintomatica negli stadi iniziali a causa della lontananza dalle vie urinarie, nel 20% dei casi è localizzata nella zona di transizione, di solito si tratta di patologie benigne, e solo nel 5% dei casi nella zona centrale ([22]).

Per la classificazione clinica del carcinoma prostatico viene utilizzata la classificazione TNM ([23]), mentre per quanto riguarda la classificazione istologica i vari isotipi della neoplasia sono stati indicati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2016 ([24]).

Grado istologico.

Il Gleason score rappresenta il gold standard per il grading del carcinoma prostatico, nonostante siano passati circa 40 anni da quando questo sistema è stato

introdotto viene ancora considerato il fattore prognostico più rilevante ([25]).

Il sistema di grading secondo Gleason, basandosi sull'osservazione del livello di differenziazione degli aspetti citoarchiteturali delle ghiandole e sul livello di infiltrazione dello stroma, distingue cinque pattern architeturali delle ghiandole, a ciascuno di questi viene assegnato un punteggio che aumenta in base al livello di malignità. Il Gleason score rappresenta il grado assegnato ai due aspetti strutturali maggiormente presenti nella neoplasia analizzata, il grado assegnato al pattern prevalente rappresenta il grado primario. Il Gleason score può essere formulato in diversi modi a partire dalla gradazione, in origine veniva rappresentato come la somma di grado primario e secondario, definito come il pattern più rilevante dopo il primario a condizione che sia presente almeno nel 5% del tessuto. La classificazione ISUP 2005 prevede invece che sia considerato come pattern secondario il pattern con grado più elevato dei pattern presenti, il primario rimane il pattern più presente. Nell'esame dei campioni chirurgici vengono forniti i due pattern più presenti, ed è possibile inserire un grado terziario per segnalare la presenza di un grado elevato di aggressività (4 o 5) anche nel caso in cui sia poco rappresentato. Nel caso in cui non sia possibile individuare un pattern secondario il punteggio assegnato al pattern primario viene raddoppiato per calcolare il Gleason score. La classificazione ISUP 2005 descrive il tessuto neoplastico per i diversi gradi del sistema di Gleason nella seguente maniera:

- **Grado 1.** Il nodulo si presenta circoscritto e composto da acini fitti ma differenziati, omogenei, ovalari, di medie dimensioni (le ghiandole si presentano di dimensioni maggiori rispetto al pattern 3).
- **Grado 2.** Come per il Grado 1, il nodulo è relativamente circoscritto, ma ai margini possono essere presenti minime infiltrazioni. Le ghiandole sono disposte in modo meno serrato e regolare rispetto al Grado 1.
- **Grado 3.** Le unità ghiandolari presentano dimensioni discrete; in genere le ghiandole sono più piccole di quanto visto nei Gradi 1 e 2. La variabilità di forme e dimensioni è elevata, inoltre è possibile osservare aspetti cribriformi.
- **Grado 4.** Le ghiandole sono micro-acinari confluenti, presentano contorni difficilmente definibili, il lume all'interno della ghiandola presenta delle di-

mensioni poco rilevanti. Si osserva inoltre il pattern cribriforme, la presenza di bordi irregolari e aspetti ipernefrotoidi.

- **Grado 5.** La differenziazione ghiandolare è pressoché assente, si osservano cordoni solidi composti o singole cellule. Questo pattern definisce anche il carcinoma di tipo comedonico, con necrosi centrale circondata da masse che possono essere papillari, cribriformi o solide.

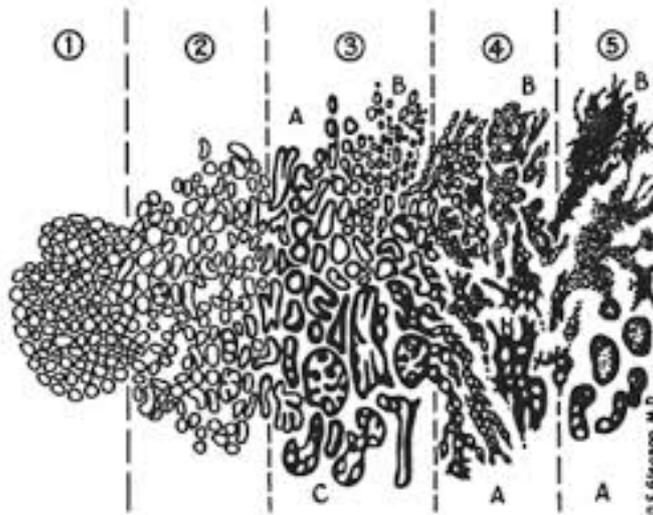


Figure 2: Sistema di grading secondo Gleason.

Il Gleason score rappresenta il criterio standard per il grading istologico del carcinoma prostatico. Nella classificazione WHO 2004 sono state apportate alcune correzioni nel sistema di grading che sono state incorporate nella classificazione WHO 2016. Le modifiche elencate di seguito sono state proposte dall'ISUP nel 2004 e introdotte nel libro blu della WHO nel 2016 ([26]):

- alle ghiandole cribriformi corrisponde il Grado 4;
- alle ghiandole glomeruloidi corrisponde il Grado 4;
- il grading del carcinoma mucinoso è eseguito osservando il grado di struttura;
- alle ghiandole scarsamente formate corrisponde il Grado 4.

Nel 2016 è stata proposta una nuova metodologia che è stata approvata da specialisti patologi ed urologi alla conferenza ISUP del 2014 ([27]). In questo caso

il grading segue la divisione nei cinque diversi gruppi di grado (Grade Group), definiti in base al Gleason, elencati di seguito:

- gruppo di grado 1: score di Gleason inferiore/uguale a 6
- gruppo di grado 2: score di Gleason $3+4=7$
- gruppo di grado 3: score di Gleason $4+3=7$
- gruppo di grado 4: score di Gleason $4+4=8$, $3+5=8$; $5+3=8$
- gruppo di grado 5: score di Gleason 9-10

Questa classificazione ha dimostrato di avere una rilevanza prognostica elevata, e nel libro blu della WHO 2016 è raccomandato di riportare sempre il gruppo di grado (Grade Group) insieme al Gleason score.

1.3 Il referto istologico: le agobiopsie prostatiche e la prostatectomia

Agobiopsie prostatiche

Le informazioni presenti nel referto patologico sono necessarie per definire la prognosi ed il piano terapeutico del paziente, vengono elencate alcune informazioni che devono essere sempre presenti nel referto:

1. Sede e distribuzione della neoplasia.
2. Isto-patologia della neoplasia.
3. Grado Istopatologico della neoplasia.
4. Volume tumorale (numero delle biopsie in cui è rilevata la presenza del carcinoma, quantità di neoplasia espressa, le dimensioni del tumore e deve essere segnalata la biopsia che presenta la maggiore estensione di neoplasia)
5. Invasione locale
6. Invasione perineurale
7. Invasione vascolare/linfatica

Prostatectomia

All'interno del referto patologico di campioni derivati da prostatectomia devono essere presenti tutte le informazioni rilevanti per la scelta del piano terapeutico e per la definizione della prognosi del paziente. I parametri elencati di seguito sono stati approvati all'unanimità da parte di associazioni Americane (CAP) ed Europee (EAU e ESP) ([28]).

1. Tipo istologico della neoplasia
2. Grado istologico della neoplasia (il grading della neoplasia deve essere effettuato tramite Gleason score e Grade Group([29]).
3. Estensione dell'invasione locale
4. pT0
5. Staging patologico
6. Suddivisione in stadi
7. Margini chirurgici
8. Volume del tumore
9. Invasione vascolare
10. Invasione perineurale
11. Differenziazione neuroendocrina

1.4 Diagnosi e stadiazione

La diagnosi di carcinoma prostatico si basa sulle seguenti indagini:

- Esplorazione rettale
- Dosaggio del PSA
- Tecniche di immagini
- Agobiopsia prostatica

Esplorazione rettale

L'esplorazione rettale (ER) rappresenta il primo approccio diagnostico per pazienti che presentano sintomi compatibili con la neoplasia prostatica. Nel 70% dei casi il carcinoma origina nella regione periferica della ghiandola perciò il nodulo viene spesso rilevato tramite palpazione. L'ER è indispensabile ma non può rappresentare l'unica metodica diagnostica dati i bassi valori di sensibilità e specificità.

Dosaggio dell'antigene prostatico specifico (PSA)

Il PSA è una glicoproteina prodotta dal tessuto ghiandolare prostatico, viene secreto nel liquido seminale e in condizioni fisiologiche solo delle quantità ridotte raggiungono la circolazione ematica. Nel caso in cui si sviluppino neoplasie prostatiche, siano esse benigne o maligne, si ha un aumento del PSA nel sangue, che è considerato a tutti gli effetti un marker clinico per questa patologia. Il valore di PSA è valutato rispetto al valore soglia convenzionale di 4 ng/mL, questa soglia presenta un basso valore predittivo, per questo motivo per decidere se eseguire la biopsia oltre al test del PSA viene eseguita l'ER e vengono valutati i fattori di rischio. Sono stati introdotti altri approcci con l'obiettivo di migliorare l'accuratezza diagnostica del test del PSA, come la PSA velocity (l'aumento nel tempo del PSA), la PSA density (rapporto tra PSA e dimensioni della ghiandola) ed il rapporto PSA

libero/totale.

Tecniche di immagini

Ecografia transrettale. Nonostante la gran parte delle neoplasie prostatiche siano lesioni ipoecogene in alcune forme di questo carcinoma è possibile avere iperecogenicità, per questo l'ecografia transrettale (TransRectal UltraSound, TRUS) rappresenta una metodica indispensabile, insieme al test del PSA e all'esplorazione rettale, al fine di guidare la biopsia prostatica nel paziente, nei pazienti sottoposti a biopsia guidata viene rilevato il tumore nel 9.1% dei casi, questo valore sale a 39.3% se la biopsia è guidata tramite ecografia ([30]).

Risonanza magnetica (RM). La RM multiparametrica (mp-RM) è in grado di fornire informazioni anatomiche, funzionali e biologiche che la rendono una metodica fondamentale per l'individuazione e la caratterizzazione delle lesioni alla prostata. Diversi studi hanno confermato che questa metodica è la più indicata per guidare il campionamento bioptico ([31]), dato che presenta miglior contrasto e risoluzione rispetto alla TC quindi consente di distinguere nettamente tessuto canceroso e tessuto sano, che hanno un segnale differente, e di delineare con maggior precisione i contorni della lesione neoplastica ([32]).

Agobiopsia prostatica L'unica metodica che consente di confermare la diagnosi di neoplasia prostatica è la biopsia. La biopsia prostatica viene eseguita in seguito alle analisi indicative elencate in precedenza, che possono essere ER, RM o test del PSA, e dopo aver valutato il rischio che potrebbe comportare in base all'età del paziente e l'eventuale presenza di comorbidità. La biopsia viene effettuata tramite guida ecografica e viene consigliata l'esecuzione di un numero di prelievi tra gli 8 e i 12, a cui è necessario aggiungere prelievi nelle zone individuate tramite ER, TRUS e RM. Il del test del PSA viene utilizzato per decidere se eseguire la biopsia ma i valori da utilizzare come soglia sono ancora oggetto di discussione.

Il risultato negativo di una biopsia non rappresenta sempre l'assenza del tumore, infatti in alcuni casi è necessario ripetere la biopsia, in caso di forte sospetto del reperto clinico, nel caso in cui sia stata guidata tramite ecografia viene ripetuta

ampliando il mapping.

La RM multiparametrica presenta valori elevati di sensibilità nell'individuazione di neoplasie con Gleason score maggiore di 7 ([33]), permette di individuare neoplasie posizionate anteriormente rispetto all'organo che risultato difficilmente identificabili con la biopsia tradizionale ([34]) inoltre la biopsia guidata tramite RM risulta avere maggiore sensibilità rispetto alle biopsie guidate tramite ecografia. I problemi di standardizzazione riguardanti questa metodologia sono oggetto di studio e ad oggi viene consigliata in caso di biopsia negativa con forte sospetto clinico.

2 Scopo della tesi

Lo scopo dello studio descritto in questa tesi di laurea è stato quello di sviluppare un algoritmo automatico per l'analisi e la classificazione delle ghiandole presenti all'interno di immagini H&E ottenute da campioni di tessuto prostatico in due classi: sane e tumorali . Per arrivare a questo risultato sono state analizzate le caratteristiche del tessuto prostatico e sono stati calcolati dei descrittori che fossero adatti a fornire una rappresentazione quantitativa dei pattern architettonici delle ghiandole. Oltre alle features cromatiche, morfologiche e di tessitura, utilizzate anche in studi precedenti, ne sono state calcolate altre che fossero indipendenti dall'effettivo numero di ghiandole presenti all'interno della regione ghiandolare analizzata, tali da poter discriminare regioni ghiandolari sane e cancerose indipendentemente dal tipo di segmentazione, manuale o automatica. Il dataset di features è stato calcolato utilizzando le regioni ghiandolari segmentate manualmente presenti in 250 immagini, in seguito sono stati ottenuti due subset eliminando i campioni che potrebbero polarizzare il classificatore, rendendolo ottimale per le segmentazioni manuale ma non in grado di generalizzare anche sulle segmentazioni automatiche. Successivamente sono stati selezionati i descrittori rilevanti per i 3 dataset e sono stati utilizzati per il training di tre reti neurali. Per verificare che le features selezionate consentissero di ottenere un adeguato livello di accuratezza nella classificazione indipendentemente dal tipo di segmentazione le 3 reti sono state testate fornendo in input le caratteristiche ricavate dalle regioni ghiandolari segmentate da un algoritmo automatico, sono stati infine analizzati i risultati.

