



POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria  
Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

**Sviluppo di un algoritmo automatico  
per il calcolo dello score di Karpinski in  
immagini istologiche renali**

**Relatori**

Prof. Filippo Molinari

Ing. Massimo Salvi

**Candidato**

Andrea Ventura

DICEMBRE 2019



# Indice

<b>Elenco delle tabelle</b>	5
<b>Elenco delle figure</b>	6
<b>1 Introduzione</b>	11
1.1 Anatomia e fisiologia del rene . . . . .	11
1.1.1 La circolazione renale . . . . .	13
1.1.2 Il nefrone . . . . .	15
1.2 Chronic Kidney Disease (CKD) . . . . .	16
1.3 Trapiantologia renale . . . . .	18
1.3.1 Expanded Criteria Donors . . . . .	19
1.4 Analisi istopatologica . . . . .	20
1.4.1 Tecniche istologiche . . . . .	21
1.4.2 Principali colorazioni del tessuto istologico . . . . .	23
1.4.3 Artefatti nelle immagini istologiche . . . . .	24
1.4.4 Score di Karpinski . . . . .	25
<b>2 Materiali e Metodi</b>	31
2.1 Dataset . . . . .	31
2.2 Architettura dell'algoritmo . . . . .	33
2.3 Segmentazione del tessuto renale . . . . .	35
2.3.1 Color edges . . . . .	36
2.3.2 Cleaning . . . . .	38
2.3.3 Color deconvolution di Macenko . . . . .	39
2.3.4 Valutazione della distanza euclidea . . . . .	42
2.4 Individuazione del tessuto connettivo fibroso . . . . .	43

2.4.1	Individuazione dei pixel bianchi e color deconvolution . . . . .	44
2.4.2	Classificazione dei pixel ai due coloranti . . . . .	45
2.4.3	Cleaning delle maschere . . . . .	47
2.5	Segmentazione dei vasi . . . . .	49
2.5.1	Introduzione teorica alla CNN . . . . .	49
2.5.2	Architettura e allenamento della rete . . . . .	53
2.5.3	Postprocessing . . . . .	55
2.6	Calcolo dello score di Karpinski . . . . .	63
2.6.1	Score Glomerulare . . . . .	64
2.6.2	Score Tubulare . . . . .	66
2.6.3	Score Vascolare . . . . .	67
2.6.4	Score Interstiziale . . . . .	68
2.7	Metriche di validazione . . . . .	69
2.7.1	Metriche di validazione dei vasi . . . . .	70
2.7.2	Metriche di validazione per il grado di fibrosi . . . . .	72
2.7.3	Metriche di validazione per lo score . . . . .	73
<b>3</b>	<b>Risultati</b>	<b>74</b>
3.1	Validazione segmentazione vasi . . . . .	74
3.1.1	Risultati dell'allenamento della CNN . . . . .	74
3.1.2	Risultati sul Training set . . . . .	75
3.1.3	Risultati sul Test set . . . . .	77
3.1.4	Risultati sul postprocessing . . . . .	79
3.2	Validazione grado di fibrosi . . . . .	82
3.3	Validazione dello score di Karpinski . . . . .	85
3.4	Commento dei risultati . . . . .	87
3.4.1	Segmentazione dei vasi . . . . .	87
3.4.2	Individuazione del grado di fibrosi . . . . .	88
3.4.3	Calcolo dello score di Karpinski . . . . .	88
<b>4</b>	<b>Conclusioni e sviluppi futuri</b>	<b>89</b>
4.1	Conclusioni . . . . .	89
4.2	Sviluppi futuri . . . . .	90
	<b>Bibliografia</b>	<b>93</b>

# Elenco delle tabelle

1.1	Classificazione del CKD sulla base del GFR, secondo le guide internazionali. . . . .	17
1.2	Score di Karpinski [32] . . . . .	30
2.1	Proprietà delle regioni estratte . . . . .	33
2.2	<i>Confusion matrix</i> per la classificazione <i>Pixel-based</i> . . . . .	70
3.1	Risultati delle metriche per la classificazione <i>Pixel-based</i> . . . . .	77
3.2	Risultati delle metriche per la classificazione <i>Pixel-based</i> . . . . .	78
3.3	Risultati delle metriche per la classificazione <i>Pixel-based</i> . . . . .	81
3.4	Risultati delle metriche per la validazione <i>Object-based</i> . . . . .	82
3.5	Risultati delle metriche per la classificazione <i>Pixel-based</i> nelle immagini in tricromica. . . . .	84
3.6	Valutazione automatica e manuale dello score di Karpinski. . . . .	85
3.7	Errori relativi per ogni paziente sui quattro punteggi dello score di Karpinski. . . . .	87

# Elenco delle figure

1.1	Struttura anatomica del rene: sezione longitudinale [3]	12
1.2	Struttura circolare renale [4].	14
1.3	Struttura del nefrone [5].	15
1.4	Modello concettuale per le malattie croniche del rene [6]	16
1.5	Aspettativa di vita negli Stati Uniti per modalità (USRDS 2009) [9]	18
1.6	Tecniche istologiche per la preparazione del vetrino [28].	22
1.7	Immagini istologiche renali con colorazione (a) PAS e (b) tricromica di Masson.	24
1.8	Principali artefatti nelle immagini istologiche: (a) contaminazione (b) bolle d'aria (c) piegamenti.	25
1.9	Regione di tessuto istologico contenente (a) Glomerulo sano (b) Glomerulo sclerotico	26
1.10	Regione di tessuto istologico contenenti (a) Tubuli sani (b) Tubuli atrofici	27
1.11	Regione di tessuto istologico preso da (a) rene sano (b) rene malato	28
1.12	Esempio di misura manuale dello spessore del vaso (in rosso) e del diametro del lume (in verde) da parte del patologo	28
2.1	Schermata principale del software ImageScope	32
2.2	Pipeline dell'algoritmo sviluppato.	34
2.3	Pipeline dell'algoritmo per la segmentazione del tessuto renale	35
2.4	(a) immagine di input (b) gradiente dell'immagine (c) maschera binaria tramite Otsu (d) maschera dopo gli operatori morfologici	37
2.5	(a) Valori dei pixel nei canali RGB (b) Valori dei pixel trasformati nello spazio di densità ottica $V$ [45].	40
2.6	Componenti in uscita dalla <i>Color Deconvolution</i> di Macenko in scala di grigi: (a) canale 1 e (b) 2	41

2.7	(a) Segmentazione (in arancione) automatica del tessuto renale e relativa (b) maschera di segmentazione. . . . .	43
2.8	Pipeline del metodo euristico sviluppato. . . . .	43
2.9	(a) Immagine originale (b) In giallo i pixel bianchi dopo il thresholding.	44
2.10	I due canali in uscita dalla <i>color deconvolution</i> di Macenko in scala di grigi: (a) Canale del verde (b) Canale del rosso. . . . .	45
2.11	(a) Maschera binaria del verde (b) Maschera binaria del rosso. . . . .	46
2.12	Maschera binaria dopo l'approccio pixel-wise del (a)verde (b) rosso. . .	47
2.13	Risultato finale :(a) Immagine originale (b) Canale dei residui (c) Canale del verde (d) Canale del rosso. . . . .	48
2.14	Differenza tra gli strati di (a) una rete neurale classica (b) una CNN [47].	50
2.15	Architettura della AlexNet [49]. . . . .	51
2.16	Metodi di <i>transfer learning</i> [52]. . . . .	52
2.17	Struttura di una <i>fully convolutional network</i> [54]. . . . .	53
2.18	Architettura della AlexNet per la segmentazione semantica [42] . . . .	54
2.19	(a) immagine originale (b) softmax della classe 1 (c) risultato della seg- mentazione della rete . . . . .	55
2.20	Pipeline del <i>postprocessing</i> . . . . .	55
2.21	(a) Maschera dei vasi e (b) Risultato sull'immagine dopo l'eliminazione di errore di segmentazione e vasi piccoli . . . . .	56
2.22	Pipeline per la segmentazione del lume. . . . .	57
2.23	Maschera del lume dopo (a) Filtro di Gabor (b) Sovrapposizione masche- ra dei vasi e operatori morfologici (c) Valutazione dell'intensità media sui bordi . . . . .	58
2.24	Segmentazione del lume (a) prima e (b) dopo il <i>Region Growing</i> . . . .	59
2.25	(a) Maschera del lume (b) Segmentazione del lume in giallo sull'imma- gine istologica . . . . .	60
2.26	(a) <i>distance transform</i> (b) maschera dei vasi dopo la trasformata di Wa- tershed . . . . .	62
2.27	(a) Annotazione manuale del vaso (b) Segmentazione automatica del vaso (c) Segmentazione automatica del lume . . . . .	63
2.28	Estrazione delle regioni tramite le <i>Bounding Box</i> . . . . .	64
2.29	Segmentazione e individuazione dei glomeruli sull'intera fetta di biopsia. In verde sono indicati i glomeruli sani mentre in giallo gli sclerotici . .	65

2.30	Segmentazione e individuazione dei tubuli sull'intera fetta di biopsia. In blu sono indicati i tubuli sani mentre in verde chiaro gli atrofici . . . . .	66
2.31	Segmentazione dei (a) vasi e (b) lumi sull'intera fetta di biopsia. . . . .	67
2.32	Individuazione del tessuto (a) verde e (c) rosso sull'intera (b) fetta di biopsia. . . . .	69
3.1	Andamento dell'allenamento della AlexNet per la segmentazione semantica dei vasi. . . . .	75
3.2	Andamento dell'accuratezza nelle immagini di <i>training set</i> . . . . .	76
3.3	<i>Boxplot</i> delle metriche nelle immagini di <i>training set</i> . . . . .	76
3.4	Andamento dell'accuratezza nelle immagini di <i>test set</i> . . . . .	77
3.5	<i>Boxplot</i> delle metriche nelle immagini di <i>test set</i> . . . . .	78
3.6	Confronto segmentazione (a) manuale e (b) automatica . . . . .	79
3.7	Andamento dell'accuratezza nelle immagini estratte . . . . .	80
3.8	<i>Boxplot</i> delle metriche nelle immagini estratte . . . . .	80
3.9	<i>Bar diagram</i> delle metriche per la validazione <i>Object-based</i> . . . . .	81
3.10	Confronto segmentazione manuale e automatica: (a) manuale (b) immagine originale (c) automatica . . . . .	82
3.11	Andamento dell'accuratezza nelle immagini in tricromica estratte. . . . .	83
3.12	<i>Boxplot</i> delle metriche nelle immagini in tricromica estratte. . . . .	83
3.13	Istogramma degli errori assoluti. . . . .	84
3.14	<i>Bar diagram</i> dell'accuratezza per la validazione dello score di Karpinski . . . . .	86
3.15	<i>Bar diagram</i> degli errori assoluti per la validazione dello score di Karpinski . . . . .	86

# Sommario

Le malattie renali croniche portano ad un'insufficienza d'organo terminale, tale da non consentire al paziente un'adeguata qualità e aspettativa di vita. L'unica opzione terapeutica è rappresentata dalle terapie sostitutive, tra cui il trapianto di rene. Per aumentare il numero di organi candidabili al trapianto, oltre ai donatori convenzionali, sono stati presi in considerazione anche i donatori ad alto rischio o "marginali". In questi casi, le linee guida prevedono che prima dell'impianto venga effettuata un'analisi istopatologica su biopsie chirurgiche. I vetrini vengono preparati con colorazione PAS (acido periodico - reattivo di Schiff) e colorazione tricromica. Successivamente vengono analizzati al microscopio da un anatomopatologo esperto, che esegue una valutazione istologica definendo un preciso score morfometrico, detto score di "Karpinski", in cui si attribuisce un punteggio in base al quale si definisce se il rene è adatto per un trapianto (singolo o doppio) oppure se non è idoneo. Tali valutazioni richiedono molto tempo e sono operatore-dipendenti. Lo score di "Karpinski" valuta il grado delle lesioni croniche nelle quattro strutture del parenchima renale: glomeruli, tubuli, interstizio e vasi. A seconda del grado di glomerulosclerosi, atrofia tubulare, fibrosi interstiziale e sclerosi dei vasi con restringimento del lume, si assegna un punteggio compreso tra 0 a 3.

In questo lavoro di tesi viene presentato un sistema automatico per il calcolo dello score di "Karpinski" in immagini istologiche renali. Questo lavoro si focalizza sui metodi utilizzati per la segmentazione del tessuto renale nei vetrini istologici, l'individuazione del tessuto connettivo fibroso e la segmentazione dei vasi. Questi algoritmi sono stati uniti con un precedente lavoro di tesi sulla segmentazione di tubuli e glomeruli, al fine di sviluppare un sistema completamente automatico per il calcolo dello score di Karpinski. L'algoritmo sviluppato consiste in: 1) segmentazione ed estrazione del tessuto renale 2) normalizzazione della colorazione dell'immagine 3) valutazione delle quattro strutture e calcolo del relativo punteggio 4) calcolo dello score di Karpinski totale.

L'algoritmo è stato sviluppato e validato su un dataset di 10 pazienti. Per individuare i vasi è stata utilizzata una rete neurale convoluzionale (CNN) per la segmentazione semantica, allenata in modo supervisionato su 350 immagini estratte dal database mentre per la quantificazione del grado di fibrosi sono state utilizzate 300 immagini. I punteggi morfometrici delle quattro strutture ottenute (glomeruli, tubuli, vasi e fibrosi) hanno mostrato un buon *agreement* con la valutazione effettuata da un patologo esperto.

Avere a disposizione un sistema automatizzato per il calcolo dello score di "Karpinski" potrebbe essere utilizzato i) per valutare in tempi brevi i reni di donatori ad alto rischio, ii) come *tool* di *second opinion* permettendo al patologo di avere un riscontro sulla sua valutazione. Dunque, un sistema automatizzato per l'analisi del tessuto istologico renale risulterebbe funzionale nell'ottimizzazione del flusso di lavoro nel reparto di Anatomia Patologica.

# Capitolo 1

## Introduzione

In questo capitolo vengono elencate le principali caratteristiche fisiologiche e anatomiche del rene, descrivendo in maniera più dettagliata il nefrone. Di seguito viene approfondito l'argomento delle malattie croniche renali, condizione che può portare ad un'insufficienza d'organo terminale. Viene poi brevemente descritto il trapianto di rene, con particolare attenzione agli *expanded criteria donors*. Si tratta di un criterio per l'espansione del *pool* di donatori prendendo in considerazione anche donatori ad alto rischio o "marginali", su cui si esegue, oltre ad un'analisi clinica, anche una valutazione istopatologica. Su quest'ultima verrà descritta la preparazione di un vetrino partendo dall'estrazione di una biopsia, trattando poi la colorazione dei tessuti e i possibili artefatti. Infine viene descritto lo 'Score di Karpinski'. Si tratta di un punteggio istologico che valuta il grado di lesioni croniche per ogni compartimento del parenchima renale (glomeruli, tubuli, interstizio e vasi). Verrà spiegato in maniera più approfondita ogni punteggio e le modalità con cui il patologo li calcola.

### 1.1 Anatomia e fisiologia del rene

Il *rene* è il principale organo escretore dell'organismo, il cui compito è filtrare continuamente il plasma per formare l'urina, costituita da acqua, cataboliti e sostanze a basso peso molecolare [1]. Consente quindi di eliminare le scorie del metabolismo cellulare e farmaci. Oltre alla formazione dell'urina, partecipa al controllo dell'equilibrio idroelettrolitico e produce la renina (un enzima fondamentale nella regolazione della pressione sanguigna) e l'eritropoietina (ormone che promuove la formazione dei globuli rossi),

avendo così anche una funzione endocrina.

Il rene è situato a contatto con la parete posteriore della cavità addominale, ai lati della colonna vertebrale (tra l'undicesima vertebra toracica e la seconda-terza vertebra lombare). Sul margine mediale è presente una concavità di altezza pari a 3 – 4cm che costituisce l'ilo renale, la zona in cui confluiscono l'arteria renale, la vena renale, i vasi linfatici, i nervi e gli ureteri.

Il rene è di colore rosso bruno, pesa circa 150 – 160g, asse verticale lungo 12cm, diametro trasverso di 5 – 7cm e diametro antero-posteriore di 3cm [2].