3 Materiali e metodi

3.1 Workflow overview

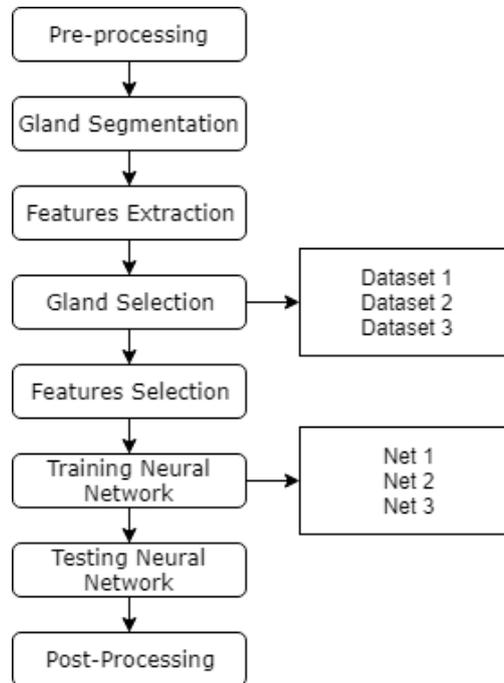


Figure 3: Workflow seguito per il training ed il testing delle reti

Il procedimento schematizzato in Figura 3 mostra i passaggi attraverso i quali è stato ottenuto e testato un algoritmo in grado di estrarre le regioni ghiandolari da immagini rappresentanti campioni istologici di tessuto prostatico e di classificarle come sane o cancerose. Ogni blocco dello schema viene descritto in dettaglio nei paragrafi seguenti.

Pre-processing. Comprende la stain normalization, i valori di intensità dei pixel delle immagini sono stati normalizzati in modo da avere colori simili per le stesse componenti del tessuto prostatico nelle diverse immagini, e la detection di nuclei e lume.

Gland segmentation. Le ghiandole sono state segmentate manualmente da un operatore. La segmentazione è stata effettuata dividendo tutte le ghiandole che

risultavano essere separate da uno strato, anche molto sottile, di stroma e raggruppando le ghiandole collegate da uno strato contiguo di nuclei.

Features extraction. Vengono estratti in totale 102 descrittori per ogni ghiandola. Le features sono divise in 4 gruppi: cromatiche (40), morfologiche (8), strutturali (45) e di tessitura (16). I descrittori cromatici sono basati sul valore di intensità dei pixel, quelli morfologici rappresentano le proprietà geometriche della ghiandola, quelli strutturali forniscono una misura quantitativa della distribuzione spaziale all'interno della ghiandola di nuclei, lume e residuo infine quelli di tessitura misurano delle statistiche che mettono in relazione la posizione nello spazio e l'intensità dei pixel di una stessa ghiandola.

Gland selection. È stata effettuata una riduzione del numero di ghiandole che compongono il dataset completo (Dataset 1) basata su due criteri: la dimensione della ghiandola e la percentuale di lume presente all'interno della ghiandola. Dopo la gland selection vengono ottenuti due subset a partire dal dataset completo: il primo nel quale non sono presenti le ghiandole di dimensione ridotta (Dataset 2) ed il secondo nel quale non sono presenti le ghiandole di dimensione ridotta e le ghiandole con un'elevata percentuale di lume (Dataset 3).

Features Selection. Sono state selezionate le features rilevanti separatamente per il dataset completo e per i due subset tramite forward and backward stepwise regression.

Training NN. È stato effettuato il training di 3 reti neurali feed forward utilizzando il dataset completo e i due subset di features, il ground truth della classificazione è stato fornito da un anatomopatologo.

Testing NN. Per effettuare una prima valutazione delle prestazioni delle reti neurali è stato fornito in input ad ogni rete il rispettivo dataset completo. Successivamente le tre reti neurali sono state testate fornendo in input le features estratte dalle ghiandole segmentate da un algoritmo automatico.

Post-Processing. Dopo aver classificato le ghiandole tramite le reti neurali la classificazione viene corretta da un algoritmo di post-processing che modifica la classe delle ghiandole sulla base della classificazione e delle dimensioni delle ghi-

andole vicine.

3.2 Definizione del dataset

Il dataset è costituito da 250 immagini ottenute da campioni di tessuto prostatico colorati con ematossilina ed eosina che presentano un ingrandimento pari a 40x. I campioni sono stati prelevati da 5 diversi soggetti a cui è stato diagnosticato carcinoma prostatico. Le immagini sono state analizzate da un operatore esperto che ha segmentato manualmente le eventuali zone tumorali presenti all'interno di ogni immagine. Nel dataset sono presenti in totale 144 immagini contenenti delle ghiandole identificate come tumorali, che corrispondono al 57.6% del totale.

3.3 Features Extraction

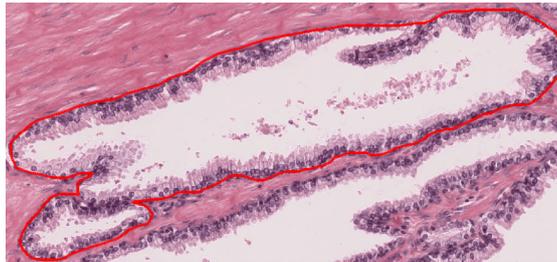
Le caratteristiche della ghiandola e delle strutture che la compongono cambiano tra tessuti sani e tessuti cancerosi. In generale si osserva che nei tessuti sani le cellule epiteliali vanno a formare un layer sottile attorno al lume, mentre nei tessuti tumorali queste cellule crescono all'interno del lume, causandone una diminuzione dell'area ed una variazione nella geometria. Inoltre le ghiandole sane hanno una forma ovalare mentre quelle tumorali presentano una notevole variabilità in forma e dimensione. Infine una differenza fondamentale è la presenza del pattern cribiforme nel tessuto canceroso, che comporta la formazione di agglomerati di ghiandole fuse contenenti molteplici lumi. Dall'analisi di queste differenze sono stati derivati dei descrittori raggruppabili in quattro categorie: cromatici, morfologici, strutturali e di tessitura. Di seguito vengono elencati e ne viene spiegato il significato.

3.3.1 Features morfologiche

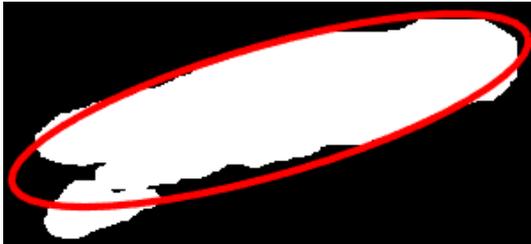
Sono state ricavate 8 caratteristiche morfologiche che rappresentano delle proprietà geometriche della singola ghiandola. La scelta di queste caratteristiche è motivata dal fatto che le ghiandole non tumorali si presentano come uniformi,

di forma pressoché ovale e di medie dimensioni mentre le ghiandole cancerose al contrario presentano una notevole variabilità in forma e dimensioni. Sono stati quindi selezionati alcuni parametri significativi che potessero dare informazioni quantitative sulla forma della ghiandola:

1. 'Area': Calcolata a partire dal numero di pixel che costituiscono la ghiandola.
2. 'Convex Area': Calcolata a partire dal numero di pixel che compongono l'involucro convesso della ghiandola (Figura 4e).
3. 'Filled Area': Calcolata a partire dal numero di pixel presenti nell'immagine della ghiandola in cui sono stati riempiti i buchi di pixel a 0 circondati da pixel con valore 1.
4. 'Eccentricity': Rappresenta il valore di eccentricità dell'ellisse che ha lo stesso momento d'inerzia della ghiandola. Il valore che può assumere va da 0 ad 1, sarà tanto più vicino allo 0 quanto più la ghiandola sarà simile ad una circonferenza e sarà tanto più vicino ad 1 quanto più la ghiandola sarà simile ad un'ellisse schiacciata (Figura 4b).
5. 'Equivalent Diameter': Valore del diametro di una circonferenza con area uguale a quella della ghiandola.
6. 'Major Axis Length': Lunghezza dell'asse maggiore dell'ellisse che ha lo stesso momento d'inerzia della ghiandola (Figura 4c).
7. 'Minor Axis Length': Lunghezza dell'asse minore dell'ellisse che ha lo stesso momento d'inerzia della ghiandola (Figura 4d).
8. 'Solidity': Rappresenta il rapporto tra Area e Convex Area.



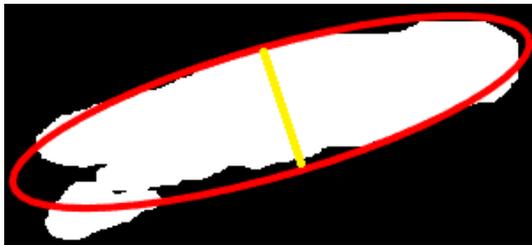
(a) Ghiandola



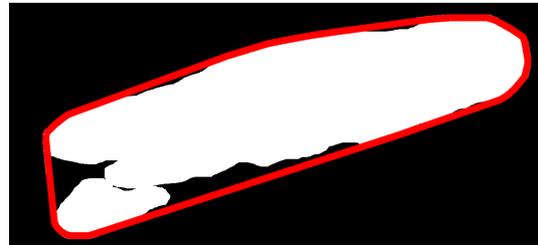
(b) Ellisse.



(c) Asse maggiore



(d) Asse minore



(e) Involuppo convesso della ghiandola.

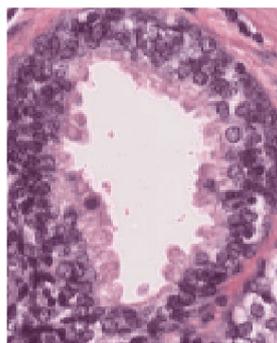
Figure 4: Estrazione delle features morfologiche.

3.3.2 Features cromatiche

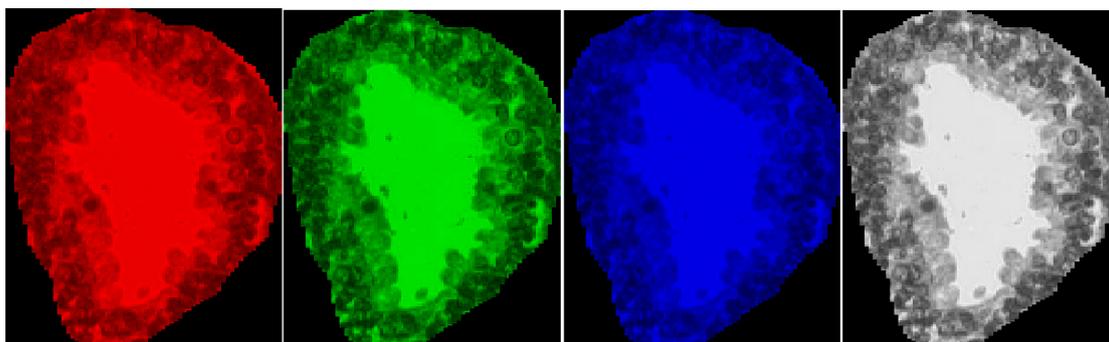
I descrittori cromatici rappresentano 5 indici statistici calcolati sul valore di intensità nei 3 layer Red, Green, Blu e per l'immagine in scala di grigi dei pixel presenti all'interno dell'intera ghiandola (Figura 5b) e dei soli nuclei (Figura 5b), quindi 45 features in totale. Questi valori sono stati calcolati poiché, come spiegato nei capitoli precedenti, nelle ghiandole tumorali si ha in molti casi un'infiltrazione di tessuto epiteliale che è possibile riscontrare osservando le variazioni delle intensità dei pixel nei diversi layer sia della ghiandola che dei nuclei che si trovano all'interno, nello specifico si ha un aumento della variabilità delle intensità all'interno della ghiandola, inoltre nelle ghiandole sane i nuclei hanno un colore uniforme, mentre nelle tumorali i nuclei presentano una variazione nella tonalità del colore ed in alcuni casi un colore più scuro.

Gli indici statistici che sono stati calcolati sono:

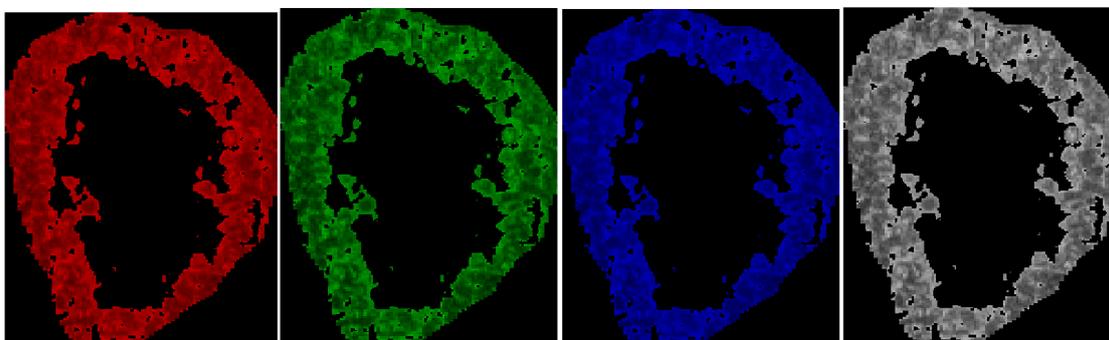
- Media $\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n}$
- Varianza $\sigma^2 = \frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2}{n}$
- Skewness $s = \frac{E(x_k - \bar{x})^3}{\sigma^3}$
- Kurtosis $k = \frac{E(x_k - \bar{x})^4}{\sigma^4}$
- Entropia $e = \sum_{k=1}^n (p_k \log_2 p_k)$ dove p rappresenta l'istogramma normalizzato.



(a) Ghiandola



(b) Da destra a sinistra i layer Red, Green, Blue e l'immagine in Grayscale della ghiandola



(c) Da destra a sinistra i layer Red, Green, Blue e l'immagine in Grayscale dei nuclei

Figure 5: Passaggi per il calcolo delle features cromatiche

3.3.3 Features strutturali

I descrittori strutturali sono 45 in totale e sono stati calcolati con l'obiettivo di analizzare la distribuzione spaziale di nuclei, lume e residuo all'interno della ghiandola. Nel caso in cui il tessuto sia canceroso accade infatti che le ghiandole si fondano tra di loro, quindi si avranno diversi lumi, tutti con area simile e ridotta, dislocati in maniera casuale all'interno di quella che viene individuata come una ghiandola ma in realtà è un agglomerato di ghiandole con contorni mal definiti, mentre nel caso in cui il tessuto sia sano le ghiandole presenteranno un numero ridotto di lumi (teoricamente uno solo, ma è possibile che ghiandole vicine vengano unite durante la fase di gland detection) che nella maggior parte dei casi saranno centrati relativamente vicino al centroide della ghiandola, sarà inoltre meno probabile avere delle distanze tra lumi e centroide o bordi della ghiandola con valori molto diversi tra loro. Inoltre nelle ghiandole sane è possibile osservare come i nuclei siano posizionati molto vicino ai bordi, mentre nelle tumorali, a causa della forte riduzione della superficie del lume, i nuclei sono posizionati più lontano dai bordi e, all'aumentare della malignità del tumore, in maniera casuale all'interno della ghiandola.

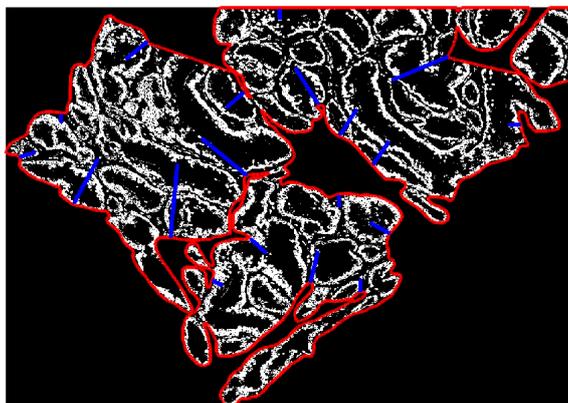
Per analizzare queste caratteristiche è stata calcolata, per ogni componente connessa di lume, nuclei e residuo la percentuale di area rispetto all'area della ghiandola, la distanza dal centroide di queste componenti al punto del bordo della ghiandola più vicino e la distanza dal centroide di queste componenti al centroide della ghiandola. Per avere inoltre una misura della variazione di queste distanze vengono calcolati alcuni indicatori statistici. In sintesi si ha:

1. **'DNGB'** e **'DNGC'**. Rappresentano rispettivamente la distanza del centroide di ogni nucleo rispetto al punto del bordo della ghiandola più vicino (Figura 6) ed al centroide della ghiandola (Figura 7).
2. **'DRGB'** e **'DRGC'**. Rappresentano rispettivamente la distanza del centroide di ogni componente connessa del residuo rispetto al punto del bordo della ghiandola più vicino (Figura 8) ed al centroide della ghiandola (Figura 9).
3. **'DLGB'** e **'DLGC'**. Rappresentano rispettivamente la distanza del centroide

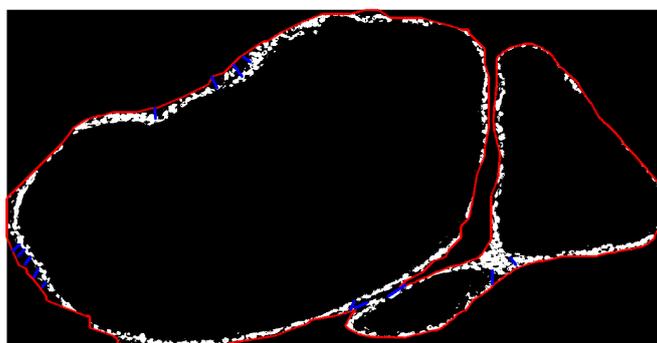
di ogni lume rispetto al punto del bordo della ghiandola più vicino (Figura 10) ed al centroide della ghiandola (Figura 11).

Ognuno di questi è un vettore con numero di elementi pari al numero di componenti connesse della componente della ghiandola che si sta analizzando (nuclei, lume o residuo). Per ognuno di questi vettori vengono calcolati degli indici statistici che sono nell'ordine:

- 'Media' $\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k}{n}$
- 'Media Pesata'. Media pesata sulla metà del diametro equivalente (r) della ghiandola analizzata. $\bar{x}_{pes} = \frac{\sum_{k=1}^n \frac{x_k}{r}}{n}$
- 'Varianza' $\sigma^2 = \frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2}{n}$
- 'Skewness' $s = \frac{E(x_k - \bar{x})^3}{\sigma^3}$
- 'Kurtosis' $k = \frac{E(x_k - \bar{x})^4}{\sigma^4}$
- 'Entropia' $e = \sum_{k=1}^n (p_k \log_2 p_k)$ dove p rappresenta l'istogramma delle distanze normalizzato.
- 'Coefficiente di dispersione'. Calcolato come il rapporto tra varianza e media.
 $CoeffDisp = \frac{\sigma^2}{\bar{x}}$

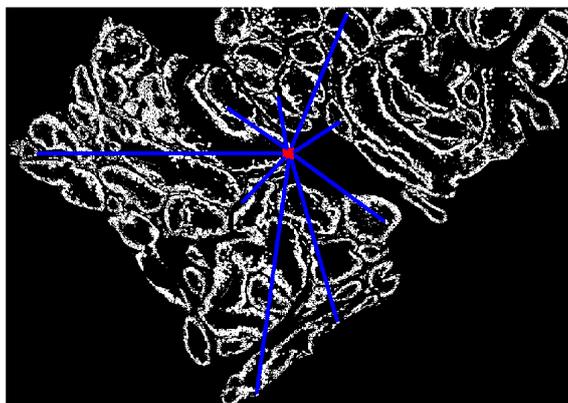


(a) Ghiandole tumorali.

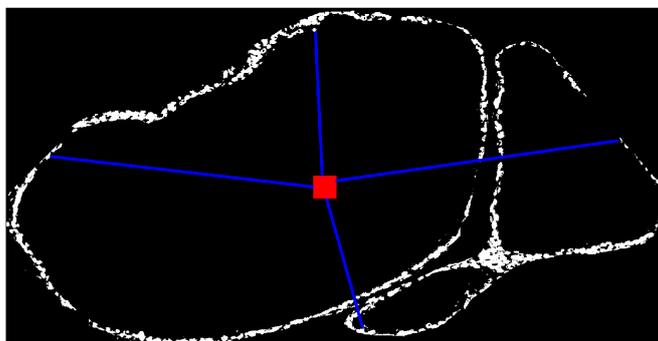


(b) Ghiandole sane.

Figure 6: Bianco: nuclei delle ghiandole. Rosso: bordi delle ghiandole. Blu: distanza tra nuclei e bordo.

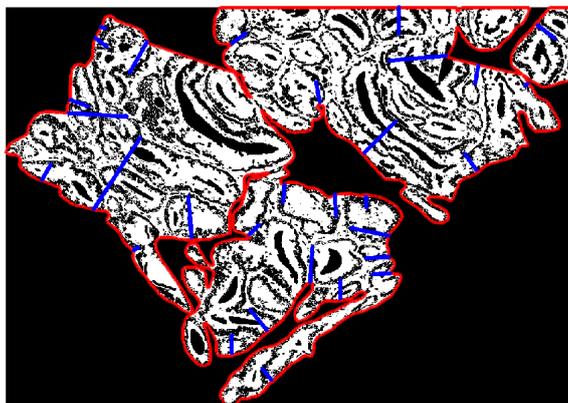


(a) Ghiandole tumorali.

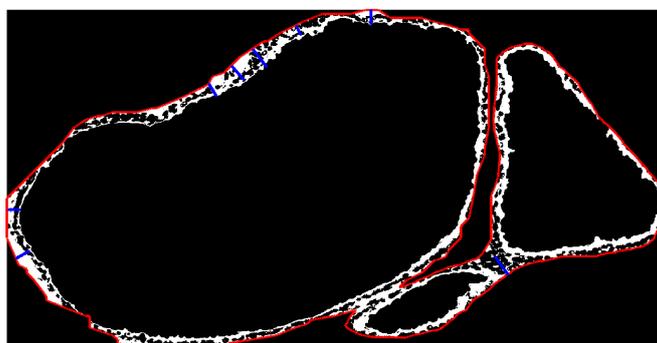


(b) Ghiandole sane.

Figure 7: Bianco: nuclei delle ghiandole. Rosso: centroide delle ghiandole. Blu: distanza tra nuclei e centroide.

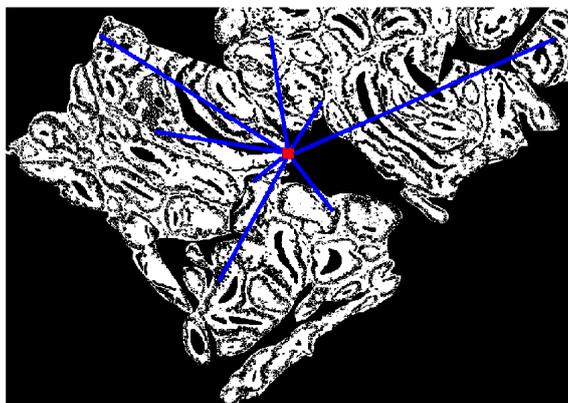


(a) Ghiandole tumorali.

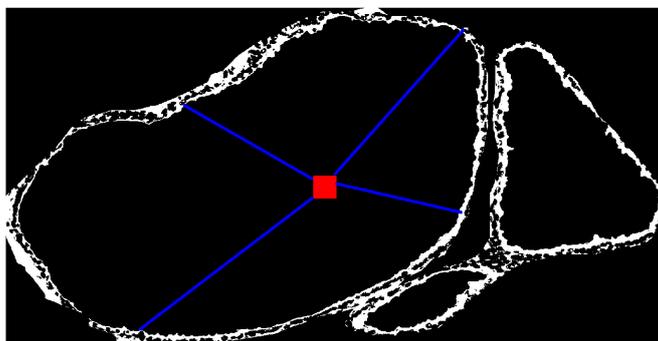


(b) Ghiandole sane.

Figure 8: Bianco: residuo delle ghiandole. Rosso: bordi delle ghiandole. Blu: distanza tra residui e bordo.

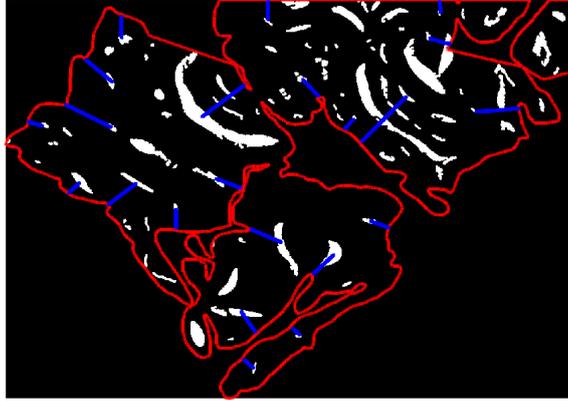


(a) Ghiandole tumorali.