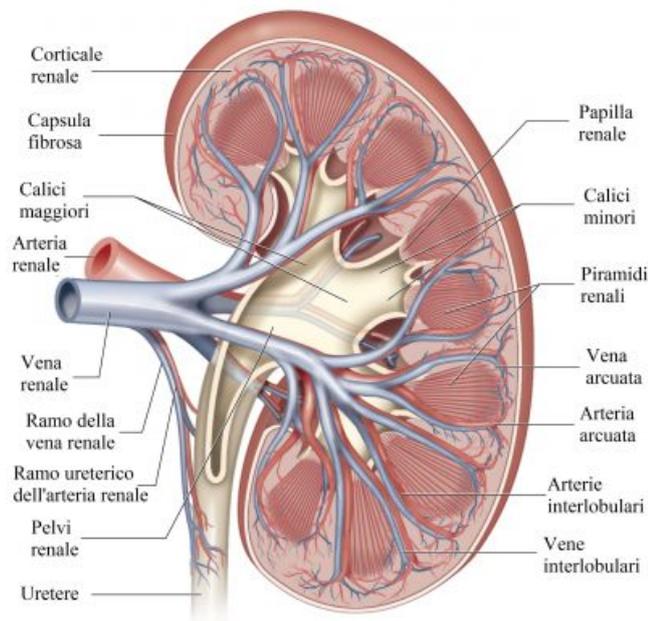


Figura 1.1: Struttura anatomica del rene: sezione longitudinale [3]

Come mostrato in figura 1.1, si può notare che il parenchima renale è suddivisibile in due regioni distinte:

- zona midollare: si trova nella parte più esterna del rene ed è caratterizzata da un colorito rossastro e da delle striature dirette verso il margine mediale del rene. Questa zona è sottolineata dalla presenza delle piramidi renali (dette anche piramidi di Malpighi), orientate in modo tale che la base sia diretta verso la periferia (verso la corticale) e l'apice verso il margine mediale. Il vertice delle piramidi viene chiamato papilla renale, sulla cui superficie sono presenti i forami papillari in cui sboccano

i dotti collettori, che riversano l'urina nei calici e nella pelvi renale [1]. Ogni papilla è circondata infatti da un calice minore per la raccolta dell'urina.

- zona corticale: rispetto alla midollare ha un colore più chiaro ed è meno consistente. È presente sia sulla superficie dell'organo che tra le piramidi di Malpighi dando origine alle colonne renali di Bertin. La corticale è divisa in:

- parte radiata
- parte convoluta

La prima è in vicinanza della base delle piramidi ed è finemente striata. È costituita dalle porzioni rettilinee dei tubuli renali, dalle anse sottili brevi ed è attraversata dai raggi di Ferrein (tubuli collettori lunghi che si estendono fino alla midollare). La parte convoluta invece è situata più superficialmente e qui sono collocati i corpuscoli renali di Malpighi e i tubuli contorti.

La piramide renale insieme alla parte corrispondente di corticale costituisce un lobo, mentre un raggio midollare con la parte convoluta circostante prende il nome di lobulo [2].

### **1.1.1 La circolazione renale**

I reni, a causa della loro funzione filtrante, ricevono una perfusione elevata: circa il 20% della gittata cardiaca [2].

Il sangue arriva all'organo attraverso le arterie renali (figura 1.2), che originano direttamente dall'aorta addominale e che in corrispondenza dell'ilo si suddividono in due rami:

- ramo anteriore, detto “prepielico”
- ramo posteriore, detto “retropielico”

Il primo darà sua volta origine ad un ramo superiore (polare superiore), un ramo inferiore (polare inferiore) e due rami anterosuperiore e anteroinferiore. Ognuna di queste arterie irrorava una parte del parenchima renale, con minime anastomosi con le arterie vicine.

Quest'ultimi, penetrati nel parenchima, danno origine alle arterie interlobari. Esse permettono di far distribuire il sangue dall'apice della piramide fino alla sua base. Successivamente cambiano direzione originando le arterie arcuate, che sono parallele alla base

e stanno tra la zona midollare e corticale.

Dalle arterie arcuate si originano le arterie interlobulari, dirette verso la periferia della zona corticale, e le arterie rette vere, che sono indirizzate verso l'apice della piramide. Le interlobulari portano il sangue nelle arteriole afferenti dei corpuscoli renali. Al loro interno i vasi si suddividono nel gomitolino capillare glomerulare formando numerose anse parallele. I glomeruli sono considerati come una rete mirabile arteriosa, per cui iniziano e terminano come arteriola. Questo tipo di circolo non ha una funzione nutritizia, ma di purificazione del sangue e di produzione di urina.

Dal glomerulo fuoriescono le arteriole efferenti da cui originano le arterie rette spurie, che insieme alle arterie rette vere vascolarizzano i tubuli renali. In seguito le arterie rette spurie si allontanano dai corpuscoli renali fino a confluire nelle vene interlobulari, che attraverso le vene arcuate e le interlobari drenano il sangue nella vena renale.

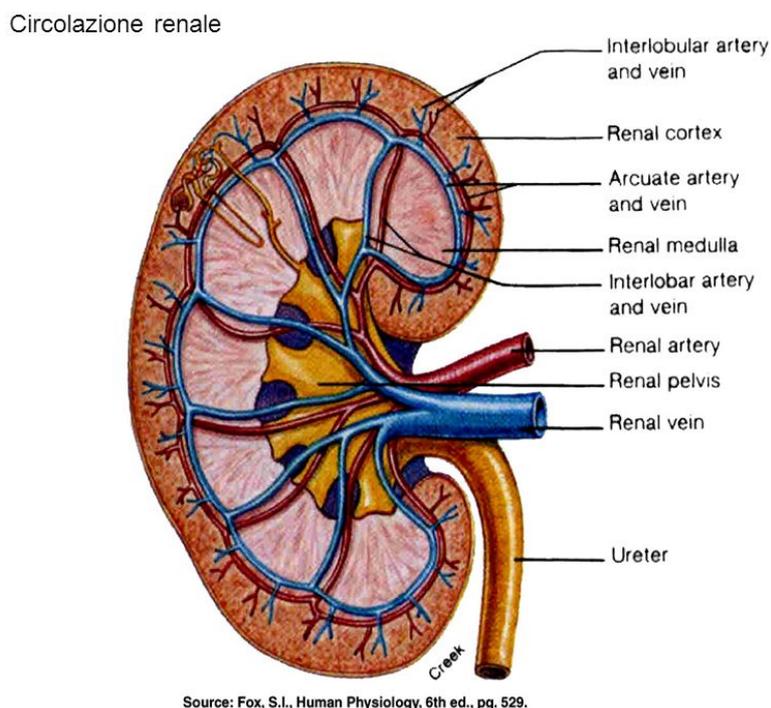


Figura 1.2: Struttura circolare renale [4].

### 1.1.2 Il nefrone

Il nefrone è l'unità funzionale del rene, fondamentale per la filtrazione del plasma e per la formazione dell'urina. Ogni rene ne contiene circa  $1.5 \times 10^6$ . È composto da due elementi funzionali (figura 1.3):

- corpuscolo renale di Malpighi
- sistema tubulare

Il corpuscolo filtra il liquido plasmatico, mentre i tubuli trasformano il filtrato primario in urina attraverso l'attività di sistemi di trasporto (processi di assorbimento e secrezione). In base alla posizione del corpuscolo nella zona midollare, i nefroni possono essere ad ansa breve o lunga.

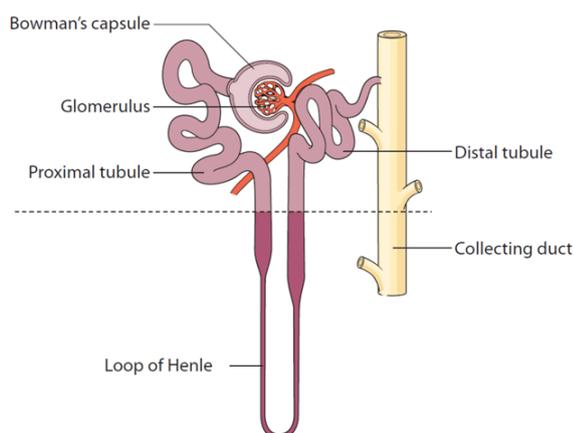


Figura 1.3: Struttura del nefrone [5]

Il corpuscolo renale è un sistema filtrante a bassa selettività formato dal glomerulo, una rete di capillari intercalati fra arteriola afferente ed efferente, e dalla capsula di Bowman, da cui prende origine il sistema tubulare e la cui forma è un calice a doppia parete. La parte in prossimità del glomerulo viene detta “polo vascolare”, mentre la porzione che continua con il sistema tubulare prende il nome di “polo urinario”. I corpuscoli renali di Malpighi hanno un diametro di  $150 - 200 \mu m$  e sono posizionate nella corticale renale, distribuite verticalmente intorno alle arterie interlobulari [1].

I tubuli originano dai corrispondenti corpuscoli renali ed è possibile dividerli in diverse sezioni, ciascuna delle quali avrà una propria morfologia e funzione, l'unica cosa in

comune tra loro è che sono formati da un epitelio monostratificato. Vengono divisi in diverse sezioni, ciascuna con la propria morfologia e funzione. il primo segmento prende il nome di tubulo prossimale, il quale presenta prima un tratto contorto e poi un tratto rettilineo. Qui avviene il riassorbimento dell'80% del filtrato.

La parte successiva prende il nome di ansa di Henle e ha una caratteristica forma ad "U" con un tratto discendente sottile (tDL), un tratto ascendente sottile (tAL) e infine un tratto ascendente spesso (TAL). In questa porzione avviene la concentrazione dell'urina.

Al TAL fa seguito il tubulo distale, dall'andamento prima rettilineo e poi contorto. Il suo compito consiste nel riassorbimento facoltativo dell'acqua, sottoposto alla regolazione ormonale.

L'urina prodotta viene riversata, infine, nel dotto collettore grazie ad un tratto di collegamento detto tubulo collettore.

Riassumendo il nefrone ha il compito di eseguire i seguenti processi: (1) ultrafiltrazione glomerulare, (2) riassorbimento tubulare, (3) secrezione tubulare.

## 1.2 Chronic Kidney Disease (CKD)

Le malattie croniche del rene sono un insieme di disturbi eterogenei che affliggono la struttura e la funzione del rene. La diagnosi delle CKD si basano principalmente sulla presenza di una cronica riduzione nella funzione renale e sulla presenza di danni strutturali del rene.

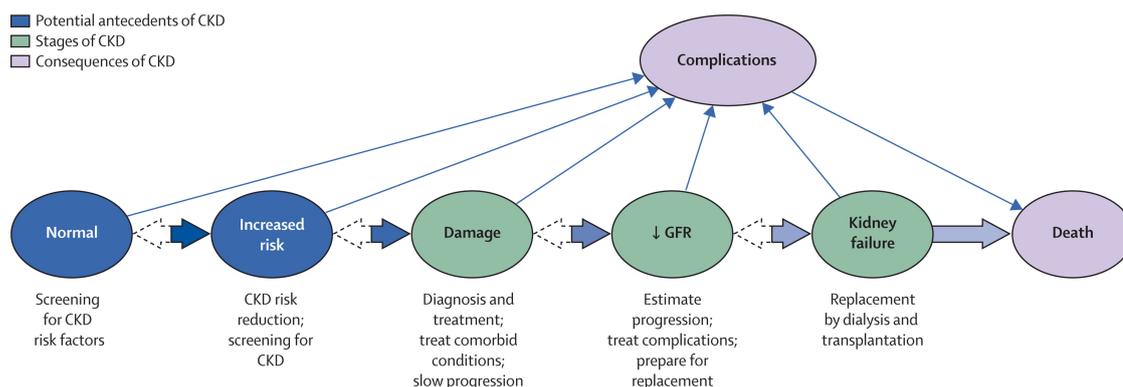


Figura 1.4: Modello concettuale per le malattie croniche del rene [6]

La figura 1.4 mostra un modello concettuale delle cause, dello sviluppo e della progressione delle CKD. Le fasi iniziali della malattia cronica sono spesso asintomatiche. La

malattia può progredire rapidamente portando al fallimento del rene in pochi mesi, tuttavia molte malattie progrediscono nel corso di decenni.

Le CKD sono spesso associate a:

- vecchiaia
- diabete
- ipertensione
- obesità
- malattie cardiovascolari (CVD)

La nefropatia diabetica e la nefrosclerosi ipertensiva sono considerate entità patologiche. La definizione delle CKD è stabilita dalla presenza di danni renali (albuminuria) e/o dal decremento della funzione renale per 3 mesi o più. Il migliore indicatore per quest'ultima è il tasso di filtrazione glomerulare (GFR) [7], che indica la quantità di plasma filtrato attraverso tutti i nefroni funzionanti per unità di tempo. Dalle linee guida internazionali il decremento delle funzioni renali è presente quando  $GFR < 60 \frac{mL}{min}$  per  $1,73m^2$ , inoltre le malattie sono divise in 5 categorie proprio sulla base del GFR (tabella 1.1).

Tabella 1.1: Classificazione del CKD sulla base del GFR, secondo le guide internazionali.

Stage	Descrizione	GFR ( $\frac{mL}{min}$ per $1,73m^2$ )
1	Danno renale con GFR normale o aumentato	$\geq 90$
2	Danno renale con lieve riduzione del GFR	60-89
3	Moderata riduzione del GFR	30-59
4	Severa riduzione del GFR	15-29
5	Insufficienza renale terminale	<15

Quando un rene viene classificato come “Stage 5” significa che le sue funzioni non possono più sostenere la vita di un individuo. In questi casi si parla di *end stage renal disease* (ESRD). Le uniche opzioni per il paziente sono le terapie di sostituzione del rene: la dialisi o il trapianto [6, 7].

### 1.3 Trapiantologia renale

Il trapianto di rene, ad oggi, rappresenta il migliore trattamento per i pazienti affetti da ESRD [8, 9].

Come mostrato in figura 1.5, il trapianto migliora la qualità della vita [10, 11] e l'aspettativa di vita di un soggetto trapiantato è maggiore rispetto a quella di un paziente in dialisi. Inoltre il costo di un trapianto è più basso del costo della dialisi sul lungo periodo [11, 12]: nel 2008 il costo negli USA è stato di \$77.506 per l'emodialisi, \$57.639 per la dialisi peritoneale e \$26.668 per il trapianto per persona [6]. Pertanto la trapiantologia renale viene considerata come la migliore forma di terapia di sostituzione renale.

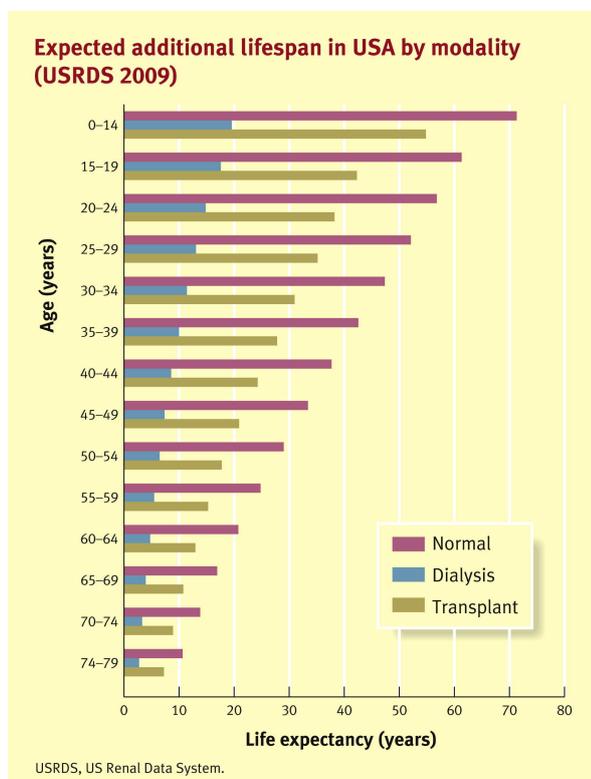


Figura 1.5: Aspettativa di vita negli Stati Uniti per modalità (USRDS 2009) [9]

I principali riceventi del trapianto di rene sono pazienti affetti da nefropatia diabetica, glomerulonefriti croniche, nefropatie vascolari, pielonefrite cronica e rene policistico [8]. L'intervento consiste nel trapiantare il rene, prelevato da donatore vivente o cadavere, su un paziente ricevente (*kidney transplant recipients*, KTRs) affetto da insufficienza renale terminale.

I punti chiave del trapianto sono i seguenti: il donatore, il ricevente e l'istocompatibilità. I KTRs non devono presentare controindicazioni al trapianto, quali tumori di recente diagnosi e infezioni. Inoltre, altri stati morbosi (ostruzioni delle basse vie urinarie, calcolosi renale, problemi cardiaci) devono essere trattate prima dell'intervento. Diabete, obesità e età del ricevente non sono considerate controindicazioni ma è consigliabile controllare rigorosamente i livelli glicemici, perdere peso ed è fondamentale un *counseling* preoperatorio per valutare rischi/benefici del trapianto.

Per definire la compatibilità tra donatore e ricevente vengono testati gli antigeni HLA A, B e DR di entrambi. Il sistema HLA è costituito da glicoproteine di superficie codificate da geni presenti sul cromosoma 6. Oltre a ciò deve essere eseguito il *cross-matching* linfocitario con l'obiettivo di ridurre il rigetto iperacuto [8].

Il donatore può essere vivente o cadavere. Il primo (*living donors, LD*) in Italia è consentito fra consanguinei oppure tra i cosiddetti *living unrelated donor (LURD)*, ossia donatori non geneticamente imparentati con il ricevente: marito/moglie e soggetti *emotionally related* al paziente. I donatori cadavere sono categorizzati in: donatore dopo morte cerebrale (DBD), in cui il rene viene recuperato mentre il cuore batte ancora, e donatore dopo morte circolatoria (DCD) [9]. Statisticamente il trapianto da donatore vivente ha una sopravvivenza a lungo termine superiore rispetto a quella da cadavere [13, 14]. Inoltre il tempo d'attesa per un trapianto da LD è più breve rispetto a quello da donatore cadavere.

### 1.3.1 Expanded Criteria Donors

La continua crescita delle liste d'attesa, dovuta all'aumento di incidenza delle ESRD, non è stata seguita da un aumento di donatori causando un incremento della discrepanza tra la disponibilità di organi e la richiesta di trapianti renali. La carenza critica di organi disponibili per il trapianto renale ha portato alla considerazione di strategie alternative per aumentare il *pool* di donatori [15]. Una di queste strategie è stata l'estensione del *pool* di donatori cadavere a quei soggetti che convenzionalmente non verrebbero ritenuti idonei, portando nei primi anni '90 al concetto di donatori "marginali" e più recentemente alla nozione di "*expanded criteria donors*" (ECD). L'uso di organi dai donatori più anziani è emersa come l'opzione più evidente, poiché l'età media dei donatori cadavere è incrementata sempre di più negli anni [16]. In passato la maggior parte di questi reni venivano scartati a causa di un'inferiore sopravvivenza dell'organo trapiantato e una

ridotta funzionalità post-trapianto. Uno dei chiari benefici dell'espansione del *pool* di donatori è stato quello di aumentare il numero dei trapianti: negli USA ha permesso di incrementarli dal 12,1% nel 1988, al 26,1% nel 1996 [17].

Tuttavia i reni degli ECD presentano un rischio al fallimento dell'impianto maggiore di 1,7, che corrisponde ad un rischio del 70% più grande rispetto al fallimento di un rene ideale. Il criterio per cui un donatore viene considerato “marginale” è il seguente: età superiore ai 60 oppure età compresa tra i 50 – 59 associata ad almeno due dei tre ulteriori fattori di rischio [18, 19]:

- morte per accidente cerebrovascolare
- preesistente ipertensione arteriosa
- valore di creatinina al momento del decesso  $> 1,5 \frac{mg}{dl}$

I benefici in termini di sopravvivenza osservati nei riceventi di trapianti con un rene marginale sono inferiori rispetto ai destinatari di reni da donatori convenzionali. La sopravvivenza a 1 anno per i reni ECD è del 90,6% rispetto al 94,5% per i reni non-ECD [20]. Uno studio autoptico su reni di pazienti anziani ha dimostrato una riduzione progressiva del numero e della dimensione dei glomeruli legata all'età [21]: la ridotta massa nefronica risulterebbe inadeguata per i requisiti funzionali dei destinatari [22]. Approssimativamente i reni “marginali” hanno  $\frac{1}{3}$  o meno del numero di nefroni presenti nei reni sani.

Tuttavia l'utilizzo di donatori “marginali” ha portato ad una serie di benefici. È stato dimostrato [23] che a 5 anni i risultati del trapianto di rene da donatori “marginali” non differiscono significativamente da quelli del trapianto da donatori convenzionali. Inoltre il trapianto di rene da donatori marginali permette di ridurre la mortalità e di migliorare la qualità della vita dei pazienti che continuano il trattamento dialitico. In media, un paziente trapiantato con rene marginale vive 5 anni più a lungo rispetto ai pazienti che rimangono in lista d'attesa [24].

## 1.4 Analisi istopatologica

Oltre alle valutazioni cliniche precedentemente descritte, per identificare reni marginali idonei per il trapianto viene eseguita un'analisi istologica che permette di valutare l'integrità strutturale e funzionale dell'organo [25]. L'analisi istopatologica negli *expanded*

*criteria donors* ha permesso di avere una migliore selezione dei donatori e una predizione più precisa sul risultato del trapianto [26]. Inoltre permette di stabilire se i reni del donatore marginale siano idonei per un trapianto singolo oppure doppio. Nel primo caso i due reni verranno assegnati a riceventi diversi, nel secondo caso saranno impiantati entrambi nello stesso paziente per garantire la presenza di una sufficiente massa nefronica funzionante. Per poter effettuare l'analisi viene eseguita una *biopsia chirurgica*, procedura con la quale si preleva un campione del tessuto d'interesse. Esistono diverse tecniche:

- *tru-cut biopsy* (TCB): il prelievo viene effettuato tramite ago tranciante che, mediante un meccanismo a scatto, consente l'asportazione di un cilindro di tessuto della lunghezza di circa 1 – 2cm
- *fine needle aspiration cytology* (FNAC): il prelievo viene eseguito con assistenza ecografica, si effettua un'incisione del parenchima renale e se ne asporta una piccola piramide

La porzione di tessuto estratta verrà inviata al laboratorio di anatomia patologica che provvederà alla preparazione del preparato istologico secondo le linee guida per la biopsia renale dettate dal *Renal Pathology Society* [27].

### 1.4.1 Tecniche istologiche

Dalla figura 1.6 si può notare come il processo sia lungo e complesso, esso può essere riassunto in:

- Prelievo del tessuto
- Fissazione
- Disidratazione
- Inclusione
- Sezionamento
- Colorazione

Il processo di fissazione ha lo scopo di preservare l'integrità strutturale del campione estratta. È un processo necessario poiché le cellule del tessuto si deteriorano velocemente perdendo le loro proprietà fisiche e chimiche. Questo deterioramento è dovuto a causa

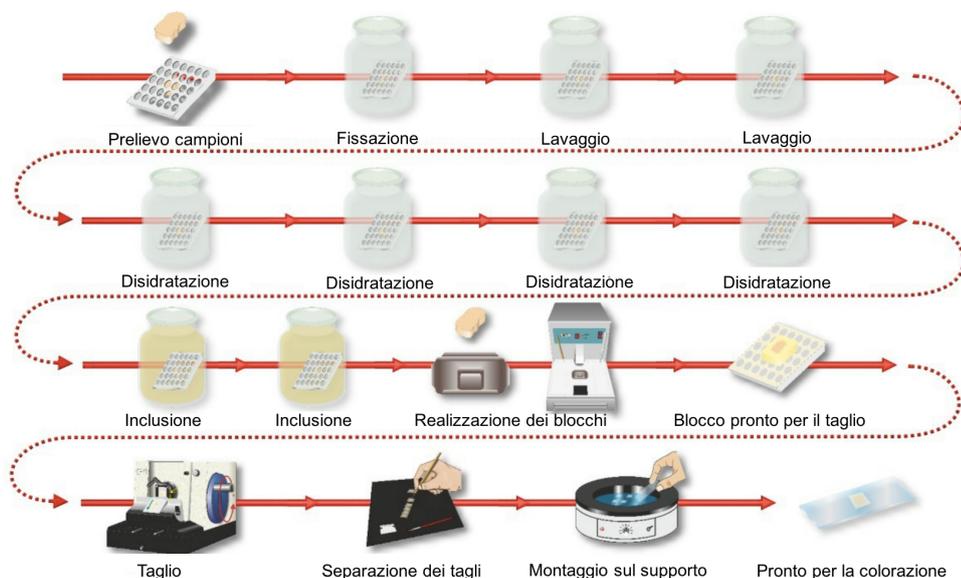


Figura 1.6: Tecniche istologiche per la preparazione del vetrino [28].

della variazione di temperatura, pH e microrganismi nell'ambiente che attaccano subito il tessuto una volta esportato. Il preparato viene trattato con miscele chimiche (fissativi) fissando le molecole del tessuto nella posizione in cui si trovavano *in vivo*.

Dopodiché si esegue il procedimento di inclusione, ovvero il tessuto viene inserito in un materiale più resistente che funge da sostegno. Il più utilizzato è la paraffina.

Prima dell'inclusione il preparato viene sottoposto al processo di disidratazione. Quest'ultimo consiste nell'allontanare la componente acquosa utilizzando dell'alcol, successivamente rimosso. Questo processo è fondamentale per poter utilizzare la paraffina, poiché sia l'acqua che l'alcol sono insolubili in paraffina.

Il sezionamento rende i frustoli abbastanza sottili per permettere la trasmissione della luce o di un fascio di elettroni.

Infine i frustoli vengono trattati con coloranti che hanno una affinità selettiva per diverse sostanze biologiche, andando ad aumentare il contrasto dell'immagine.

## 1.4.2 Principali colorazioni del tessuto istologico

Il processo di colorazione è una delle fasi più importanti per ottenere delle immagini chiare e poter caratterizzare al meglio le componenti morfologiche tissutali o cellulari di interesse all'interno della biopsia. Il fine è quello di aumentare il contrasto tra le componenti strutturali del tessuto in esame affinché ne risulti una migliore analisi microscopica. La maggior parte dei coloranti assorbe solo la luce, e le biopsie colorate sono perciò analizzate usando un microscopio ottico. Le zone del vetrino in cui non è presente alcun colorante appariranno bianche perché tutta la luce passa attraverso di esse. Laddove il colorante ha aderito, parte della luce viene assorbita.

Le principali colorazioni sono:

- Ematossilina - Eosina (EE)
- Ematossilina ferrica
- Acido periodico - reattivo di Schiff (PAS)
- Tricromica di Heidenhain (Azan-Mallory)
- Tricromica di Masson
- Tricromica di Mallory secondo Galgano
- Ighosti

La colorazione con ematossilina ed eosina è la più utilizzata e fornisce un eccellente quadro morfologico generale del nucleo e dettagli citoplasmatici [29].

La reazione PAS (figura 1.7a) e la tricromica di Masson (figura 1.7b) sono tra i coloranti maggiormente utilizzati per la valutazione di una biopsia renale. La prima è un indicatore non specifico per i polisaccaridi [30] (sostanza fondamentale dei connettivi, ivi comprese le membrane basali) e le strutture che li contengono assumono una colorazione rosso magenta. La tricromica di Masson reagisce con le strutture tissutali e cellulari del campione attraverso un fenomeno detto metacromasia, causando in tal modo la colorazione della cheratina e delle strutture muscolari in rosso mentre il collagene si presenta in blu o verde.

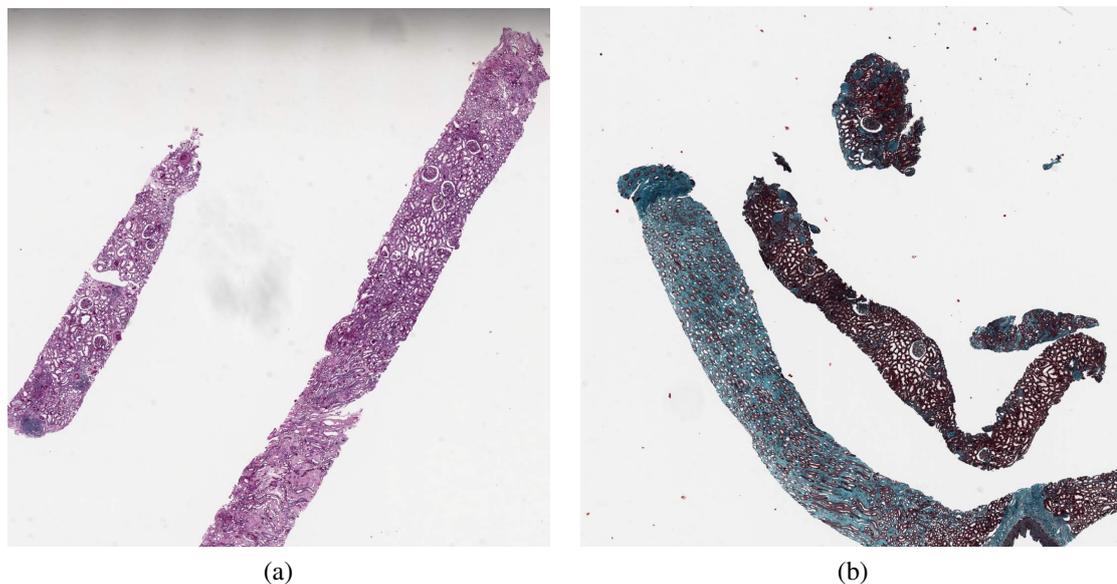


Figura 1.7: Immagini istologiche renali con colorazione (a) PAS e (b) tricromica di Masson.

### 1.4.3 Artefatti nelle immagini istologiche

Secondo quanto descritto nel paragrafo 1.4.1, è deducibile che il processo più critico nella preparazione delle immagini istologiche sia la fissazione. Poiché le cellule si deteriorano rapidamente dopo che un tessuto è stato rimosso dal corpo, raggiungere un'adeguata fissazione è spesso il compito più difficile che un patologo deve affrontare. Minimi errori nell'esecuzione di questo processo portano alla generazione di artefatti, definiti come modifiche della struttura originale di cellule e tessuti derivanti dal deterioramento degli stessi a causa del processo di fissazione. È dunque consigliabile che il patologo riduca al minimo la formazione di artefatti, poiché questi portano ad errori nell'elaborazione delle immagini. Esiste una molteplicità di artefatti [31], ma quelli più importanti e ricorrenti sono i seguenti:

- Contaminazione: il bagno d'acqua usato durante la fissazione può essere spesso contaminato con polvere, capelli o cellule residue della sezione precedente (figura 1.8a).
- Bolle d'aria: poiché le sezioni del tessuto vengono appiattite durante il processo di sezionamento nel bagno d'acqua, sotto di esse possono rimanere intrappolate bolle

d'aria. Queste lasciano aree, quando asciutte, che non aderiscono correttamente al vetrino e alterano la colorazione (figura (1.8b)).

- Piegamenti: presenti quando il tessuto si ripiega su se stesso durante la fase di taglio (figura 1.8c).

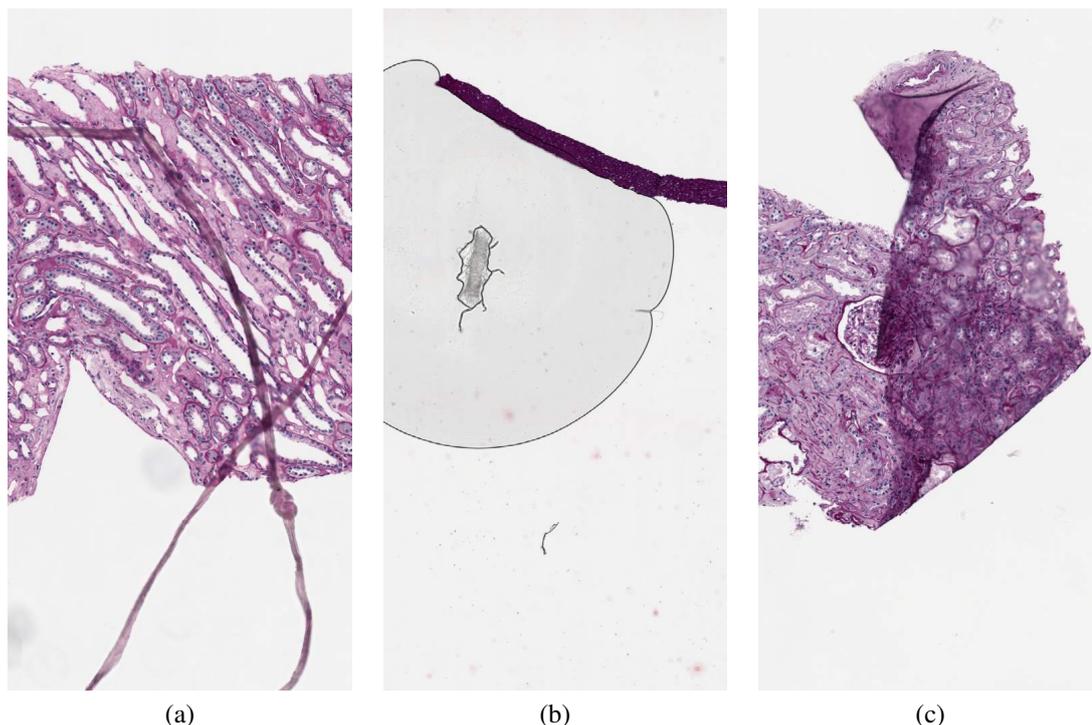


Figura 1.8: Principali artefatti nelle immagini istologiche: (a) contaminazione (b) bolle d'aria (c) piegamenti.