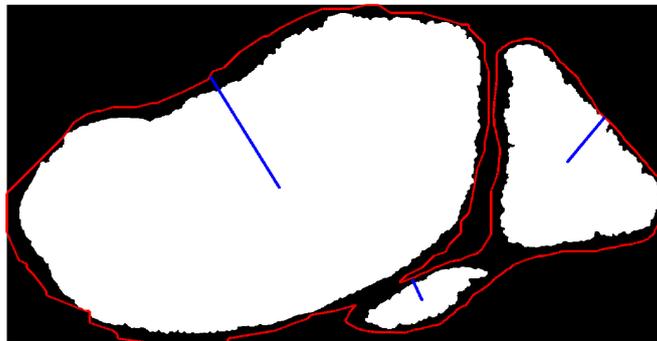


(b) Ghiandole sane.

Figure 9: Bianco: residuo delle ghiandole. Rosso: centroide delle ghiandole. Blu: distanza tra residui e centroide.

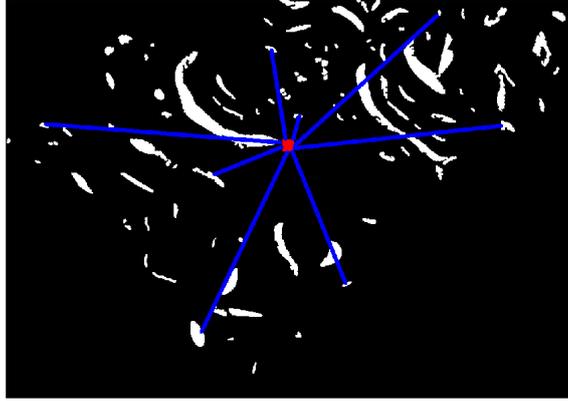


(a) Ghiandole tumorali.

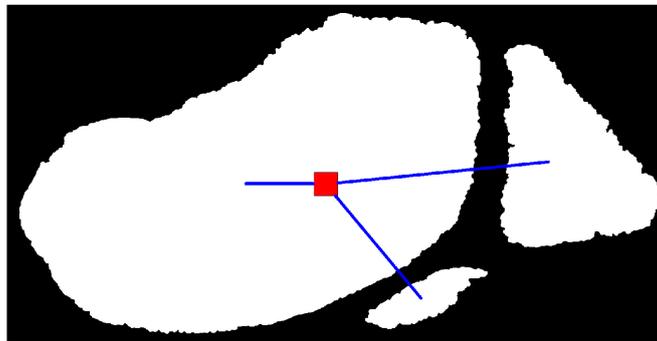


(b) Ghiandole sane.

Figure 10: Bianco: lumi delle ghiandole. Rosso: bordi delle ghiandole. Blu: distanza tra lumi e bordo.



(a) Ghiandole tumorali.



(b) Ghiandole sane.

Figure 11: Bianco: lumi delle ghiandole. Rosso: centroide delle ghiandole. Blu: distanza tra lumi e centroide.

3.3.4 Features di tessitura

Le features di tessitura sono informazioni di tessitura del secondo ordine e in questo caso sono state estratte tramite il calcolo della Gray level co-occurrence matrix (GLCM). La GLCM è una matrice che viene calcolata a partire da un singolo layer dell'immagine della ghiandola e caratterizza la distribuzione spaziale dei livelli di grigio all'interno della ghiandola stessa. La GLCM è una matrice quadrata di dimensione pari al numero di livelli di grigio, in questo caso 256, e nello specifico un elemento della GLCM $P_{d,h}(i, j)$ rappresenta la probabilità di avere una coppia di livelli di grigio (i, j) separati da una distanza d nella direzione h . Per ogni coppia di valori d e h viene calcolata una GLCM, in questo caso sono state calcolate 4 diverse GLCM corrispondenti a 4 diverse direzioni ($h = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$) e ad una distanza ($d = 1$ pixel), da ogni GLCM vengono estratte 4 proprietà statistiche, le proprietà ottenute per i diversi valori di h vengono mediate. Le proprietà statistiche che vengono calcolate sono:

- 'Contrast' : restituisce una misura dell'intensità del contrasto tra un pixel p ed i pixel nel suo intorno. Il contrasto è nullo per immagini costanti.

$$\sum_{i,j} |i - j|^2 P(i, j)$$

- 'Correlation' : restituisce una misura della correlazione tra un pixel ed i pixel nel suo intorno. La correlazione può assumere valori tra -1 e 1, assume valore 1 in caso di perfetta correlazione diretta e valore -1 in caso di perfetta correlazione inversa.

$$\sum_{i,j} \frac{(i - \mu_i)(j - \mu_j)P(i, j)}{\sigma_i \sigma_j}$$

- 'Energy' : rappresenta la somma del quadrato di tutti gli elementi della GLCM.

$$\sum_{i,j} P(i, j)^2$$

- 'Homogeneity' : restituisce un valore che misura la vicinanza della distribuzione degli elementi nella GLCM alla diagonale della GLCM. Assume valori tra 0 ed 1, assume valore 1 nel caso in cui gli elementi della diagonale della GLCM siano 1.

$$\sum_{i,j} \frac{P(i,j)}{1 + |i - j|}$$

3.4 Gland Selection

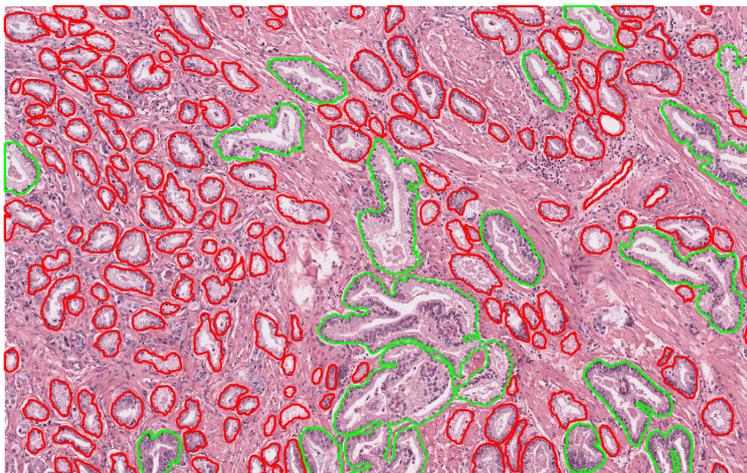
L'analisi di un dataset molto ampio è svantaggiosa per diversi motivi. Tanto maggiore sarà il numero di ghiandole da analizzare tanto più elevati saranno i tempi computazionali. Inoltre se è presente un numero elevato di ghiandole simili tra loro aumenta il rischio che il classificatore sia polarizzato e non sia in grado di fornire performance ottimali nella classificazione delle regioni ghiandolari segmentate automaticamente. Per queste ragioni sono stati fatti dei tentativi di riduzione del dataset escludendo alcune ghiandole secondo due semplici criteri:

- **Dimensioni della ghiandola.** E' stata applicata una soglia all'area delle ghiandole (30000 pixel) escludendo le ghiandole con dimensioni ridotte. Questo è stato fatto perché all'interno del dataset composto dalle ghiandole segmentate manualmente sono presenti molte ghiandole con area ridotta che spesso risultano essere molto simili tra loro (Figura 12a) oppure poco rilevanti rispetto alle altre (Figura 12b), inoltre nella maggior parte dei casi le zone ridotte individuate come ghiandole dall'algoritmo di segmentazione automatico non sono vere e proprie ghiandole ma stroma misto a nuclei (Figura 13). Le ghiandole escluse in base a questo criterio vengono successivamente classificate tramite il post-processing che assegna loro una classe basata sulla classificazione delle ghiandole vicine.
- **Dimensione del lume.** E' stata applicata una soglia sul rapporto tra area del lume e area della ghiandola. E' stato infatti osservato che all'interno del dataset composto dalle ghiandole segmentate manualmente il 99.7% delle ghiandole che hanno un lume con un'area maggiore o uguale al 0.8% della ghiandola risultano essere sane (Figura 14). Le ghiandole escluse vengono

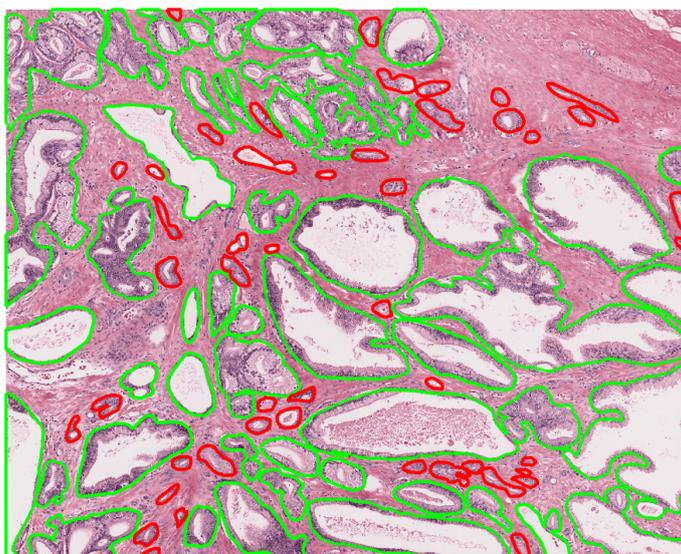
quindi classificate automaticamente come sane.

Sono stati quindi ricavati 3 diversi dataset:

1. Dataset1: comprende tutte le ghiandole
2. Dataset2: vengono escluse le ghiandole in base al criterio sulle dimensioni della ghiandola.
3. Dataset3: vengono escluse le ghiandole in base ai due criteri riguardanti le dimensioni della ghiandola e le dimensioni del lume.



(a)



(b)

Figure 12: Ghiandole segmentate manualmente. Sono evidenziate in rosso le ghiandole con un'area inferiore alla soglia, sono evidenziate in verde le ghiandole che vengono analizzate dalla rete.

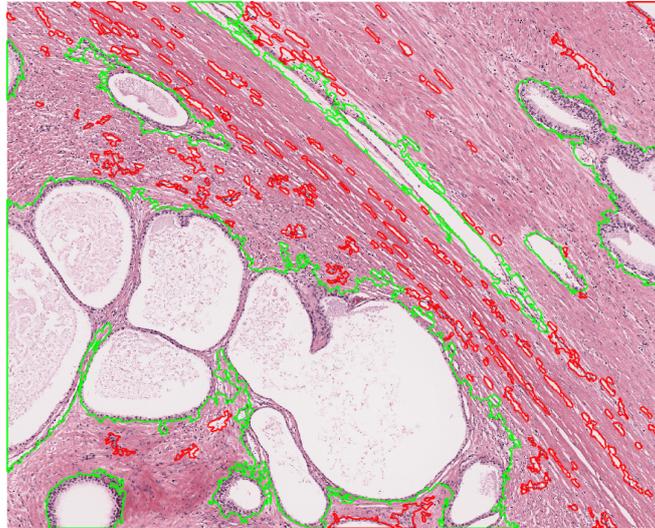


Figure 13: Ghiandole segmentate automaticamente. Sono evidenziate in rosso le ghiandole con un'area inferiore alla soglia, sono evidenziate in verde le ghiandole che vengono analizzate dalla rete.

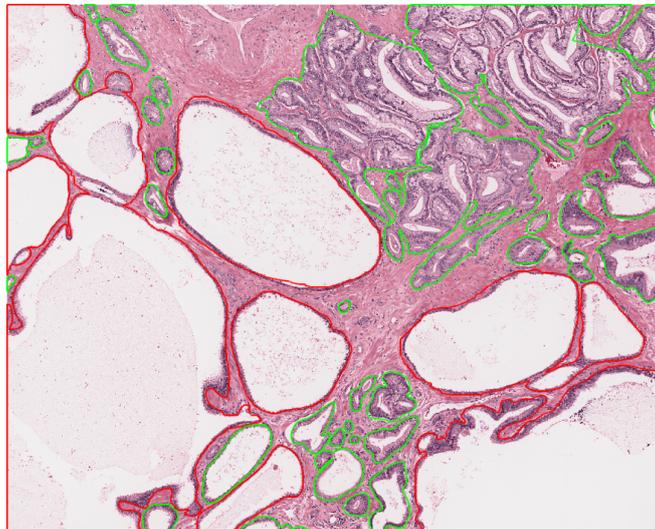


Figure 14: Ghiandole segmentate manualmente. Sono evidenziate in rosso le ghiandole con una percentuale di lume superiore alla soglia, sono evidenziate in verde le ghiandole che vengono analizzate dalla rete.

3.5 Features Selection

La selezione delle features rilevanti è basata su un modello a regressione lineare, ed è stata eseguita utilizzando il package "stepwiselm" su Matlab. Questo è un metodo iterativo che consente di aggiungere e rimuovere features da un modello lineare in base alla rilevanza statistica di ogni features. Inizialmente si parte da un modello che contiene solo un termine costante e ad ogni step viene valutato il p-Value di un F-test per testare il modello con e senza il potenziale termine da aggiungere.