#### 1.4.4 Score di Karpinski

Dopo la preparazione del tessuto istologico sul vetrino il patologo lo valuterà approfonditamente tramite un microscopio ottico. Viene eseguita una valutazione istologica utilizzando un preciso score morfometrico detto "*Score di Karpinski*" [32]. Questo è uno score istologico che valuta le lesioni croniche in ogni comparto del parenchima renale, utile per valutare se i reni da donatore "marginale" siano adatti per un trapianto (singolo o doppio) oppure se non sono idonei.

Lo score di Karpinski, descritto nella tabella 1.2, prevede un'analisi semi-quantitativa assegnando un punteggio tra 0 e 3 per le seguenti componenti morfologiche:

- grado di glomerulosclerosi: il termine glomerulosclerosi segmentaria focale indica una lesione istologica aspecifica, che interessa inizialmente le cellule endoteliali dei glomeruli [33]. Segni più gravi di danno glomerulare comprendono la separazione focale dalla lamina basale e la necrosi [34]. A livello clinico vengono individuate una forma primitiva, che identifica una patologia associata a sindrome nefrosica idiopatica tendente a progredire verso l'insufficienza renale cronica, e una forma secondaria, che si verifica in associazione con altri fattori (farmaci, sostanze d'abuso, malattia ateroembolica, obesità, infezione da HIV). A livello istologico le lesioni glomerulari sono caratterizzate da proliferazione segmentale, ipercellularità nello spazio di Bowman e cambiamenti reattivi nelle cellule endoteliali [35].

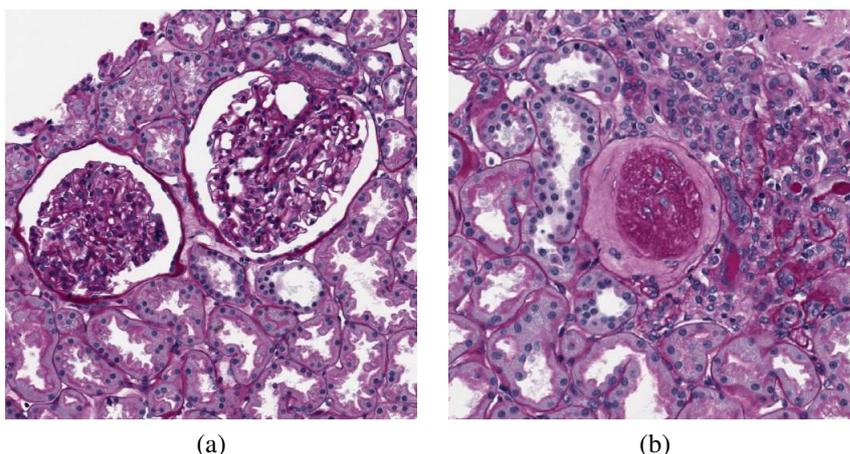


Figura 1.9: Regione di tessuto istologico contenente (a) Glomerulo sano (b) Glomerulo sclerotico

Dalla figura 1.9 si può notare la differenza morfologica tra un glomerulo sano (1.9a) e sclerotico (1.9b).

L'anatomopatologo, per calcolare lo score glomerulare, andrà a contare il numero totale di glomeruli, sia sani che sclerotici, presenti per ogni sezione (il vetrino viene suddiviso in zone che contengono una o più fette di biopsia) nel vetrino preparato. Calcolerà poi il punteggio valutando la percentuale di glomeruli sclerotici rispetto al totale, prendendo in considerazione la sezione del vetrino in cui sono presenti più glomeruli.

- atrofia tubulare: presente quando il donatore è affetto da una nefrite tubulo-interstiziale cronica. Questa è un danno primario ai tubuli renali e all'interstizio che provoca una ridotta funzionalità del rene, causando talvolta una malattia cronica renale [36]. Il compito del patologo sarà quello di quantificare i tubuli atrofici calcolando la percentuale presente rispetto alla totalità dei tubuli presenti. Dalla figura 1.10 si può notare a livello istologico un cambiamento morfologico del tubulo da sano (1.10a) ad atrofico (1.10b).

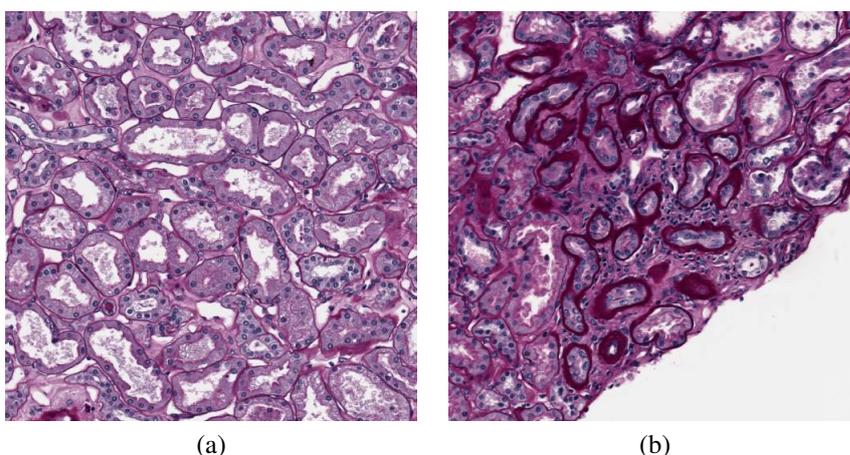


Figura 1.10: Regione di tessuto istologico contenenti (a) Tubuli sani (b) Tubuli atrofici

- fibrosi interstiziale: il patologo valuterà l'aumento quantitativo del tessuto connettivo fibroso nel parenchima corticale, indice di una cicatrizzazione tissutale. Nella valutazione istopatologica di un rene sano si evidenziano strutture tubulari molto fitte, necessarie per la filtrazione del plasma [37]. Al contrario, un rene malato presenta tessuto fibrotico in eccesso nelle aree tra i tubuli e questo porta alla compromissione delle funzioni renali [38]. L'estensione della fibrosi interstiziale indica la gravità della malattia cronica renale, che può sfociare in un'insufficienza d'organo terminale [39]. La figura 1.11 mostra una regione di tessuto preso da un rene sano (1.11a) e una presa da un rene malato (1.11b), il tessuto fibrotico è colorato di verde mentre i tubuli di rosso.

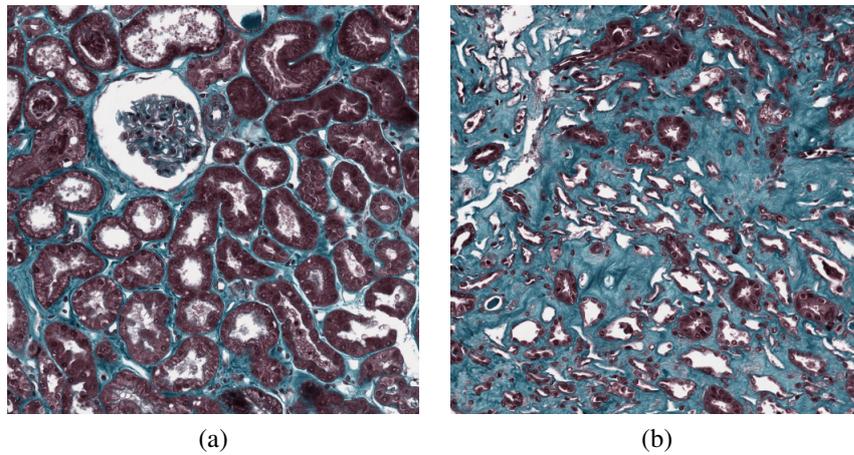


Figura 1.11: Regione di tessuto istologico preso da (a) rene sano (b) rene malato

- sclerosi vascolare con restringimento del lume: il patologo misura lo spessore del vaso paragonandolo con il diametro del lume, come mostrato in figura 1.12. Per lo score vascolare vengono valutate separatamente le arteriole e le arterie calcolando un punteggio per le prime e un punteggio per le seconde. Infine per lo score vascolare finale viene considerato il più alto punteggio.

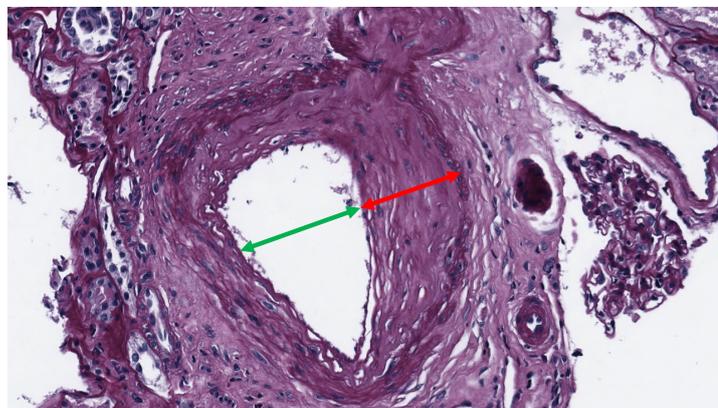


Figura 1.12: Esempio di misura manuale dello spessore del vaso (in rosso) e del diametro del lume (in verde) da parte del patologo

L'aumento dello spessore della parete vascolare è un indicatore dell'arteriosclerosi ialina, una lesione caratteristica nei reni di donatori affetti da ipertensione [40], e della fibroplasia nell'intima.

Per ogni biopsia vengono preparati due vetrini: uno colorato con PAS per valutare glomeruli, tubuli e vasi, mentre l'altro colorato con la tricromica di Masson per valutare il grado di fibrosi interstiziale. Dalla somma dei quattro punteggi si ricava uno score complessivo del rene, che può avere un valore da 0 (assenza di lesioni renali) a 12 (indica la presenza di cambiamenti marcati nel parenchima renale), sulla base del quale viene definita l'idoneità del trapianto. Secondo Remuzzi *et al.* [41] reni con un punteggio tra 0 e 3 contengono abbastanza nefroni funzionanti per poter essere trapiantati singolarmente in diversi riceventi. Quelli con un punteggio da 4 a 6 contengono un numero di nefroni vitali insufficiente per garantire un'adeguata funzione renale dopo trapianto singolo, ma impiantando entrambi i reni nello stesso ricevente (doppio trapianto) il numero totale di nefroni risulta sufficiente per la sopravvivenza. Reni con un punteggio pari a 7 o superiore non sono idonei né per il trapianto singolo né per il trapianto doppio e vengono scartati, poiché si assume una presenza inadeguata di nefroni.

È stato dimostrato [41] che, grazie all'utilizzo di questa classificazione morfometrica nell'analisi istopatologica prima del trapianto, la sopravvivenza degli impianti renali ottenuti dai donatori "marginali" è simile ai singoli trapianti da donatori più giovani. Inoltre, nel caso di donatori di età cronologica superiore ai 60 anni, la sopravvivenza dell'organo è sostanzialmente migliore quando questi vengono selezionati e assegnati sia sulla base di criteri clinici standard che sulla base di criteri istopatologici. Pertanto, l'aggiunta di criteri istopatologici alla valutazione dei donatori "marginali" ha migliorato l'esito del trapianto e ha aiutato ad espandere il *pool* di donatori per i trapianti.

Tabella 1.2: Score di Karpinski [32]

<b>Score glomerulare</b>	
0	glomeruli sclerotici non presenti
1	< 20% glomerulosclerosi globale
2	20-50% glomerulosclerosi globale
3	> 50% glomerulosclerosi globale
<b>Score tubulare</b>	
0	tubuli atrofici assenti
1	< 20% di tubuli affetti da atrofia
2	20-50% di tubuli affetti da atrofia
3	> 50% di tubuli affetti da atrofia
<b>Score interstiziale</b>	
0	tessuto fibrotico assente
1	< 20% di parenchima corticale rimpiazzato da tessuto connettivo fibroso
2	20-50% di parenchima corticale rimpiazzato da tessuto connettivo fibroso
3	> 50% di parenchima corticale rimpiazzato da tessuto connettivo fibroso
<b>Score vascolare*</b>	
Restringimento arteriole (o arteriosclerosi ialina)	
0	assente
1	spessore parietale aumentato ma inferiore al diametro del lume
2	spessore parietale pari o lievemente superiore al diametro del lume
3	spessore parietale significativamente superiore al diametro del lume
Arteriosclerosi (o ispessimento fibroso intimale-fibroplasia)	
0	assente
1	spessore parietale aumentato ma inferiore al diametro del lume
2	spessore parietale pari o lievemente superiore al diametro del lume
3	spessore parietale significativamente superiore al diametro del lume

\*Per le lesioni vascolari arterie e arteriole sono valutate separatamente. Lo score vascolare finale è determinato dal più alto score tra le due.

## Capitolo 2

# Materiali e Metodi

In questo capitolo viene descritto il dataset utilizzato per sviluppare e valutare l'algoritmo per il calcolo automatico dello score di Karpinski. Viene quindi spiegata l'architettura di suddetto algoritmo descrivendo brevemente il suo funzionamento. In seguito vengono analizzati nel dettaglio i metodi all'interno dell'algoritmo sviluppati per il riconoscimento di:

- Tessuto renale
- Tessuto connettivo fibroso
- Vasi

Successivamente viene descritto in dettaglio l'algoritmo e le modalità con cui vengono calcolati i vari score che compongono il Karpinski elencati nella tabella 1.2. Infine vengono descritte le metriche utilizzate per la validazione dei metodi sviluppati e lo score di Karpinski ottenuto per ogni paziente dall'algoritmo.

### 2.1 Dataset

I dati elaborati, ossia vetrini digitalizzati di biopsie renali di 10 pazienti effettuati nel 2018, sono stati forniti dall'Azienda Ospedaliera-Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino. Per ogni paziente sono stati preparati due vetrini: uno colorato con reazione PAS e l'altro con la tricromica di Masson. Dopo aver concluso la preparazione dei vetrini il passo successivo è stato quello di scansionarli tramite lo strumento Aperio Scanscope XT, ottenendo immagini digitali (*Whole Slide Images*, WSIs) in formato

.svs. Questa codifica rappresenta lo standard di molti microscopi digitali e le immagini possono essere visualizzate e processate utilizzando il software ImageScope (figura 2.1). Durante la scansione l'immagine viene digitalizzata su più ingrandimenti, partendo da

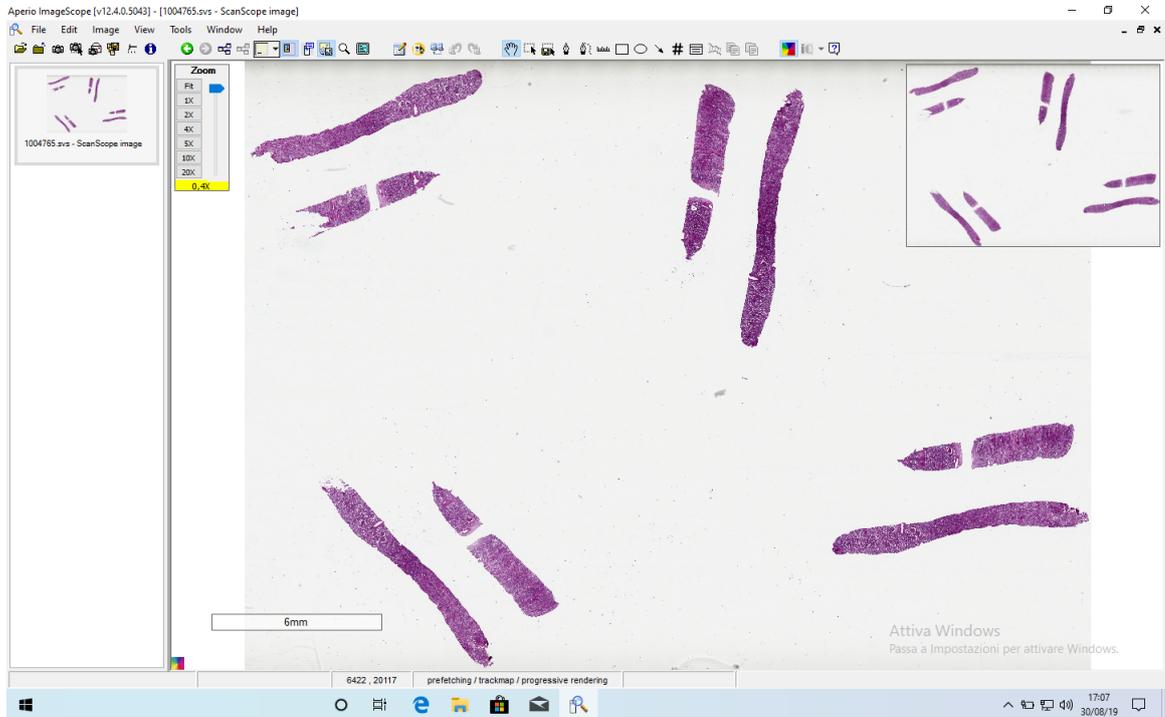


Figura 2.1: Schermata principale del software ImageScope

una visione meno dettagliata (1x) fino alla massima risoluzione consentita (20x), facilitando l'analisi dell'immagine.

In sostanza il dataset utilizzato per lo sviluppo dell'algoritmo è composto da 20 immagini (2 per ogni paziente).

Inoltre durante il lavoro di tesi sono state estratte manualmente delle sotto-regioni per ottimizzare e validare i metodi sviluppati all'interno dell'algoritmo:

- Nel caso del rilevamento di tessuto connettivo fibroso sono stati estratte 300 immagini dai vetrini digitalizzati con colorazione tricromica.
- Nel caso della segmentazione dei vasi sono stati estratte 350 immagini dai vetrini digitalizzati con colorazione PAS.

Queste sotto-regioni di tessuto sono state estratte utilizzando il software ImageScope e sono state selezionate evitando gli artefatti citati nel capitolo 1.4.3 che alterano la corretta

visualizzazioni dei tessuti. Per l'estrazione sono state seguite le indicazioni nella tabella 2.1.

Tabella 2.1: Proprietà delle regioni estratte

Dimensione	Ingrandimento	Formato
512x512	10x	.tif

## 2.2 Architettura dell'algoritmo

L'architettura dell'algoritmo sviluppato è riportata in figura 2.2. Date in input le immagini del vetrino in colorazione PAS e quello in colorazione tricromica preparate per il dato paziente, il primo passo è la segmentazione delle fette di biopsia presenti nelle immagini in modo tale da processare solo le parti in cui è presente il tessuto renale. Successivamente il colore delle regioni estratte viene normalizzato, procedimento necessario per abbattere la variabilità data dalle diverse intensità di colorazione delle fette di biopsia durante la preparazione del vetrino. A questo punto le regioni normalizzate ottenute dall'immagine PAS vengono utilizzate per calcolare lo score glomerulare, tubulare e vascolare; mentre le regioni normalizzate ottenute dall'immagine in tricromica vengono utilizzate per calcolare lo score interstiziale. Per la segmentazione e classificazione di glomeruli e tubuli vengono utilizzati metodi sviluppati in un precedente lavoro di tesi [42].

Per la segmentazione dei vasi è stata allenata una *Fully Convolutional Network* (FCN), ovvero una Rete Neurale Convoluzionale (CNN) utilizzata per la segmentazione semantica, per riconoscere i vasi all'interno delle immagini e utilizzare il risultato della rete come base di partenza per eseguire un *postprocessing* sull'immagine al fine di eliminare eventuali falsi positivi (FP) e considerare solo i vasi di dimensione medio/grande per il calcolo dello score vascolare.

Per l'individuazione del tessuto connettivo fibroso si è eseguito un approccio euristico basandosi sulla *color deconvolution* di Macenko ed una successiva tecnica di mutua esclusione sui due canali ottenuti dalla deconvoluzione, individuando il tessuto connettivo fibroso per il calcolo dello score interstiziale.

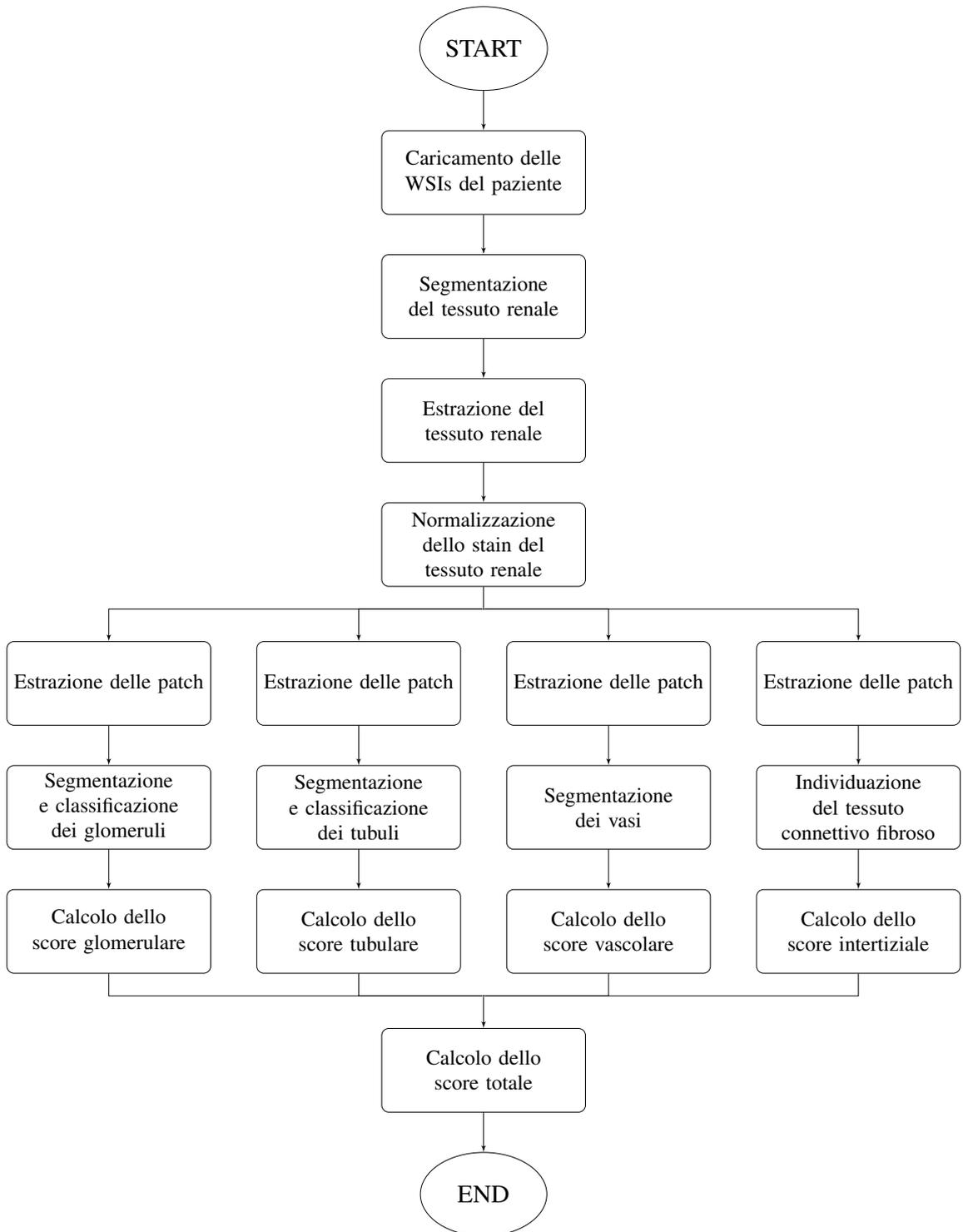


Figura 2.2: Pipeline dell' algoritmo sviluppato.

## 2.3 Segmentazione del tessuto renale

Nel metodo per il riconoscimento delle fette di biopsia renale sul vetrino si possono riconoscere 4 macroblocchi principali, come riportato nella pipeline in figura 2.3.

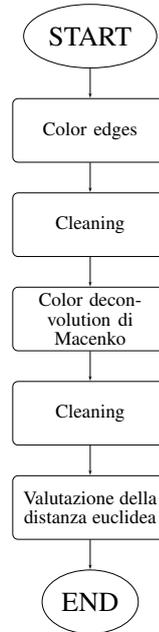


Figura 2.3: Pipeline dell’algoritmo per la segmentazione del tessuto renale

L’algoritmo è stato sviluppato in modo tale da essere il più generale possibile, con la possibilità di utilizzarlo non solo per le immagini istologiche di rene, ma anche per altre biopsie di interesse.

Data in input un’immagine digitalizzata del vetrino, il primo step è quello di ottenere una base di segmentazione del tessuto renale sfruttando il *coloredges* e l’uso di operatori morfologici per perfezionare la maschera di segmentazione. Dopodiché si eseguono una serie di operazioni di *cleaning* per eliminare eventuali falsi positivi (artefatti riconosciuti come tessuti renali). Le regioni identificate dalla maschera pulita sono utilizzate per effettuare la *color deconvolution* di Macenko, andando poi a considerare solo il secondo canale. Così facendo si eliminano ulteriori falsi positivi e in più vengono gestite quelle situazioni in cui una sezione è fusa con un artefatto. Si riesegue l’operazione di *cleaning* e infine si eliminano ulteriori falsi positivi (FP) andando a valutare la distanza euclidea per ogni oggetto rispetto ad un centroide. Si ottiene così la maschera binaria di segmentazione finale in cui sono indicate le regioni in cui è presente il tessuto renale nel

vetrino. I parametri utilizzati nelle operazioni morfologiche sono stati scelti sulla base di osservazioni sperimentali. Nei capitoli seguenti verranno descritti nel dettaglio tutti i macro-blocchi.

### 2.3.1 Color edges

Il primo passo è il riconoscimento delle discontinuità nell'immagine digitalizzata del vetrino in input (Figura 2.4a) tramite il metodo del massimo gradiente. Per il riconoscimento delle discontinuità è stato preso in considerazione il modulo del gradiente dell'immagine. In questo modo viene sfruttata al meglio la colorazione del tessuto rispetto allo sfondo dell'immagine per la segmentazione delle fette di biopsia. Quindi le variazioni di colore vengono rilevate anche quando l'intensità nella scala di grigi di due pixel è la stessa. La tripletta RGB di ogni pixel viene considerata come un vettore 3D, e la forza della discontinuità è il modulo del massimo gradiente.

Si considera la matrice jacobiana  $J$  i cui elementi sono le derivate parziali degli strati  $R/G/B$  rispetto alle direzioni  $x, y$  (l'immagine è 2D). Il modulo della discontinuità è l'autovalore massimo della Formula 2.1.

$$\begin{aligned}
 J' \cdot J &= \begin{bmatrix} dR_x & dG_x & dB_x \\ dR_y & dG_y & dB_y \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} dR_x & dR_y \\ dG_x & dG_y \\ dB_x & dB_y \end{bmatrix} \\
 &= \begin{bmatrix} dR_x^2 + dG_x^2 + dB_x^2 & dR_x \cdot dR_y + dG_x \cdot dG_y + dB_x \cdot dB_y \\ dR_x \cdot dR_y + dG_x \cdot dG_y + dB_x \cdot dB_y & dR_y^2 + dG_y^2 + dB_y^2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} J_x & J_{xy} \\ J_{xy} & J_y \end{bmatrix}
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

Le derivate parziali della matrice jacobiana vengono calcolate filtrando l'immagine con gli operatori di Sobel [43], nelle formule 2.2 sono descritti i kernel verticale e orizzontale. Il vantaggio è che insieme al filtro passa-alto per l'individuazione delle discontinuità viene accoppiato un "leggero" filtro passa-basso (operazione di media) per lo *smoothing* del rumore. In più viene raddoppiato il peso della colonna/riga centrale.

$$h_x = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 2 & 0 & -2 \\ 1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad h_y = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix} \tag{2.2}$$

Dopodiché viene calcolato il primo (il più grande) autovalore  $e_1$  della formula 2.1, la quale radice quadrata rappresenta il modulo del gradiente dell'immagine in input  $G_{mag}$ .

$$D = \sqrt{|J_x^2 - 2 \cdot J_x \cdot J_y + J_y^2 + 4J_{xy}^2|} \quad (2.3)$$

$$e_1 = \frac{J_x + J_y + D}{2} \quad (2.4)$$

$$G_{mag} = \sqrt{e_1} \quad (2.5)$$

Nell'equazione 2.3 il valore assoluto è necessario perché alcuni valori possono essere negativi a causa degli errori di arrotondamento. Il risultato dell'operazione di *coloredges* è mostrato nella figura 2.4b.

Per poter ottenere una prima stima della maschera binaria (figura 2.4c) di segmentazione si esegue un'operazione di *global thresholding* del gradiente  $G_{mag}$  utilizzando una soglia d'intensità ottenuta tramite il metodo di Otsu. Questo è un criterio non-parametrico e non-supervisionato per la scelta della soglia, che massimizza la separabilità delle classi risultanti nella scala di grigi [44]. In seguito vengono eseguite una serie di operazioni morfologiche al fine di migliorare la maschera ottenuta (Figura 2.4d).

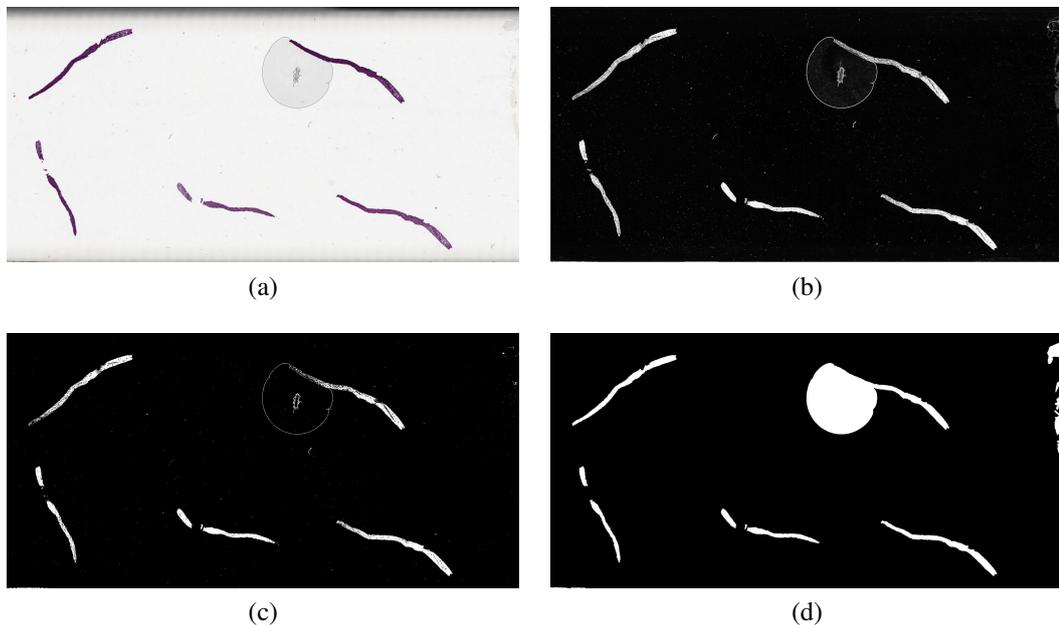


Figura 2.4: (a) immagine di input (b) gradiente dell'immagine (c) maschera binaria tramite Otsu (d) maschera dopo gli operatori morfologici

Per prima cosa si effettua una operazione di chiusura con lo scopo di omogeneizzare i bordi di una componente connessa e per unire delle eventuali concavità presenti negli oggetti riconosciuti. Dopodiché per ogni regione identificata nella maschera si effettua un'operazione di *filling* che permette di riempire i buchi presenti nelle regioni.

Si è osservato che l'operazione di *thresholding*, oltre ad ottenere la maschera binaria del gradiente, rende anche i pixel all'estremità della maschera bianchi. A causa di ciò in alcune immagini l'operatore morfologico di *filling* ha portato ad una maschera completamente bianca. Di conseguenza è stato inserito un controllo dell'area della maschera '*filled*' secondo il seguente criterio: se il numero totale dei pixel bianchi presenti nella maschera è maggiore o uguale al 90% del numero totale dei pixel che la maschera contiene, allora vengono imposti a zero i pixel agli estremi della maschera '*not filled*' e si riesegue il *filling* delle regioni. Se questo non accade, la rimozione dei pixel bianchi sui bordi viene svolta sulla maschera *filled*.

Infine vengono eliminati i componenti connessi con un area minore di 1000 pixel. Come si può notare nella figura 2.4a una fetta di biopsia presenta delle dimensioni notevoli, quindi elementi piccoli all'interno della maschera vengono considerati falsi positivi. Negli operatori di apertura e chiusura viene utilizzato un elemento strutturale di forma circolare.