La stepwise regression consiste nei seguenti 3 step:

1. Creazione del modello iniziale.
2. Vengono esaminati i descrittori che non sono nel modello. Se uno di questi termini ha p-Value inferiore rispetto alla soglia, che in questo caso è stata scelta pari a 0.0001, viene aggiunto al modello il termine con p-Value minore. Altrimenti si passa allo step successivo.
3. Vengono esaminati i descrittori che sono nel modello. Se uno di questi termini ha p-Value maggiore rispetto alla soglia, che in questo caso è stata scelta pari a 0.0005, viene rimosso dal modello il termine con p-Value maggiore e si ripete lo step 2, altrimenti finisce il procedimento.

L'algoritmo di features selection è stato applicato ai 3 dataset elencati al punto precedente. Ottenendo i seguenti risultati.

Utilizzando il **Dataset 1** è stato selezionato il subset che comprende 29 features rappresentato nelle Tabelle 1, 2, 3 e 4.

Area	
Convex area	
Filled area	
Eccentricity	
Equiv. Diameter	
Major axis length	V
Minor axis length	
Solidity	V

Table 1: Features Morfologiche.

	G. Red	G. Green	G. Blu	G. Grey	N. Red	N. Green	N. Blu	N. Grey
Media		V	V	V				
Varianza	V	V		V		V		V
Skewness					V		V	
Kurtosis	V	V			V		V	
Entropia	V							

Table 2: Features Cromatiche. G: ghiandola, N: nuclei.

	D.N.G.B.	D.R.G.B.	D.L.G.B.	D.N.G.C.	D.R.G.C.	D.L.G.C.
Media			V	V		
Media pesata						
Varianza					V	
Skewness					V	
Kurtosis						
Entropia	V				V	V
Coeff. di dispersione						

Area Nuclei	V
Area Lume	V
Area Residuo	

Table 3: Features Strutturali.

	Red	Green	Blu	Grey
Contrast				
Correlation	V	V		V
Energy				
Homogeneity				

Table 4: Features di Tessitura.

Utilizzando il **Dataset 2** è stato selezionato il subset contenente 23 features rappresentato nelle Tabelle 5, 6, 7 e 8.

Area	
Convex area	
Filled area	
Eccentricity	
Equiv. Diameter	
Major axis length	V
Minor axis length	
Solidity	V

Table 5: Features Morfologiche.

	G. Red	G. Green	G. Blu	G. Grey	N. Red	N. Green	N. Blu	N. Grey
Media			V	V				
Varianza	V		V					
Skewness							V	V
Kurtosis		V				V	V	V
Entropia	V				V			V

Table 6: Features Cromatiche. G: ghiandola, N: nuclei.

	D.N.G.B.	D.R.G.B.	D.L.G.B.	D.N.G.C.	D.R.G.C.	D.L.G.C.
Media						
Media pesata	V					
Varianza						
Skewness						
Kurtosis						
Entropia						V
Coeff. di dispersione						

Area Nuclei	V
Area Lume	V
Area Residuo	

Table 7: Features Strutturali.

	Red	Green	Blu	Grey
Contrast				
Correlation	V	V	V	V
Energy				
Homogeneity				

Table 8: Features di Tessitura.

Utilizzando il **Dataset 3** è stato selezionato il subset contenente 31 features rappresentato nelle Tabelle 9, 10, 11 e 12.

Area	
Convex area	
Filled area	
Eccentricity	
Equiv. Diameter	
Major axis length	
Minor axis length	V
Solidity	V

Table 9: Features Morfologiche.

	G. Red	G. Green	G. Blu	G. Grey	N. Red	N. Green	N. Blu	N. Grey
Media							V	
Varianza	V		V		V	V		V
Skewness	V	V	V	V	V		V	
Kurtosis	V							
Entropia						V	V	

Table 10: Features Cromatiche. G: ghiandola, N: nuclei.

	D.N.G.B.	D.R.G.B.	D.L.G.B.	D.N.G.C.	D.R.G.C.	D.L.G.C.
Media				V		
Media pesata	V			V		
Varianza						
Skewness						
Kurtosis	V					
Entropia						V
Coeff. di dispersione						

Area Nuclei	V
Area Lume	V
Area Residuo	

Table 11: Features Strutturali.

	Red	Green	Blu	Grey
Contrast	V		V	V
Correlation	V	V	V	V
Energy				
Homogeneity				

Table 12: Features di Tessitura.

3.6 Training e Testing delle reti neurali

Le informazioni contenute nei 3 dataset e la classificazione effettuata manualmente dall'anatomopatologo sono state utilizzate per il training di tre reti neurali feed forward. Per l'ottimizzazione dei parametri e della struttura delle reti sono state allenate iterativamente 2000 reti neurali diverse per ogni dataset, queste reti sono state ottenute variando in maniera casuale, all'interno di un range predefinito, il valore dei seguenti parametri: learning rate, numero di layer e numero di hidden units, e scegliendo casualmente la activation function di ogni unità; per ogni rete neurale ottenuta vengono analizzate tutte le combinazioni di training function ('trainlm', 'trainrp', 'trainbfg', 'trainscg', 'traincgb', 'traincgf', 'traincgp', 'trainoss', 'traingdx') e di performance function ('MSE', 'MAE', 'SSE', 'SAE') e viene scelta la combinazione che fornisce i risultati migliori. Tra le 2000 reti neurali viene scelta la rete migliore in base alla percentuale di corretti classificati e alla differenza tra l'errore percentuale sul training set e sul deviation set. Quindi dal Dataset 1 è stata ottenuta rete Net 1, dal Dataset 2 è stata ottenuta rete Net 2 e dal Dataset 3 è stata ottenuta rete Net 3.

Le tre reti neurali ottenute sono state testate sulle stesse immagini a cui è stato applicato un algoritmo automatico per la segmentazione delle ghiandole. Dopo aver segmentato automaticamente le ghiandole sono stati calcolati tutti i descrittori. Successivamente sono stati applicati i due criteri utilizzati in precedenza per la creazione dei due subset a partire dal dataset completo. Una volta ricavati i 3 dataset sono stati scelti, per ogni dataset, le features rilevanti ricavate tramite le features selection effettuate in precedenza e sono stati analizzati i risultati delle tre reti.

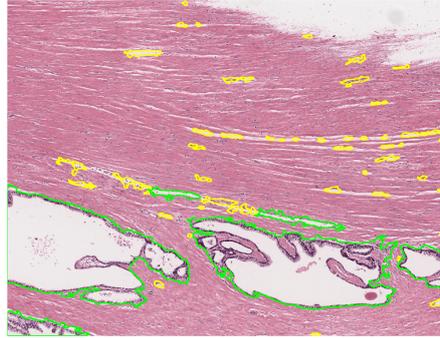
3.7 PostProcessing

Il post-processing è il passaggio successivo alla classificazione delle ghiandole tramite la rete neurale che ha l'obiettivo di fornire una classe alle regioni ghiandolari con area esigua che non vengono fornite in input alla rete neurale e di correggere la classificazione di alcune ghiandole sulla base della classe assegnata alle ghiandole

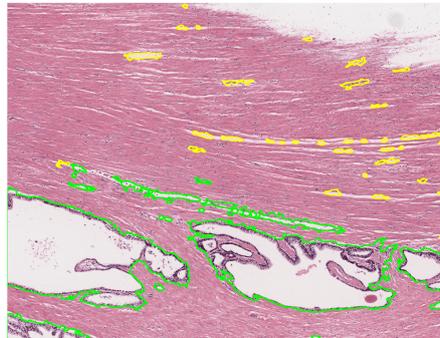
presenti nell'intorno della ghiandola analizzata. Nello specifico da ogni immagine vengono estratte delle ROI dalle dimensioni di 400x400 pixel, vengono osservate le classi delle ghiandole presenti nella ROI e vengono effettuati dei test:

1. Nel caso in cui la maggioranza delle ghiandole sia stata classificata come tumorale oppure la somma dell'area delle ghiandole classificate come tumorali sia almeno 10 volte la somma dell'area delle ghiandole classificate come sane allora tutte le ghiandole presenti all'interno della ROI verranno classificate come tumorali (Figura 16b),
2. Nel caso in cui l'area delle ghiandole classificate come sane sia almeno 10 volte l'area delle ghiandole classificate come tumorali allora tutte le ghiandole presenti all'interno della ROI verranno classificate come sane (Figura 15b),
3. Nel caso in cui all'interno dell'immagine tutte le ghiandole presenti siano state classificate con la stessa classe, sane o tumorali, tutte le ghiandole non classificate dalla rete perché troppo piccole vengono classificate con la stessa classe delle altre ghiandole (Figure 16c e Figura 15c).
4. Se non è verificata nessuna delle condizioni elencate in precedenza le ghiandole mantengono la classe assegnata dalla rete neurale.

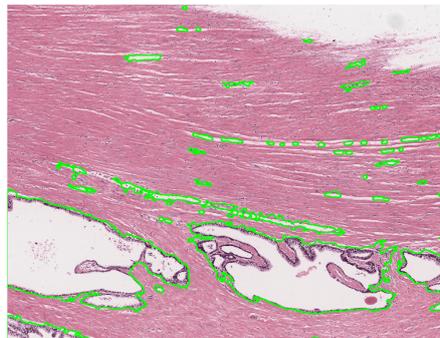
Questo viene fatto per due ragioni, la prima è rappresentata dalla necessità di assegnare una classe alle ghiandole di dimensioni ridotte che non vengono analizzate dalla rete, questo perché queste regioni ghiandolari potrebbero essere tumorali e classificando queste ghiandole è possibile diminuire il numero di falsi negativi nella classificazione delle immagini, inoltre capita spesso che vengano identificate piccole zone tumorali in immagini che contengono solamente tessuto sano e può essere d'aiuto ai fini dell'analisi eliminare questi falsi positivi.



(a)

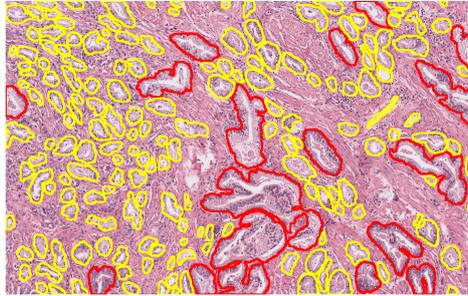


(b)

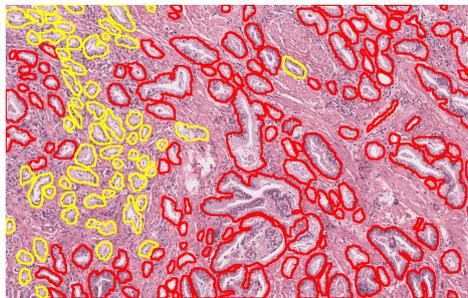


(c)

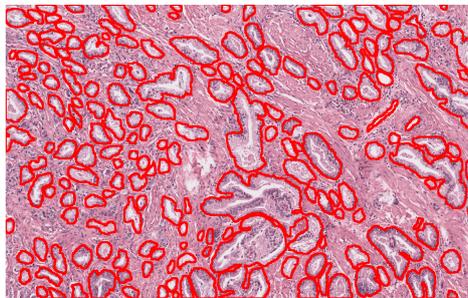
Figure 15: Rappresentazione dei passaggi del post-processing su ghiandole sane segmentate automaticamente



(a)



(b)



(c)

Figure 16: Rappresentazione dei passaggi di post-processing su ghiandole tumorali segmentate manualmente

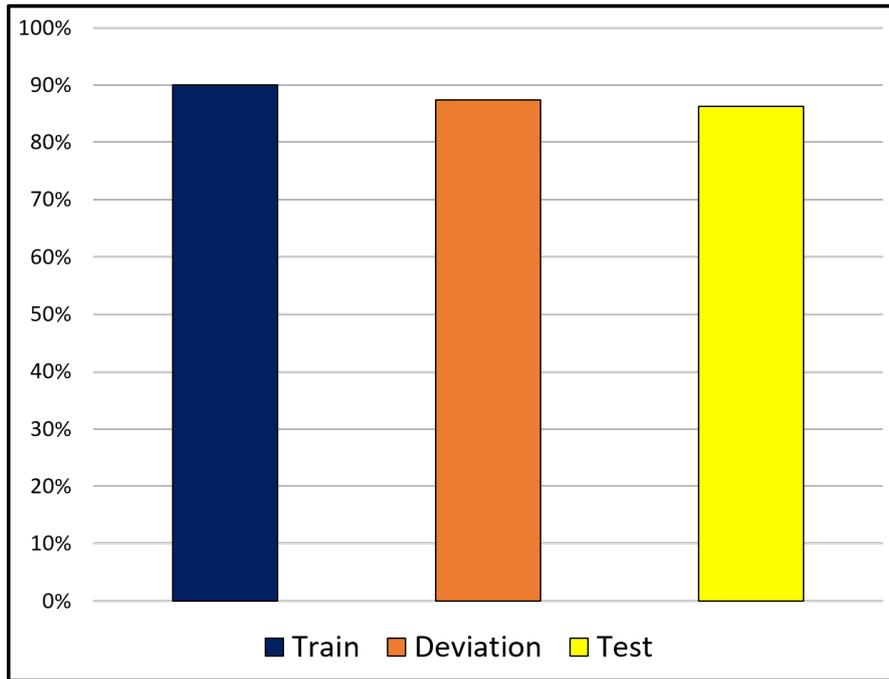
4 Risultati

Le performance delle reti neurali sono state valutate inizialmente tramite le percentuali di corretti classificati su training set (70%), deviation set (15%) e test set (15%). Inoltre per ogni rete neurale sono stati forniti in input sia il Dataset delle ghiandole segmentate manualmente sia il Dataset ricavato dalle regioni ghiandolari segmentate automaticamente e sono state confrontate le prestazioni sulla classificazione dei pixel e sulla classificazione di ogni immagine (considerando positiva un'immagine con almeno il 10% dell'area classificata come tumorale) tramite la misura di 5 indici statistici: accuratezza (A), sensibilità (Se), specificità (Sp), precision (P) e Jaccard (J).