### 2.3.2 Cleaning

Dopo aver ottenuto una maschera di segmentazione iniziale, il passo successivo è quello di eliminare gli eventuali falsi positivi presenti. In questo macroblocco vengono effettuate le seguenti strategie:

- *Cleaning* basandosi sull'immagine in *grayscale*: per ogni componente connessa si è calcolata la media dell'intensità dei pixel considerando l'immagine in scala di grigi. I tessuti in *grayscale* presentano un'intensità nella media, perciò l'obiettivo di questa strategia è quella di eliminare le regioni troppo scure (per esempio le annotazioni col pennarello sul vetrino) e troppo chiare (bolle d'aria). Un oggetto non viene eliminato se la sua intensità media è maggiore del 40% della media delle intensità medie di ogni regione riconosciute nella maschera, ed è minore del 88% dell'intensità massima.
- Eliminazione delle regioni lunghe e sottili: nelle immagini digitalizzate di vetrino a volte sono presenti degli elementi, solitamente di colore nero, lunghi e sottili che

attraversano tutta l'immagine. Questa considerazione è stata utilizzata per discriminare ulteriori falsi positivi, permettendo di eliminare eventuali righe all'interno dell'immagine. Per ogni componente connesso viene calcolata la lunghezza del suo asse minore e maggiore (*MinorAxisLength* e *MajorAxisLength*). Se il componente connesso ha la *MinorAxisLength* minore di 25 pixel ed il rapporto  $\frac{MinorAxisLength}{MajorAxisLength}$  minore di 0.02, la regione viene considerata un falso positivo e conseguentemente viene rimossa dalla maschera.

- *Cleaning* basandosi sull'immagine in rgb: il tessuto nelle immagini digitalizzate del vetrino presentano naturalmente la stessa colorazione e nella maschera binaria di segmentazione la maggior parte dei pixel appartengono ai tessuti. Per cui una ulteriore strategia è stata quella di calcolare l'intensità media degli strati RGB per ogni componente connessa, ottenendo quindi il centroide per ogni regione nella maschera (vettore di tre elementi). Successivamente per ogni strato RGB viene calcolata la media e deviazione standard considerando solo i pixel dell'immagine presenti nella maschera binaria. Se uno dei valori del centroide non è compreso tra la media più o meno due volte la deviazione standard, allora il componente connesso viene eliminato dalla maschera.

### 2.3.3 Color deconvolution di Macenko

La maschera binaria che si ottiene dal primo blocco di *Cleaning* non presenta artefatti soltanto in alcune immagini del dataset. Infatti, per la maggior parte delle immagini la maschera presenta ancora una certa quantità di falsi positivi. In più, determinate immagini presentano degli artefatti fusi con il tessuto, un problema che non si risolve applicando il *coloredges*. Dunque è stato necessario eseguire un *postprocessing* per distinguere gli artefatti dal tessuto stimando i coloranti utilizzati sul vetrino tramite il metodo di Macenko [45]. Questa tecnica viene utilizzata principalmente per i tessuti colorati con ematossilina-eosina, come nel caso del tessuto prostatico, ma può essere utile anche per la stima dei coloranti PAS e tricromica. Una volta stimati i due colori si procede con il processo di *color deconvolution*, al fine di ottenere due canali di amplificazione.

Come descritto nel capitolo 1.4.2, il tessuto colorato attenua la luce in un certo spettro in base al tipo e alla quantità di colorante che ha assorbito. Questa relazione è esplicitata

dalla Legge di Lambert-Beer [46]:

$$I = I_0 10^{(-WH)} \quad (2.6)$$

Dove  $I \in R^{m \times n}$  è l'immagine del vetrino digitalizzato ( $m = 3$  per i canali RGB e  $n =$  numero di pixel),  $I_0$  è l'intensità di luce che illumina il campione,  $W \in R^{m \times r}$  indica la matrice dei vettori di colorazione ( $r =$  numero di coloranti), e  $H \in R^{r \times n}$  è la mappa di densità dei coloranti. La densità ottica  $V$  può essere calcolata come segue:

$$V = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.7)$$

Ottenendo dunque la seguente relazione:

$$V = WH \quad (2.8)$$

Dato  $V$  l'obiettivo è quello di trovare la matrice dei vettori di colorazione  $W$  e la mappa di densità  $H$ . Nel metodo proposto da Macenko *et al.* [45] per prima cosa viene convertita l'immagine RGB nella sua corrispondente densità ottica. Questa trasformazione fornisce uno spazio in cui una combinazione lineare di colore si traduce in una combinazione lineare di valori di  $V$ . La relazione tra intensità e  $V$  è dimostrata nella Figura 2.5 in cui si può notare che i due colori sono ora separabili tramite una linea retta dall'origine. Un valore di  $V$  pari a 0 corrisponde ad un pixel tutto bianco dove niente sul vetrino ha

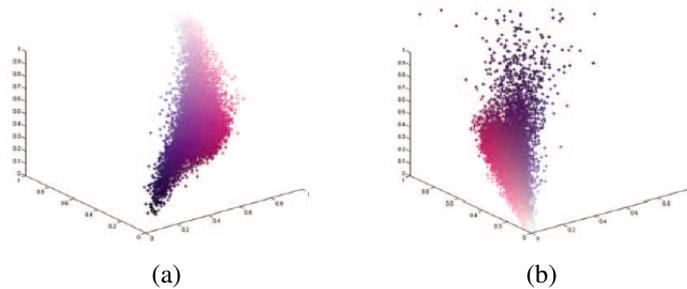


Figura 2.5: (a) Valori dei pixel nei canali RGB (b) Valori dei pixel trasformati nello spazio di densità ottica  $V$  [45].

assorbito luce. Per cui vengono eliminati i pixel con basso  $V$  tramite un operazione di *thresholding* impostando una soglia  $\beta$  pari a 0.15. Questo valore fornisce risultati molto

robusti poiché rimuove il minor numero possibile di dati. Il passo successivo è il calcolo del piano che formano i vettori utilizzando la decomposizione ai valori singolari (SVD) sulle tuple di densità ottica. In sostanza viene formato un piano dai due vettori corrispondenti ai due più grandi valori singolari della decomposizione SVD dei pixel trasformati nello spazio  $V$ . Tutti i pixel trasformati vengono proiettati su questo piano e normalizzati alla lunghezza unitaria. Viene calcolato poi l'angolo rispetto alla prima direzione SVD per ciascun punto, mappando così le direzioni del piano su uno scalare. Infine vengono trovati i due estremi robusti dell'angolo, ovvero  $\alpha^{th}$  e  $(100 - \alpha)^{th}$  percentile, non prendendo in considerazione i picchi a causa della presenza del rumore. Nell'algoritmo proposto il fattore  $\alpha$  ha un valore pari a 1. Infine questi valori vengono convertiti nello spazio di densità ottica rappresentando i due vettori di colore presenti nel colorante utilizzato per la biopsia, in output dell'algoritmo si ottiene la matrice dei vettori di colorazione  $W$ .

Nota  $W$  è possibile applicare la *color deconvolution* sull'immagine RGB ricavando la mappa di densità dei coloranti  $H$  seguendo l'equazione 2.8. Grazie all'ottenimento di  $W$  e  $H$  per ogni colorante è possibile utilizzare l'equazione 2.6 per ricavare un'immagine RGB che "amplifica" il suddetto colore.

Per dividere l'artefatto fuso con il tessuto e avere un fattore di discriminazione aggiuntiva per i falsi positivi, viene eseguita dunque una *color deconvolution* di Macenko sull'immagine RGB del vetrino digitalizzato considerando soltanto i pixel indicati dalla maschera binaria che si ottiene dal primo blocco di *Cleaning*. In figura 2.6 si può notare che questa operazione ha permesso di discriminare gli artefatti dal tessuto. Si è conside-



Figura 2.6: Componenti in uscita dalla *Color Deconvolution* di Macenko in scala di grigi: (a) canale 1 e (b) 2

rato il canale che amplifica le fette di biopsia presenti nel vetrino, cioè il secondo canale deconvoluto. Successivamente vengono ripetuti gli stessi operatori morfologici descritti

nel capitolo 2.3.1. L'unica differenza è la scelta della soglia per il *global thresholding*, in questo caso è stata scelta come soglia il 2% del valore massimo presente nel canale deconvoluto scelto.

In seguito vengono effettuate per una seconda volta le operazioni di *Cleaning* sulla maschera binaria in uscita da questo blocco.

### 2.3.4 Valutazione della distanza euclidea

Per pulire ulteriormente la maschera dai falsi positivi ancora presenti, si esegue in definitiva una valutazione della quantità di area bianca e della distanza euclidea rispetto ad un centroide per ogni componente presente nella maschera. Per ogni oggetto si considera solo la regione all'interno della sua *bounding box*, ovvero la più piccola regione rettangolare contenente l'oggetto. In tal modo la componente viene isolata e si considera solo una piccola porzione dell'immagine diminuendo i tempi computazionali. Dopo l'estrazione della regione si valuta:

- la percentuale di area bianca presente all'interno dell'oggetto tramite un'operazione di *thresholding* con una soglia del 80%.
- la media degli strati RGB dell'oggetto senza considerare i pixel bianchi precedentemente stimati.

Dopo aver ottenuto queste informazioni per ogni componente nella maschera, si esegue il calcolo del centroide tramite l'uso della media ponderata:

$$centroide = \frac{\sum_{i=1}^N x_i w_i}{\sum_{i=1}^N w_i} \quad (2.9)$$

Dove  $x_i$  sono le medie calcolate per ogni oggetto  $i$ -esimo, mentre  $w_i$  sono l'area di ogni componente  $i$ -esimo. Sono stati scelti come pesi poiché dall'osservazione dell'immagine dei vetrini si è notato che le fette di biopsia presentano un'area significativamente maggiore rispetto ad eventuali falsi positivi, come si può vedere nella figura 2.7. Infine gli oggetti vengono eliminati dalla maschera di segmentazione se sono troppo distanti dal centroide (maggiore di 70) o se per l'80% sono composti da pixel bianchi.

In figura 2.7 è mostrato il risultato finale dell'algorithmo per la segmentazione del tessuto renale.

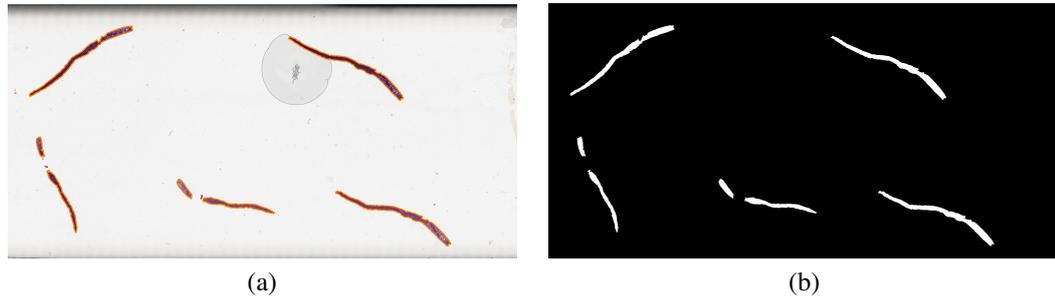


Figura 2.7: (a) Segmentazione (in arancione) automatica del tessuto renale e relativa (b) maschera di segmentazione.

## 2.4 Individuazione del tessuto connettivo fibroso

Come descritto precedentemente, nel calcolo dello score interstiziale il patologo valuta l'incremento del tessuto connettivo fibroso rispetto alla totalità del tessuto renale. Partendo da questa considerazione è stato sviluppato un metodo euristico in grado di individuare le zone fibrotiche nelle fette di biopsia in colorazione tricromica e il tessuto su cui valutare la sua estensione. Per l'ottimizzazione dell'algoritmo sono state utilizzate le

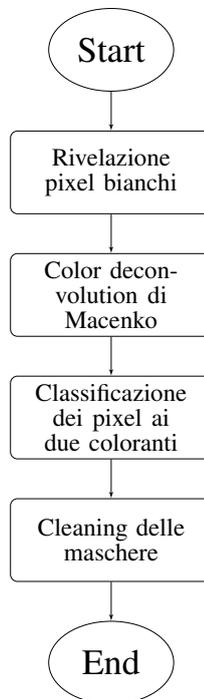


Figura 2.8: Pipeline del metodo euristico sviluppato.

sotto-regioni, con proprietà indicate dalla tabella 2.1, estratte dalle immagini digitalizzate del vetrino. In *output* si ottiene la maschera di segmentazione del canale verde (tessuto connettivo fibroso) e la maschera di segmentazione del canale rosso, indispensabili per il calcolo dello score interstiziale. L'insieme delle due maschere rappresenta la totalità del tessuto presente nell'immagine in input. Nella figura 2.8 è illustrata la pipeline dell'approccio euristico sviluppato.

### 2.4.1 Individuazione dei pixel bianchi e color deconvolution

Il primo passo è l'individuazione dei pixel bianchi tramite un'operazione di *global thresholding*. Un pixel viene considerato bianco quando il suo valore è maggiore del 78% dell'intensità massima (nel caso di un'immagine a 8 bit è pari a 255). Il risultato di questa operazione viene mostrato nella figura 2.9 in cui i pixel in giallo non vengono considerati successivamente per la stima della colorazione tricromica utilizzando il metodo di Macenko. Lo scopo di questo passo è quello di non considerare i pixel bianchi, in modo tale da eseguire Macenko solo sui pixel che appartengono al tessuto. Questo passaggio ha permesso di ottenere una migliore stima delle colorazioni in tricromica ed i pixel individuati che vengono classificati come appartenenti allo sfondo (i pixel bianchi) non verranno successivamente considerati per il calcolo dello score interstiziale.

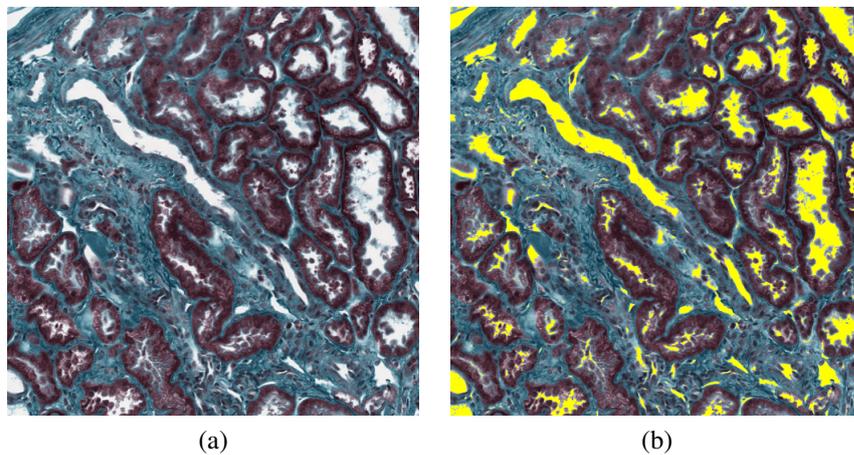


Figura 2.9: (a) Immagine originale (b) In giallo i pixel bianchi dopo il thresholding.

Dunque il passaggio successivo è stato quello di eseguire la *color deconvolution* solo sui pixel non indicati come bianchi. Si ottiene dunque la mappa di densità dei coloranti per il colore rosso e per il verde (figura 2.10). Ad entrambi i canali viene eseguito un *min-max*

*scaling* per normalizzare i valori di densità tra 0 e 1, in tal modo è possibile in seguito la classificazione dei pixel ai due coloranti andando a confrontare il valore di densità nei due canali.

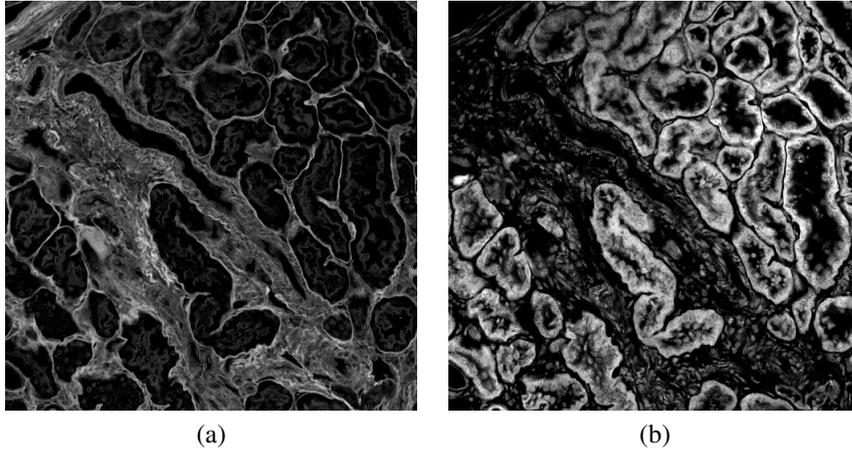


Figura 2.10: I due canali in uscita dalla *color deconvolution* di Macenko in scala di grigi: (a) Canale del verde (b) Canale del rosso.

## 2.4.2 Classificazione dei pixel ai due coloranti

Le due immagini in *grayscale* che si ottengono dalla *color deconvolution* sono una base di partenza per poter classificare i pixel nei due canali. Questi rappresentano quanto il pixel è stato amplificato rispetto al colore verde (figura 2.10a) e al colore rosso (figura 2.10b). Più il pixel è amplificato e più è intenso nell'immagine. Partendo da questo presupposto si è eseguito un *global thresholding*, con una soglia scelta tramite il metodo di Otsu, ottenendo una prima stima delle due maschere di segmentazione. Sulle due immagini ottenute viene eseguita una mutua esclusione in modo tale da eliminare i pixel presenti sia nel canale verde che nel canale rosso, ovvero quelli che hanno un valore pari a 1 in entrambe le maschere. Definendo  $ch1_{otsu}$  come la maschera per il canale verde e  $ch2_{otsu}$  come la maschera per il canale rosso, la mutua esclusione è eseguita come segue:

$$ch1_{def} = ch1_{otsu} - (ch1_{otsu} \cap ch2_{otsu}) \quad (2.10)$$

$$ch2_{def} = ch2_{otsu} - (ch1_{otsu} \cap ch2_{otsu}) \quad (2.11)$$

In tal modo i pixel appartenenti al canale verde non appartengono al canale rosso e viceversa. In sostanza le immagini  $ch1_{def}$  e  $ch2_{def}$  non presentano più elementi in comune. Il risultato della mutua esclusione è illustrato nella figura 2.11.

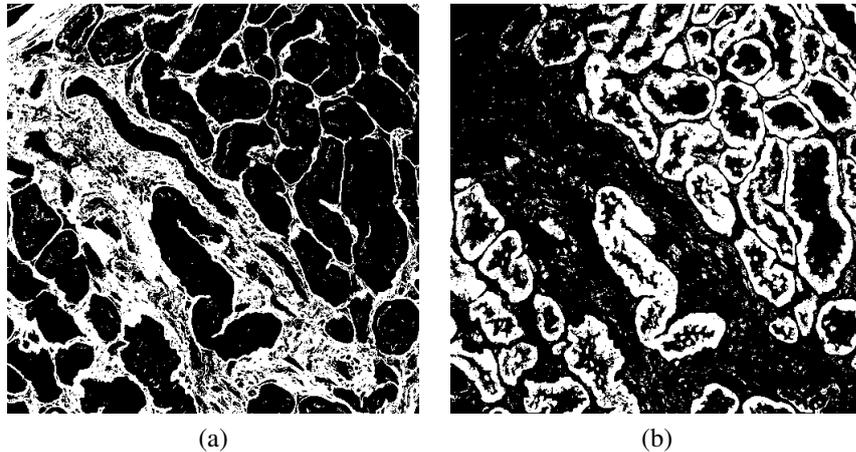


Figura 2.11: (a) Maschera binaria del verde (b) Maschera binaria del rosso.

Il passo successivo del metodo è la gestione dei pixel che non sono stati ancora allocati in uno dei due canali, ovvero quelli eliminati tramite la mutua esclusione e dal *thresholding* di Otsu. Viene quindi eseguito un approccio *pixel-wise* in modo tale che tutti i pixel presenti nell'immagine siano classificati in uno dei 3 canali:

- Canale del bianco.
- Canale del verde.
- Canale del rosso.

Partendo dalla maschera data dall'unione dei tre canali vengono individuati gli indici dei pixel non classificati, indicati dal valore 0. Di seguito vengono ricavati i valori di questi pixel nelle due immagini in *grayscale* ottenute dalla *color deconvolution*. Si esegue poi un confronto tra i due valori per ogni pixel, il quale viene classificato nel canale in cui l'intensità è maggiore. Le maschere  $ch1_{def}$  e  $ch2_{def}$  sono infine aggiornate con i pixel classificati tramite questo approccio (figura 2.12).

Da notare che nel confronto non viene considerato la maschera dei bianchi poiché il *thresholding* è già sufficiente per ottenere tutti i pixel bianchi presenti nell'immagine e non è quindi necessario un ulteriore controllo.

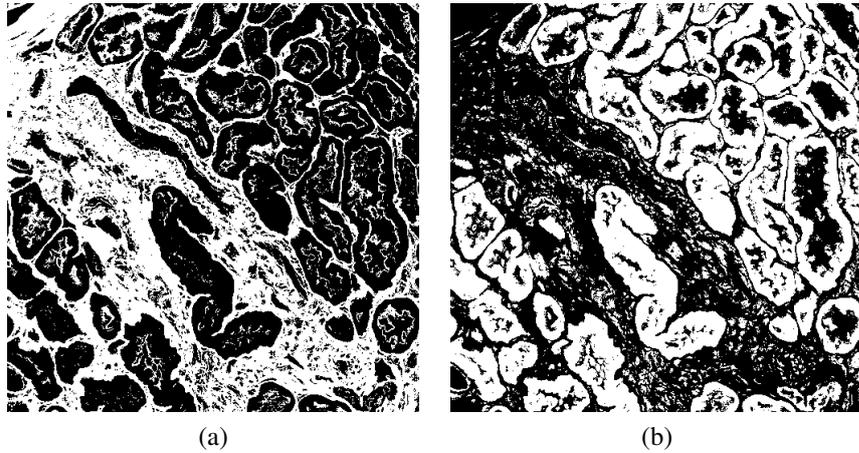


Figura 2.12: Maschera binaria dopo l’approccio pixel-wise del (a)verde (b) rosso.

### 2.4.3 Cleaning delle maschere

Quando l’anatomopatologo valuta il grado di fibrosi esegue un calcolo subottimale seguendo le linee guida internazionali. Essendo che il metodo proposto valuta tutti i pixel del tessuto nel vetrino, la percentuale di estensione calcolata può essere molto distante rispetto a quello misurato dal patologo esperto. Per questo motivo è stato necessario eseguire delle operazioni per eliminare quei pixel che non vengono considerati nel calcolo dello score interstiziale, in modo tale da avvicinarsi il più possibile al punteggio pronunciato dal patologo.

Per prima cosa vengono analizzate le componenti connesse presenti nella maschera del verde, se non hanno più di 20 pixel vengono allora eliminate dalla maschera. L’obiettivo è non considerare nel calcolo dello score quegli elementi verdi che non sono visibili all’occhio umano. L’insieme di queste piccole regioni potrebbero alterare la percentuale di estensione è discostarlo dal risultato del patologo. Questa operazione viene eseguita solo sul canale del verde poiché rappresenta la quantità di fibrosi presente nell’immagine.

Infine si esegue una valutazione sui valori RGB dei pixel indicati nelle due maschere andando a calcolare la distanza euclidea  $d$  con la matrice dei coloranti  $W$  stimati secondo il metodo di Macenko:

$$d_i = \sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - y)^2} \quad (2.12)$$

Dove  $x_i$  indica il pixel  $i$ -esimo,  $y$  è il vettore del colorante stimato e  $N$  è il numero totale di pixel indicati nella maschera. Per il caso del canale verde si considera la seconda riga

di  $W$ , mentre per il canale rosso il colorante di riferimento è la prima riga di  $W$ . Per entrambi i canali viene costruita una matrice in cui la dimensione delle righe è dato dal numero di pixel classificati e la dimensione delle colonne è pari a 3, ovvero il valore RGB dei pixel nell'immagine in input. Dunque si considera il codice colore RGB come *feature* e il vettore di colorante stimato come centroide della matrice.

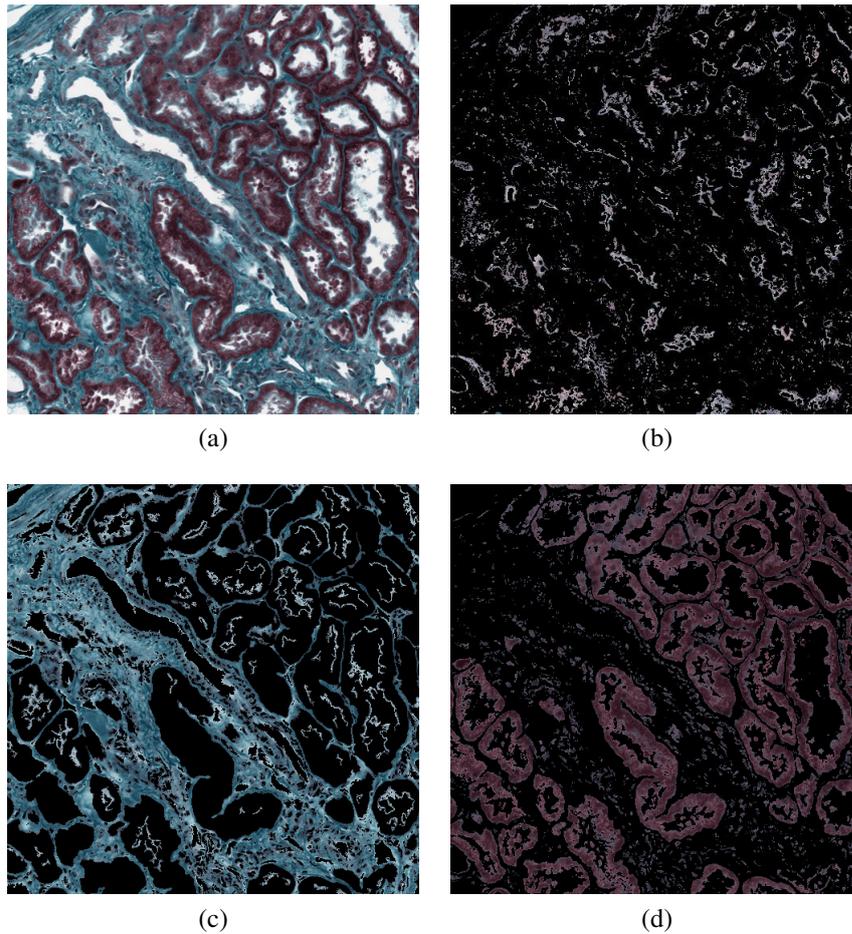


Figura 2.13: Risultato finale :(a) Immagine originale (b) Canale dei residui (c) Canale del verde (d) Canale del rosso.

Perciò per ogni matrice si ottiene un vettore delle distanze con il proprio centroide. Dopodiché viene impostata una soglia per i due canali in modo da eliminare i pixel troppo distanti dal centroide. Sono state scelte le seguenti soglie:

- la media più tre volte la deviazione standard per il canale del verde.
- la media più la deviazione standard per il canale del rosso.

Nel caso del canale rosso viene utilizzato una soglia più restrittiva poiché dal punto di vista visivo presenta più pixel lontani dal colorante di riferimento rispetto al canale del verde.

Tutti i pixel che presentano una distanza maggiore delle soglie imposte vengono eliminate dalle due maschere ottenendo in definitiva l'individuazione del tessuto verde e rosso nell'immagine in input. I risultati del metodo euristico sono presentati nella figura 2.13, tutti i pixel eliminati durante il processo di *cleaning* sono stati situati in una terza maschera chiamata canale dei residui.

## 2.5 Segmentazione dei vasi

Nel caso dello score vascolare il patologo esperto calcola il rapporto tra lo spessore della parete dei vasi rispetto al diametro del lume per valutare il grado di arteriosclerosi del donatore ad alto rischio. Per questo motivo nel metodo implementato viene utilizzata come prima cosa una rete neurale per il riconoscimento dei vasi nelle sotto-regioni (*patch*) di dimensione 512x512, estratte dalle fette di biopsia. Il risultato della rete viene quindi utilizzato come punto di partenza per una successiva elaborazione. Questa parte è stata fondamentale per migliorare il risultato della rete, andando a considerare soltanto vasi di dimensione medio-grande, e per segmentare il lume di tutti i vasi segmentati e utilizzati per il calcolo dello score vascolare.

### 2.5.1 Introduzione teorica alla CNN

La rete neurale convoluzionale (CNN o ConvNet) è un algoritmo molto comune nell'apprendimento profondo (*deep learning*), un metodo di *machine learning* utilizzato principalmente nel riconoscimento di oggetti all'interno delle immagini (*computer vision*). L'utilizzo delle CNN è diventato sempre più comune grazie alla loro capacità di apprendere le *feature* dall'immagine in input, eliminando il bisogno di estrarle manualmente. A differenza delle reti neurali classiche, i neuroni che compongono la CNN si estendono sulle 3 dimensioni (lunghezza, larghezza e profondità) adattandosi molto bene alle immagini (figura 2.14). Nell'architettura di una rete convoluzionale si possono riconoscere due blocchi principali: apprendimento e classificazione.

Il primo compito è quello di apprendere le *feature* dall'immagine in input ed è composto da diversi strati:

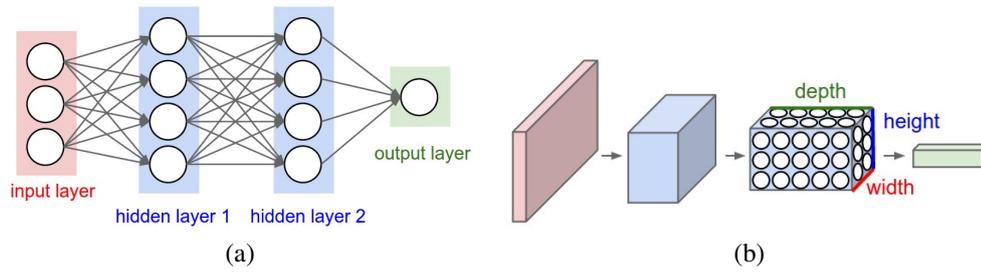


Figura 2.14: Differenza tra gli strati di (a) una rete neurale classica (b) una CNN [47].

- **Strato convoluzionale:** si applica al volume in input una serie di filtri convoluzionali (i pesi della rete) che connettono i neuroni in output solo con una piccola regione dell'input, permettendo di contenere il numero di pesi da aggiornare durante l'allenamento. Ogni filtro attiva determinate feature delle immagini. Dopo aver eseguito la convoluzione si esegue sul volume in output l'unità lineare rettificata (ReLU) con lo scopo di mappare i valori negativi a zero, consentendo un allenamento più rapido ed efficace.
- **Strato di raggruppamento (*pooling layer*):** semplifica l'output dello strato convoluzionale eseguendo un sottocampionamento non lineare, riducendo così il numero di parametri che la rete deve apprendere. Viene definita una regione che scorre su tutto il volume che o estrae il valore massimo sulla zona considerata (*max pooling*), oppure esegue l'operazione di media (*average pooling*). In questo strato non sono presenti parametri da apprendere.

Dopo aver appreso le *feature*, la CNN passa infine alla classificazione. Questo è un blocco composto da strati completamente connessi (*fully connected layers*), in cui i neuroni in output sono connessi completamente alle attivazioni del livello precedente.

### AlexNet e il metodo del Transfer Learning

Esistono diversi modelli in letteratura, ma la più famosa nel riconoscimento degli oggetti è l'AlexNet. Esso è una rete neurale convoluzionale con un'architettura profonda e grande, proposta da Alex Krizhevsky, Ilya Sutskever, and Geoffrey E. Hinton [48]. Come si può evincere dalla figura 2.15, la rete prevede 60 milioni di parametri e 650.000 neuroni, ed è composta da 5 strati convoluzionali, alcuni dei quali seguiti da uno strato di raggruppamento, e 3 strati completamente connessi, l'ultimo dei quali è collegato ad

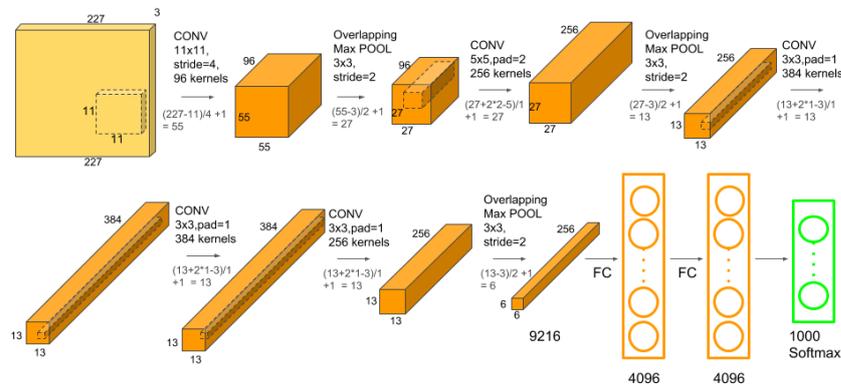


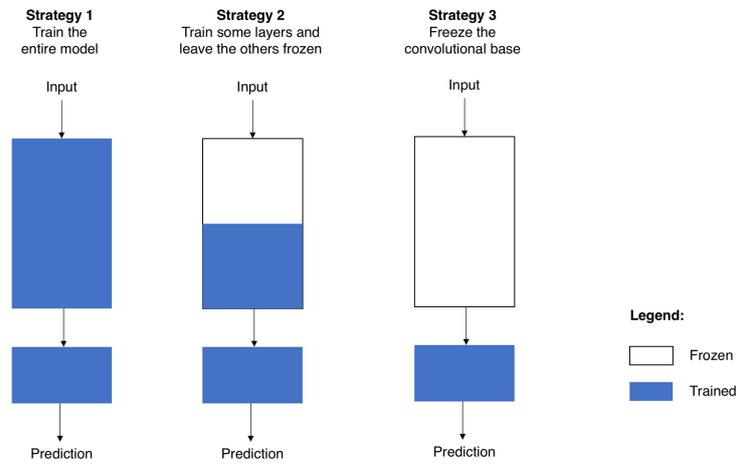
Figura 2.15: Architettura della AlexNet [49].

una *softmax* in cui ogni neurone  $i$ -esimo indica la probabilità che l'immagine di input appartenga alla classe  $i$ -esima. Dopo ogni convoluzione e ogni strato completamente connesso viene applicato una ReLU.