4.1 Dataset 1

Manuali

Il Dataset completo di features ricavato dalle ghiandole segmentate manualmente comprende 15879 campioni, di cui 11696 tumorali e 4183 sani. Il set è stato equilibrato in modo da avere lo stesso numero di campioni sani e tumorali ed è stato utilizzato per il training di una rete neurale. Le percentuali di corretti classificati su training set, deviation set e test set sono riportate in Figura 17. Il dataset completo è stato fornito in input alla rete neurale che ha prodotto i risultati presenti nella tabella 13a. Nella tabella 13b è presentata la confusion matrix della classificazione delle immagini.



Train	Deviation	Test
90.01 %	87.35 %	86.21 %

Figure 17

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	92.96%	85.72%	96.62%	92.78%	80.36%
Images	88.40%	88.89%	87.74%	90.78%	81.53%

(a)

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	128	13
	Normal	16	93

(b)

Table 13

Automatiche

Il Dataset completo calcolato a partire dalle regioni ghiandolari segmentate dall' algoritmo automatico comprende 23238 campioni, di cui 1928 tumorali e 21310 sani. Questo subset è stato fornito in input alla rete neurale che ha prodotto i risultati presenti nella tabella 14a. Nella tabella 14b è presentata la confusion matrix della classificazione delle immagini.

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	85.07%	87.00%	83.28%	82.78%	73.67%
Images	75.60%	96.53%	47.17%	71.28%	69.50%

(a)

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	139	56
	Normal	5	50

(b)

Table 14

4.2 Dataset 2

Manuali

Il Subset ottenuto rimuovendo le ghiandole con area ridotta dal Dataset completo comprende 4849 campioni, di cui 2368 tumorali e 2481 sani (vengono rimosse 11030 ghiandole). Il set è stato equilibrato in modo da avere lo stesso numero di campioni sani e tumorali ed è stato utilizzato per il training di una rete neurale. Le percentuali di corretti classificati su training set, deviation set e test set sono riportate in Figura 18. Il subset completo è stato fornito in input alla rete neurale che ha prodotto i risultati presenti nella tabella 15a. Nella tabella 16a è presentata la confusion matrix della classificazione delle immagini. Nelle tabelle 15b e 16b sono mostrati i risultati dopo l'applicazione dell'algoritmo di post-processing.

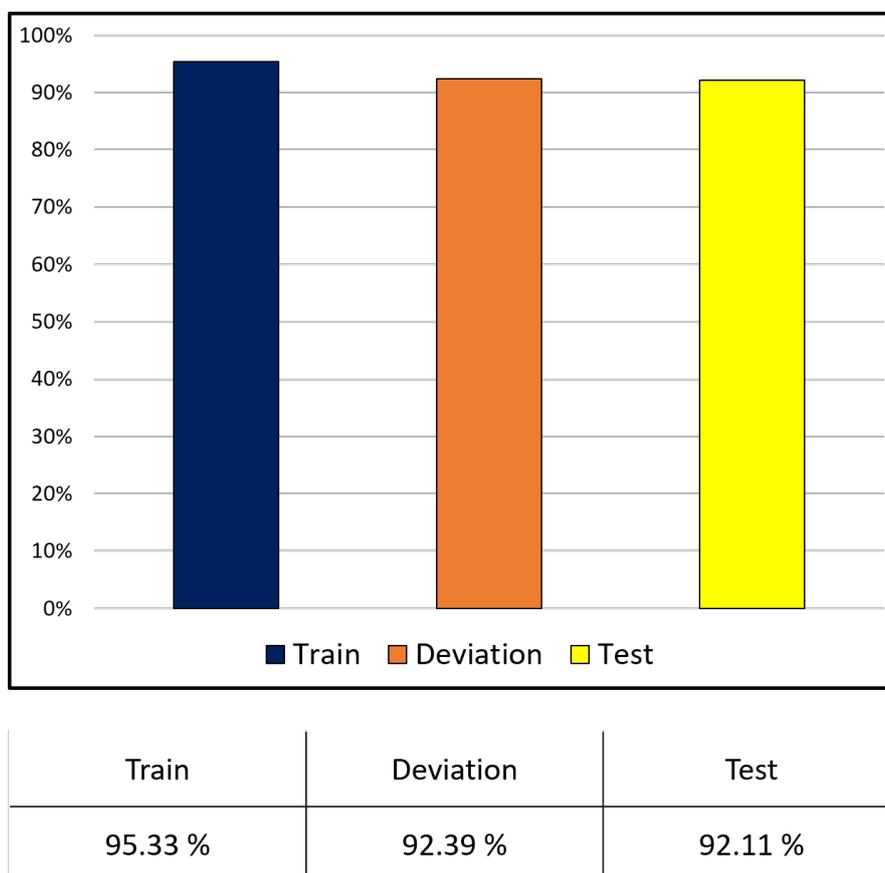


Figure 18

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	95.85%	93.51%	96.80%	92.26%	86.70%
Images	88.40%	88.89%	87.74%	90.78%	81.53%

(a) Performance Net 2.

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	95.31%	93.00%	96.45%	92.80%	80.73%
Images	90.40%	93.06%	86.79%	90.54%	84.81%

(b) Performance Net 2 dopo il post-processing.

Table 15

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	128	13
	Normal	16	93

(a) Performance Net 2.

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	134	14
	Normal	10	92

(b) Performance Net 2 dopo il post-processing.

Table 16

Automatiche

Il Subset calcolato a partire dalle regioni ghiandolari segmentate dall'algoritmo automatico comprende 2704 campioni, di cui 724 tumorali e 1980 sani (vengono rimosse 20534 ghiandole). Questo subset è stato fornito in input alla rete neurale che ha prodotto i risultati presenti nella tabella 17a. Nella tabella 18a è presentata la confusion matrix della classificazione delle immagini. Nelle tabelle 17b e 18b sono mostrati i risultati dopo l'applicazione dell'algoritmo di post-processing.

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	88.94%	88.37%	89.49%	89.12%	79.76%
Images	84.40%	94.44%	70.75%	81.44%	77.71%

(a) Performance Net 2.

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	87.67%	88.28%	87.10%	86.31%	77.44%
Images	84.80%	95.83%	69.81%	81.18%	78.41%

(b) Performance Net 2 dopo il post-processing.

Table 17

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	136	31
	Normal	8	75

(a) Performance Net 2.

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	138	32
	Normal	6	74

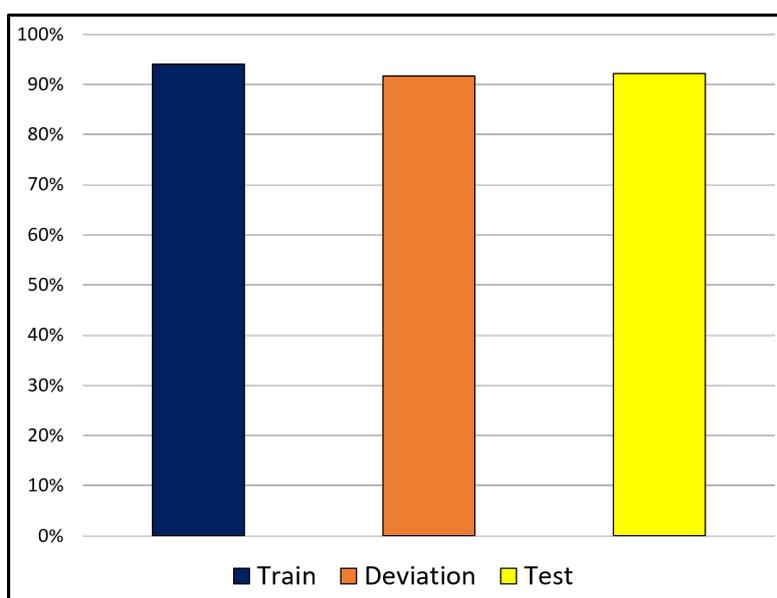
(b) Performance Net 2 dopo il post-processing.

Table 18

4.3 Dataset 3

Manuali

Il Subset ottenuto rimuovendo le ghiandole con area ridotta e le ghiandole con elevata percentuale di lume dal Dataset completo comprende 4525 campioni, di cui 2367 tumorali e 2158 sani (vengono rimosse 11354 ghiandole). Il set è stato equilibrato in modo da avere lo stesso numero di campioni sani e tumorali ed è stato utilizzato per il training di una rete neurale. Le percentuali di corretti classificati su training set, deviation set e test set sono riportate in Figura 19. Il subset completo è stato fornito in input alla rete neurale che ha prodotto i risultati presenti nella tabella 19a. Nella tabella 20a è presentata la confusion matrix della classificazione delle immagini. Nelle tabelle 19b e 20b sono mostrati i risultati dopo l'applicazione dell'algoritmo di post-processing.



Train	Deviation	Test
94.00%	91.67%	92.13%

Figure 19

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	95.47%	96.52%	95.05%	88.83%	86.07%
Images	84.40%	88.89%	78.30%	84.77%	76.65%

(a) Performance Net 3.

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	94.96%	95.59%	94.65%	89.78%	86.21%
Images	86.80%	93.06%	78.30%	85.35%	80.24%

(b) Performance Net 3 dopo il post-processing.

Table 19

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	128	23
	Normal	16	83

(a) Performance Net 3.

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	134	23
	Normal	10	83

(b) Performance Net 3 dopo il post-processing.

Table 20

Automatiche

Il Subset calcolato a partire dalle regioni ghiandolari segmentate dall'algoritmo automatico comprende 2586 campioni, di cui 723 tumorali e 1863 sani (vengono rimosse 20652 ghiandole). Questo subset è stato fornito in input alla rete neurale che ha prodotto i risultati presenti nella tabella 21a. Nella tabella 22a è presentata la confusion matrix della classificazione delle immagini. Nelle tabelle 21b e 22b sono mostrati i risultati dopo l'applicazione dell'algoritmo di post-processing.

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	71.00%	67.31%	94.07%	88.60%	64.59%
Images	79.20%	88.89%	66.04%	78.05%	71.11%

(a) Performance Net 3.

	A	Se	Sp	P	J
Pixel	70.75%	67.41%	92.27%	84.97%	63.74%
Images	77.20%	89.58%	60.38%	75.44%	69.35%

(b) Performance Net 3 dopo il post-processing.

Table 21

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	128	36
	Normal	16	70

(a) Performance Net 3.

		Actual	
		Tumoral	Normal
Predicted	Tumoral	129	42
	Normal	15	64

(b) Performance Net 3 dopo il post-processing.

Table 22

5 Discussione e conclusioni

Nel capitolo precedente sono stati illustrati i risultati ottenuti utilizzando le 3 reti neurali per classificare i 3 Dataset contenenti singole ghiandole segmentate manualmente ed i 3 Dataset contenenti regioni ghiandolari segmentate automaticamente. Per quanto riguarda le ghiandole segmentate manualmente se si prendono in esame i pixel correttamente classificati (Figura 20) si hanno sempre valori superiori al 90%, pari a 92.96% per il Dataset 1, 95.31% per il Dataset 2 e 94.96% per il Dataset 3. Osservando la classificazione delle immagini (Figura 21) si evidenzia un netto aumento della sensibilità nella Net2 rispetto alla Net1, risultano quindi evidenti i benefici ottenuti dall'eliminazione delle ghiandole con area troppo piccola dal dataset completo, nello specifico si osserva che i falsi negativi passano da 16 per il Dataset 1 a 10 per il Dataset 2, per quanto riguarda i falsi positivi invece si ha un leggero peggioramento delle performance, dato che passano da 13 per il Dataset 1 a 14 per il Dataset 2. Rimuovendo le ghiandole con una percentuale elevata di lume si osserva un leggero miglioramento della sensibilità ed un leggero peggioramento nella specificità nella classificazione dei pixel; nella classificazione delle immagini queste variazioni non hanno prodotto nessun effetto per quanto riguarda i falsi negativi, che sono 10 sia per il Dataset 2 che per il Dataset 3, mentre causano un netto peggioramento nelle performance di classificazione delle immagini contenenti tessuto prostatico sano, dato che i falsi positivi passano da 14 per il Dataset 2 a 23 per il Dataset 3, facendo notevolmente diminuire la specificità. I peggioramenti nelle performance del classificatore sulle ghiandole segmentate manualmente sono una naturale conseguenza della riduzione del dataset, e sono accettabili in quanto sono state eseguite con l'obiettivo di migliorare le performance nella classificazione delle regioni ghiandolari segmentate automaticamente.

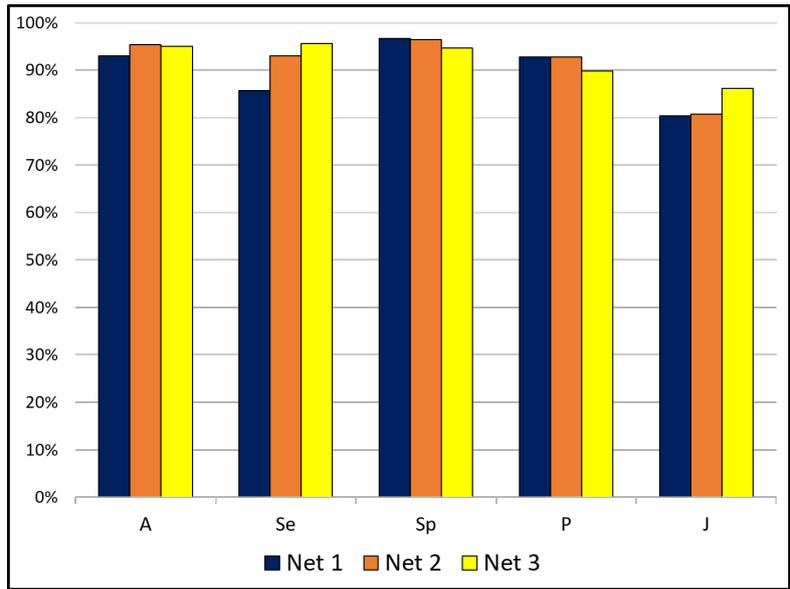


Figure 20: Risultati per le 3 reti neurale sulla classificazione dei pixel nelle immagini segmentate manualmente.

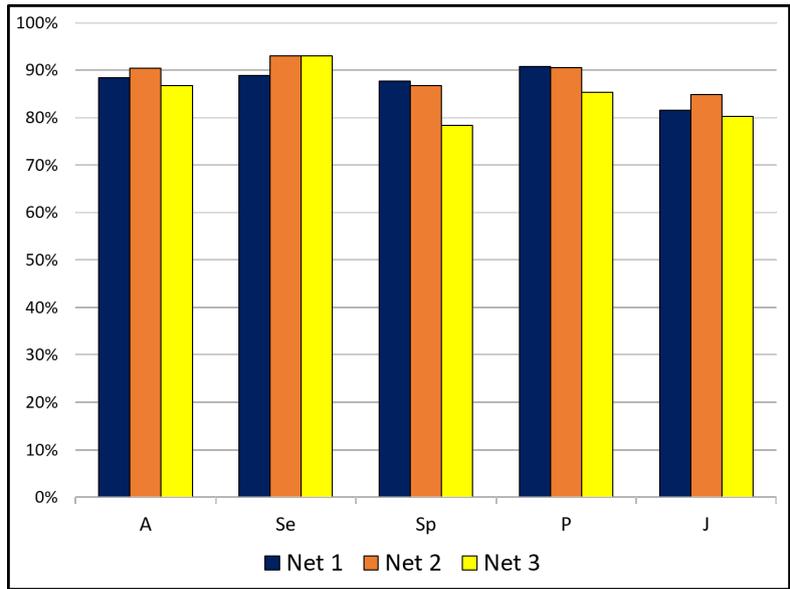


Figure 21: Risultati per le 3 reti neurale sulla classificazione delle immagini segmentate manualmente.

Per quanto riguarda le regioni ghiandolari segmentate automaticamente si osserva che nella classificazione dei pixel utilizzando la Net 1 si ha accuratezza pari a 85.07%, sensibilità pari a 87.00% e specificità pari a 83.28%, che presentano quindi valori comparabili, ponendo invece l'attenzione sulla classificazione delle immagini risulta evidente dal basso valore di specificità che vengono commessi molti errori nella classificazione delle ghiandole sane, che vengono classificate come tumorali. Questi errori sono dovuti al fatto che nel dataset ricavato da ghiandole segmentate manualmente sono presenti molte ghiandole tumorali di dimensione ridotta che hanno caratteristiche simili alle regioni ghiandolari sane con un'area non rilevante segmentate dall' algoritmo automatico. Questo causa degli errori non significativi dal punto di vista del numero di pixel, ma che, verificandosi in molte immagini, fanno aumentare il numero di falsi positivi nella classificazione delle immagini. Per questo motivo dal dataset completo sono state eliminate le ghiandole con area ridotta, che non vengono classificate direttamente tramite la rete neurale, ma vengono classificate successivamente tramite l'algoritmo di post-processing descritto nei capitoli precedenti che fornisce una classe basata sulla classe delle ghiandole presenti nell'intorno della ghiandola analizzata.

Dai risultati ottenuti utilizzando la Net 2 si osserva che l'accuratezza nella classificazione dei pixel aumenta leggermente passando da 85.07% a 88.94%, mentre l'accuratezza nella classificazione delle immagini aumenta notevolmente passando da un valore di 75.60% a 84.40%, nel dettaglio questo risultato rappresenta un forte calo del numero di falsi positivi che passano da 56 a 31, questo comporta anche un leggero aumento dei falsi negativi che da 5 diventano 8. Dopo l'applicazione dell'algoritmo di post-processing si osservano dei piccoli miglioramenti da questo punto di vista, dato che i falsi negativi scendono da 8 a 6.

In seguito è stata fatta un'altra prova con l'obbiettivo di migliorare le performance, puntando ad aumentare ulteriormente la sensibilità, eliminando le ghiandole che presentano una superficie di lume elevata in rapporto all'area della ghiandola, dato che queste ghiandole sono sempre classificate come non tumorali ed essendo molto simili tra di loro potrebbero polarizzare il classificatore. Questa prova non ha prodotto i risultati sperati, dato che nella classificazione dei pixel si ha un calo importante dell'accuratezza che passa da 88.94% a 70.75%, questi risultati si rif-

lettono sulla classificazione delle immagini, in cui si ha un aumento sia dei falsi positivi, da 31 a 42, sia dei falsi negativi, da 6 a 16.

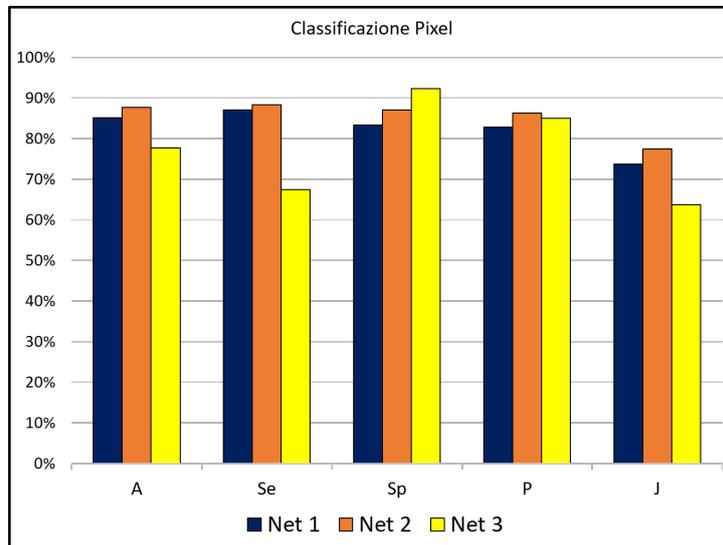


Figure 22: Risultati per le 3 reti neurale sulla classificazione dei pixel nelle immagini segmentate dall'algorithm automatico.

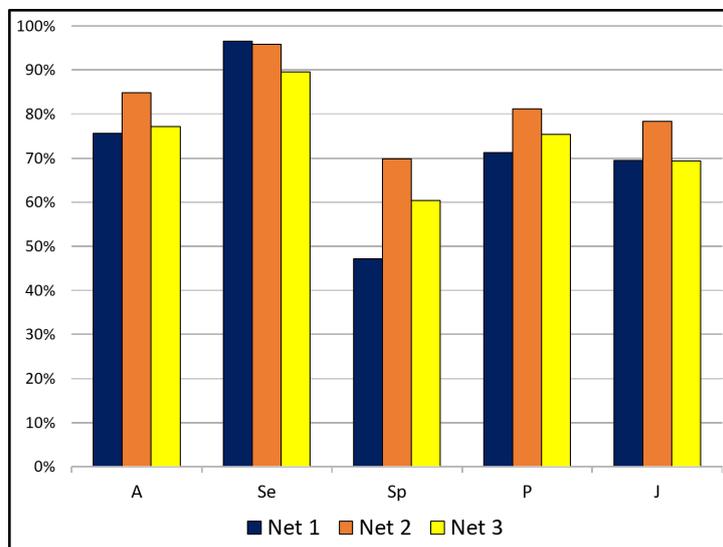


Figure 23: Risultati per le 3 reti neurale sulla classificazione delle immagini segmentate dall'algorithm automatico.

Dalla valutazione delle prestazioni risulta evidente che la rete neurale che si adatta maggiormente alla classificazione di regioni ghiandolari segmentate automaticamente è la Net 2. Questo perché consente di ottenere dei risultati migliori rispetto a quelli ottenuti con la Net 1, presentando inoltre dei tempi computazionali estremamente ridotti rispetto a quest'ultima, ciò è dovuto al fatto che le regioni che presentano un'area ridotta non vengono analizzate calcolando le features e fornendole in input alla rete neurale ma tramite l'algoritmo di post-processing. La Net 2 risulta la migliore anche se paragonata alla Net 3 che, pur garantendo tempi computazionali ulteriormente inferiori, non garantisce delle performance adeguate. La finalità di questo studio è stata quella di ottenere un classificatore altamente sensibile, quindi in grado di individuare tutte le immagini in cui sia presente un regione ghiandola identificata come tumorale, per questo motivo sono state analizzate le immagini che presentano del tessuto tumorale e che non vengono correttamente classificate dall'algoritmo in modo da individuare le cause della misclassificazione. L'errore più comune è dovuto al fatto che l'algoritmo di segmentazione individua delle regioni ghiandolari che comprendono sia ghiandole sane che ghiandole tumorali, questo altera il valore dei descrittori calcolati in queste regioni, specialmente se le ghiandole non tumorali occupano uno spazio molto più rilevante rispetto alle ghiandole tumorali, che porteranno la rete neurale a classificarle come sane, come mostrato in Figura 24 e in Figura 25.

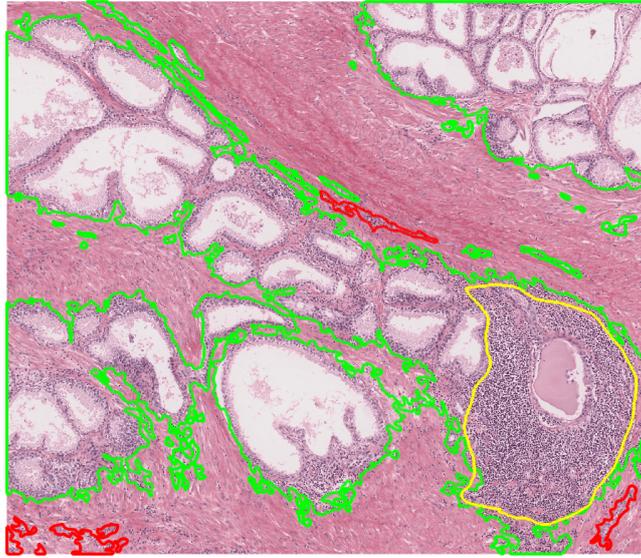


Figure 24: Verde: ghiandole classificate come sane, Rosso: ghiandole classificate come tumorali, Giallo: regione tumorale segnalata dall'anatomopatologo

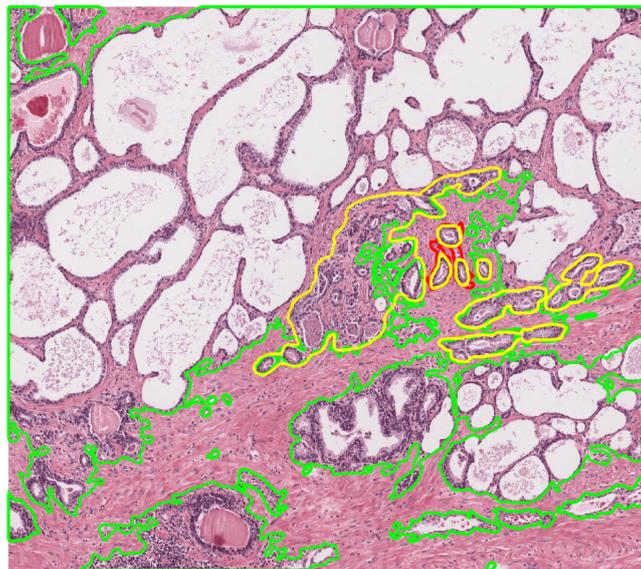


Figure 25: Verde: ghiandole classificate come sane, Rosso: ghiandole classificate come tumorali, Giallo: regione tumorale segnalata dall'anatomopatologo

Analizzando le immagini contenenti esclusivamente tessuto prostatico sano che vengono classificate come tumorali dall' algoritmo risulta evidente come le misclassificazioni siano dovute nella maggior parte dei casi a piccole imprecisioni nella segmentazione automatica delle ghiandole, quindi alla segmentazione di regioni che non sono effettivamente ghiandole e che sono abbastanza grandi da non essere escluse dalla classificazione della rete neurale (Figura 26). All'interno dei falsi positivi sono presenti inoltre immagini contenenti ghiandole molto simili alle tumorali (Figura 27).

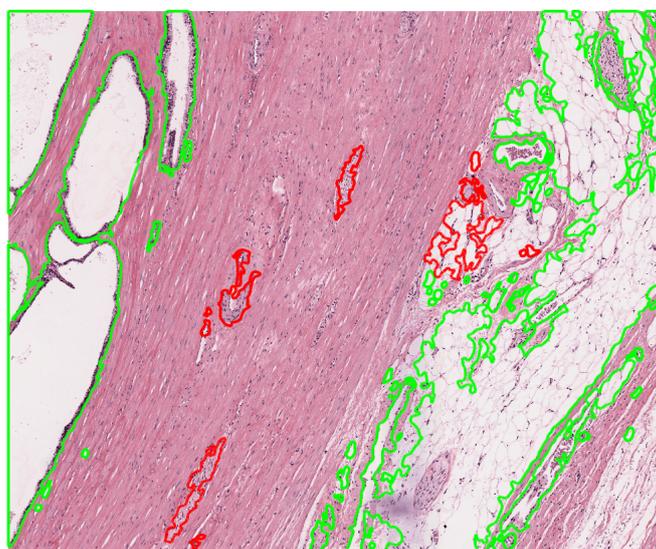


Figure 26: Verde: ghiandole classificate come sane, Rosso: ghiandole classificate come tumorali.

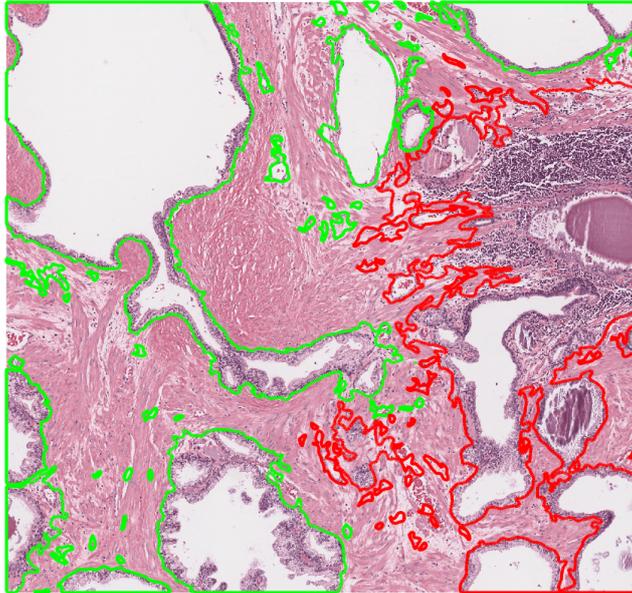


Figure 27: Verde: ghiandole classificate come sane, Rosso: ghiandole classificate come tumorali.

In conclusione si può affermare che i risultati ottenuti evidenziano come i descrittori individuati siano in grado di discriminare le regioni ghiandolari sane rispetto alle tumorali con livelli di accuratezza e sensibilità accettabili indipendentemente dal tipo di segmentazione effettuato sulle ghiandole. Viene inoltre evidenziato come gli errori commessi dal classificatore non siano dipendenti dai descrittori scelti per il training ma da piccole imperfezioni nella segmentazione automatica. Una possibile via risolutiva potrebbe essere quella di effettuare un'analisi non basata sulle intere regioni ghiandolari ma su delle porzioni ridotte, in modo da poter rilevare anche regioni che presentano sia ghiandole tumorali che ghiandole sane.

References

- [1] S. Frankel, G. D. Smith, J. Donovan and D. Neal, ‘Screening for prostate cancer’, *The Lancet*, vol. 361, no. 9363, pp. 1122–1128, 2003, ISSN: 0140-6736. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12890-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12890-5). [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603128905>.
- [2] S. E. Mills and J. E. Fowler Jr, ‘Gleason histologic grading of prostatic carcinoma. correlations between biopsy and prostatectomy specimens’, *Cancer*, vol. 57, no. 2, pp. 346–349, 1986. DOI: 10.1002/1097-0142(19860115)57:2<346::AID-CNCR2820570226>3.0.CO;2-E.
- [3] J. Diamond, N. H. Anderson, P. H. Bartels, R. Montironi and P. W. Hamilton, ‘The use of morphological characteristics and texture analysis in the identification of tissue composition in prostatic neoplasia’, *Human Pathology*, vol. 35, no. 9, pp. 1121–1131, 2004, ISSN: 0046-8177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.05.010>.
- [4] R. Sparks and A. Madabhushi, ‘Explicit shape descriptors: Novel morphologic features for histopathology classification’, *Medical Image Analysis*, vol. 17, no. 8, pp. 997–1009, 2013, ISSN: 1361-8415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.media.2013.06.002>. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136184151300087X>.
- [5] S. Naik, S. Doyle, M. Feldman, J. Tomaszewski and A. Madabhushi, ‘Gland segmentation and computerized gleason grading of prostate histology by integrating low-, high-level and domain specific information’, in *MIAAB workshop*, Citeseer, 2007, pp. 1–8.
- [6] A. Tabesh, M. Teverovskiy, H.-Y. Pang, V. P. Kumar, D. Verbel, A. Kotsianti and O. Saidi, ‘Multifeature prostate cancer diagnosis and gleason grading of histological images’, *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 26, no. 10, pp. 1366–1378, 2007.
- [7] P.-W. Huang and C.-H. Lee, ‘Automatic classification for pathological prostate images based on fractal analysis’, *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 28, no. 7, pp. 1037–1050, 2009.

- [8] Y. Y. Bautista PA Hashimoto N, ‘Color standardization in whole slide imaging using a color calibration slide.’, *J Pathol Inform.*, 2014. DOI: 10.4103/2153-3539.126153.
- [9] Y. Yagi, ‘Color standardization and optimization in whole slide imaging’, *Diagnostic Pathology*, vol. 6, no. 1, S15, Mar. 2011, ISSN: 1746-1596. DOI: 10.1186/1746-1596-6-S1-S15.
- [10] M. N. e. a. Gurcan, ‘Histopathological image analysis: A review.’, *IEEE reviews in biomedical engineering vol. 2*, vol. 2, no. 1, 2009. DOI: 10.1109/RBME.2009.2034865.
- [11] V. Nwosu, J. Carpten, J. M. Trent and R. Sheridan, ‘Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: Evidence of the complex nature of the disease’, *Human molecular genetics*, vol. 10, no. 20, pp. 2313–2318, 2001.
- [12] P. A. Humphrey, ‘Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate’, *Modern pathology*, vol. 17, no. 3, p. 292, 2004.
- [13] D. F. Gleason, ‘Histologic grading of prostate cancer: A perspective’, *Human pathology*, vol. 23, no. 3, pp. 273–279, 1992.
- [14] J. I. Epstein, W. C. Allsbrook Jr, M. B. Amin, L. L. Egevad, I. G. Committee *et al.*, ‘The 2005 international society of urological pathology (isup) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma’, *The American journal of surgical pathology*, vol. 29, no. 9, pp. 1228–1242, 2005.
- [15] A. Bill-Axelson, L. Holmberg, H. Garmo, J. R. Rider, K. Taari, C. Busch, S. Nordling, M. Häggman, S.-O. Andersson, A. Spångberg *et al.*, ‘Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer’, *New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 10, pp. 932–942, 2014.
- [16] A. I. di Oncologia Medica, ‘I numeri del cancro in italia 2015’, *Inter media editore, Brescia*, 2016.
- [17] T. Shaneyfelt, R. Husein, G. Bublely and C. S. Mantzoros, ‘Hormonal predictors of prostate cancer: A meta-analysis’, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 18, no. 4, pp. 847–847, 2000.
- [18] J. E. Montie, ‘Observations on the epidemiology and natural history of prostate cancer’, *Urology*, vol. 44, no. 6, pp. 2–8, 1994.

- [19] L. N. Kolonel, A. M. Nomura and R. V. Cooney, ‘Dietary fat and prostate cancer: Current status’, *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, no. 5, pp. 414–428, 1999.
- [20] M. F. Leitzmann and S. Rohrmann, ‘Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates’, *Clinical epidemiology*, vol. 4, p. 1, 2012.
- [21] K. Hemminki, ‘Familial risk and familial survival in prostate cancer’, *World journal of urology*, vol. 30, no. 2, pp. 143–148, 2012.
- [22] R. Young, J. Srigley, M. Amin, T. Ulbright and A. Cubilla, ‘Atlas of tumor pathology: Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra, and penis’, *Armed Forces Institute of Pathology, Eds, Washington*, vol. 28, 2000.
- [23] L. H. Sobin and I. D. Fleming, ‘Tnm classification of malignant tumors, (1997)’, *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, vol. 80, no. 9, pp. 1803–1804, 1997.
- [24] P. A. Humphrey, H. Moch, A. L. Cubilla, T. M. Ulbright and V. E. Reuter, ‘The 2016 who classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part b: Prostate and bladder tumours’, *European urology*, vol. 70, no. 1, pp. 106–119, 2016.
- [25] B. R. Oliai, H. Kahane and J. I. Epstein, ‘Can basal cells be seen in adenocarcinoma of the prostate?: An immunohistochemical study using high molecular weight cytokeratin (clone 34 β e12) antibody’, *The American journal of surgical pathology*, vol. 26, no. 9, pp. 1151–1160, 2002.
- [26] D. G. Bostwick and M. K. Brawer, ‘Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer’, *Cancer*, vol. 59, no. 4, pp. 788–794, 1987.
- [27] J. I. Epstein, L. Egevad, M. B. Amin, B. Delahunt, J. R. Srigley and P. A. Humphrey, ‘The 2014 international society of urological pathology (isup) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma’, *The American journal of surgical pathology*, vol. 40, no. 2, pp. 244–252, 2016.
- [28] R. Mazzucchelli, F. Barbisan and A. B. Galosi, ‘Finding of no tumor (pt0) in patients undergoing radical retropubic prostatectomy for clinically localized prostate cancer’, *Analytical and quantitative cytology and histology*, vol. 29, no. 5, p. 339, 2007.

- [29] A. S. Duffield and J. I. Epstein, ‘Detection of cancer in radical prostatectomy specimens with no residual carcinoma in the initial review of slides’, *The American journal of surgical pathology*, vol. 33, no. 1, pp. 120–125, 2009.
- [30] M. K. Terris, J. E. McNeal and T. A. Stamey, ‘Transrectal ultrasound imaging and ultrasound guided prostate biopsies in the detection of residual carcinoma in clinical stage a carcinoma of the prostate’, *The Journal of urology*, vol. 147, no. 3, pp. 864–869, 1992.
- [31] X. Meng, A. B. Rosenkrantz, N. Mendhiratta, M. Fenstermaker, R. Huang, J. S. Wysock, M. A. Bjurlin, S. Marshall, F.-M. Deng, M. Zhou *et al.*, ‘Relationship between prebiopsy multiparametric magnetic resonance imaging (mri), biopsy indication, and mri-ultrasound fusion–targeted prostate biopsy outcomes’, *European urology*, vol. 69, no. 3, pp. 512–517, 2016.
- [32] J. H. Yacoub, A. Oto and F. H. Miller, ‘Mr imaging of the prostate’, *Radiologic Clinics*, vol. 52, no. 4, pp. 811–837, 2014.
- [33] B. Turkbey, H. Mani, V. Shah, A. R. Rastinehad, M. Bernardo, T. Pohida, Y. Pang, D. Daar, C. Benjamin, Y. L. McKinney *et al.*, ‘Multiparametric 3t prostate magnetic resonance imaging to detect cancer: Histopathological correlation using prostatectomy specimens processed in customized magnetic resonance imaging based molds’, *The Journal of urology*, vol. 186, no. 5, pp. 1818–1824, 2011.
- [34] L. Lemaitre, P. Puech, E. Poncelet, S. Bouyé, X. Leroy, J. Biserte and A. Villers, ‘Dynamic contrast-enhanced mri of anterior prostate cancer: Morphometric assessment and correlation with radical prostatectomy findings’, *European radiology*, vol. 19, no. 2, pp. 470–480, 2009.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare i miei relatori, il prof. Filippo Molinari e l'ing. Massimo Salvi per aver supervisionato il lavoro di tesi e per essere stati sempre disponibili. Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia e ai miei nonni per avermi sempre incoraggiato in questo percorso.