Applicare una CNN già allenata per un dato problema su un altro scopo è possibile grazie al metodo del *transfer learning* [50]. È un approccio molto utilizzato nel *machine learning* poiché consente di costruire modelli risparmiando sul tempo computazionale [51]. Il *transfer learning* permette infatti di utilizzare una rete pre-allenata su un'altra attività cambiando solo lo strato di classificazione e *softmax* con uno adatto per lo scopo che si vuole raggiungere, allenando poi la rete con una delle seguenti strategie (mostrate nella figura 2.16):

- Allenare l'intera rete.
- Allenare gli ultimi strati del blocco di apprendimento oltre a quello di classificazione, poiché gli strati più profondi nel blocco di apprendimento generano le feature relative al problema specifico.
- Allenare solo lo strato di output, se il problema da risolvere è simile a quello risolto dal modello pre-allenato.

Il metodo di *transfer learning* permette di ottenere diversi benefici tra cui la possibilità di raggiungere rapidamente la convergenza del modello addestrato e applicare il *machine learning* ad un problema che presenta pochi dati [53].

Figura 2.16: Metodi di *transfer learning* [52].

### Fully Convolutional Network

Una *Fully Convolutional Network* [54] è una rete neurale convoluzionale usata per la segmentazione semantica. Una CNN viene usata come base di partenza per costruire una rete che prenda in input un'immagine di dimensione arbitraria e che produca un output della stessa grandezza in cui ogni pixel dell'immagine è stato classificato (*pixelwise prediction*). Per poter elaborare l'intera immagine gli strati completamente connessi della CNN vengono sostituiti con strati convoluzionali equivalenti. Per poter predire ogni pixel dell'immagine di input si inserisce all'interno della rete degli strati di convoluzione trasposta che, al contrario della classica convoluzione, incrementa la larghezza e altezza del volume in input.

La FCN usa la rete neurale convoluzionale per estrarre le feature dall'immagine in input, poi trasforma il numero di canali del volume che esce dal blocco nel numero di classi attraverso lo strato di convoluzione  $1 \times 1$ , e infine trasforma l'altezza e la larghezza della mappa delle feature alle dimensioni dell'immagine in input usando lo strato di convoluzione trasposta. In sostanza una rete convoluzionale per la segmentazione semantica, come quella mostrata in figura 2.17, è composta da 3 blocchi principali:

- Blocco convoluzionale: estrazione delle feature.
- Blocco convoluzionale trasposto: ricampionamento del volume alla dimensione dell'immagine.

- Blocco di classificazione: ad ogni pixel viene assegnata una classe in base alla probabilità data dalla *softmax*. In questo caso quest'ultimo strato ha la stessa dimensione, in altezza e larghezza, dell'immagine di input e una profondità pari al numero delle classi.

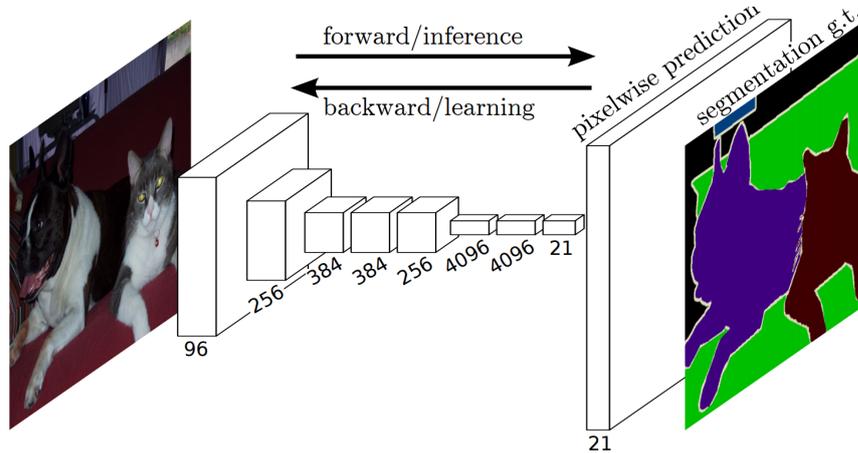


Figura 2.17: Struttura di una *fully convolutional network* [54].

## 2.5.2 Architettura e allenamento della rete

Per la segmentazione semantica dei vasi è stata utilizzata una rete modificando la struttura della AlexNet [42] e utilizzando come metodo di *transfer learning* l'allenamento dell'intera rete. È stata utilizzata la stessa architettura, rappresentata in figura 2.18, applicata per la segmentazione di glomeruli e tubuli [42]. Per l'allenamento della rete sono state estratte 350 immagini già normalizzate di cui 80% (280 immagini) è stato utilizzato come *Training set* e *Validation set* (90% training e 10% validation divisi in maniera casuale), mentre il restante 20% (70 immagini) compone il *Test set*. L'allenamento della rete è supervisionato poiché, oltre alle immagini, sono state fornite in input anche le corrispettive maschere manuali supervisionate da un patologo esperto, che forniscono l'informazione sulle classe di appartenenza dei pixel. In questo caso le classi sono:

- classe 0: tutti i pixel che non fanno parte dei vasi.
- classe 1: pixel appartenenti ai vasi.

Essendo che il numero dei pixel della classe 0 è significativamente maggiore rispetto a quelli appartenenti ai vasi, i pesi dello strato di classificazione vengono moltiplicati per

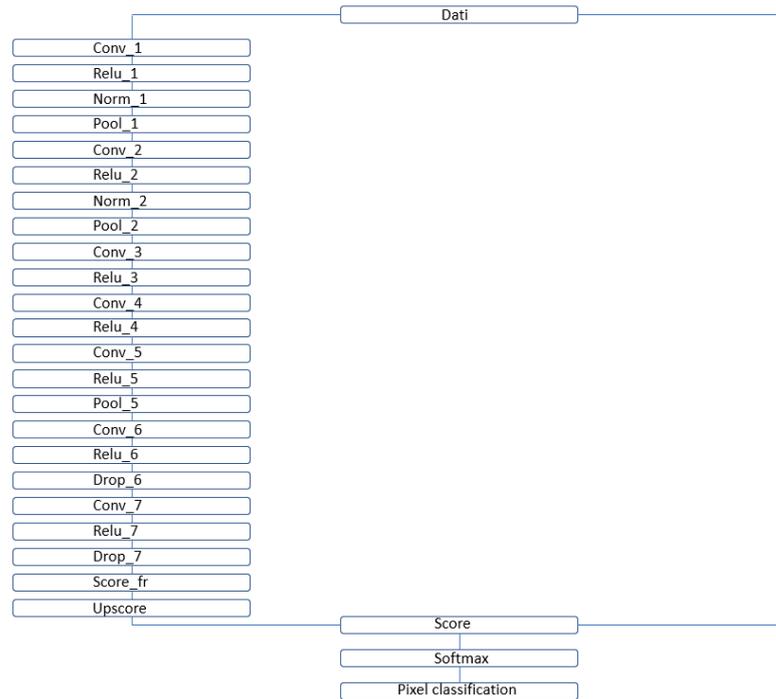


Figura 2.18: Architettura della AlexNet per la segmentazione semantica [42]

un fattore dipendente dalla frequenza dei pixel nel *Training e Validation set*, in modo tale da bilanciare questa differenza. Per permettere alla rete di avere una buona capacità di generalizzazione e evitare quindi il problema del *overfitting*, i dati del *Training set* vengono aumentati secondo le seguenti trasformazioni (*data augmentation*) [55]:

- Traslazione lungo l'asse x in un range di pixel compreso tra [-50,50].
- Traslazione lungo l'asse y in un range di pixel compreso tra [-50,50].
- Rotazione in un range di pixel compreso tra [-180,180].
- Immagine specchiata lungo l'asse x.
- Immagine specchiata lungo l'asse y.

Il risultato della rete sulle immagini, precisamente la *softmax* relativa alla classe 1, è stata utilizzata come punto di partenza per ottenere la segmentazione finale dei vasi di medio/grande dimensione e del corrispettivo lume. In figura 2.19 si riportano i risultati della rete su un'immagine di test, in rosso vengono evidenziati i pixel appartenenti alla classe 1 mentre i restanti pixel non vengono colorati.

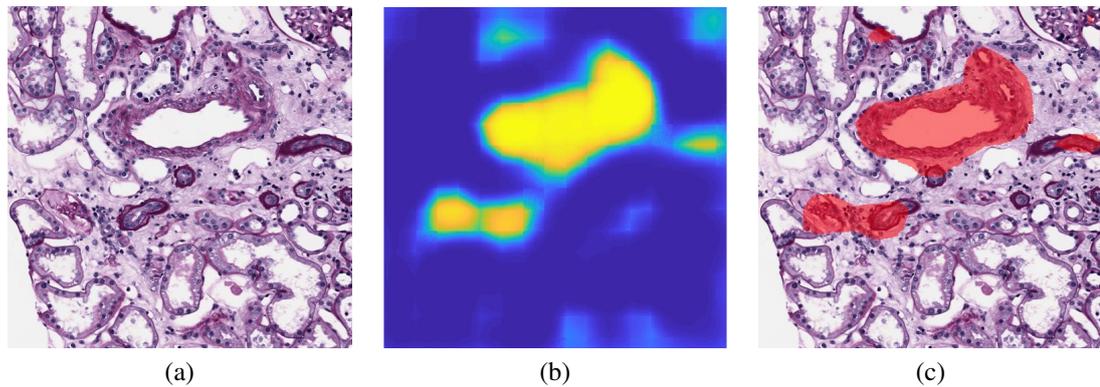


Figura 2.19: (a) immagine originale (b) softmax della classe 1 (c) risultato della segmentazione della rete

### 2.5.3 Postprocessing

I passi eseguiti sulla *softmax* relativa alla classe 1 per ottenere il risultato finale sono illustrate nella figura 2.20. La prima maschera dei vasi si ottiene applicando una soglia

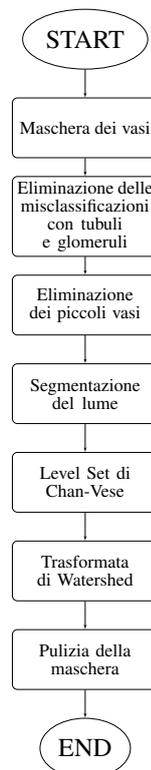


Figura 2.20: Pipeline del *postprocessing*.

restrittiva alla *softmax*, il quale porta l'informazione sulla probabilità di appartenenza alla classe 1 per ogni pixel. Come si può notare nella figura 2.19b, sul risultato della rete sono presenti degli errori di classificazione e per rimuoverle vengono considerate solo i pixel che hanno una probabilità maggiore del 70% di appartenere ai vasi.

Sulla maschera ottenuta si eseguono una serie di operatori morfologici (chiusura e *filling*) al fine di omogeneizzare il risultato del *thresholding*. In seguito la maschera dei vasi viene processata per eliminare i tubuli e glomeruli che sono stati identificati come vasi. Perciò viene eseguito un controllo di corrispondenza con le maschere ottenute dalla rete dei glomeruli e tubuli. Se un vaso ha una sovrapposizione minima del 30% rispetto ai glomeruli e tubuli identificati, significa che si è incorso ad un errore di segmentazione e pertanto quella regione viene rimossa dalla maschera. Infine vengono eliminati dalla maschera i vasi piccoli, ovvero quelli che hanno un'area inferiore a 8.900. In figura 2.21 è illustrato il risultato che si ottiene da queste eliminazioni: la maschera e la sua sovrapposizione all'immagine.

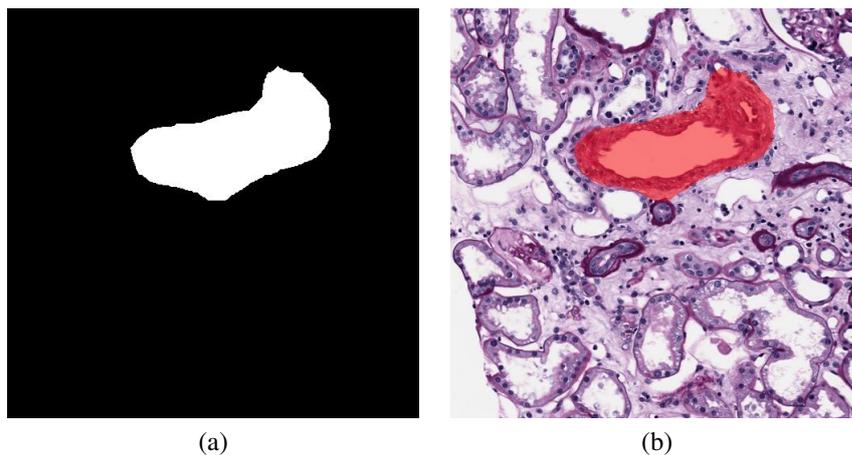


Figura 2.21: (a) Maschera dei vasi e (b) Risultato sull'immagine dopo l'eliminazione di errore di segmentazione e vasi piccoli

### Segmentazione del lume

Dopo aver ottenuto la maschera dei vasi, il passo successivo è la segmentazione del loro lume che è fondamentale per il calcolo dello score. In figura 2.22 è mostrato il diagramma a blocchi che riassume i processi utilizzati per ottenere la maschera del lume. Il primo passo è stato quello di applicare il filtro di Gabor per l'individuazione dei pi-



Figura 2.22: Pipeline per la segmentazione del lume.

xel bianchi all'interno dell'immagine, ovvero il lume renale. Questi è un filtro lineare e passa-banda applicato principalmente per l'analisi della tessitura in *image processing* [56]. Per ridurre i tempi computazionali sono state considerate otto diverse direzioni ( $\theta$ ) del filtro. Per ogni  $\theta$  si è ottenuto il corrispettivo *kernel* di Gabor che è stato utilizzato per filtrare l'immagine in scala di grigi eseguendo poi un *thresholding* sull'immagine filtrata con una soglia pari al 80% del suo valore massimo. La segmentazione del lume si ottiene dalla somma di queste otto maschere ottenute e il risultato di questa operazione è mostrato nella figura 2.23a. Prima di applicare il filtro è stata eseguita una *gamma correction* all'immagine in scala di grigi impostando una  $\gamma$  pari a 0.8. Successivamente nella maschera si segmentazione del lume vengono mantenute solo quelle componenti che hanno al più una sovrapposizione del 50% con la maschera dei vasi e successivamente vengono eseguite una serie di operatori morfologici al fine di renderla più omogenea ottenendo come risultato la figura 2.23b.

La maschera ottenuta presenta ancora degli elementi che non corrispondono al lume del vaso, dimostrando come la sola applicazione del filtro di Gabor non sia sufficiente. Perciò si esegue una eliminazione delle componenti di non interesse valutando l'intensità media dei pixel vicini al bordo del lume basandosi sull'ipotesi che il lume del vaso avrà

un'intensità media minore rispetto ad altre regioni poiché circondato dalla parete del vaso, il quale ha una colorazione più scura rispetto al resto del tessuto. Per ogni regione si esegue una serie di operazioni di dilatazione in modo tale da ottenere la corona del lume candidato, che localizza i pixel utilizzati per il calcolo della media sull'immagine in *grayscale*. Vengono mantenuti le regioni con un'intensità media minore di 0,45, in figura 2.23c è mostrato il risultato dell'operazione descritta.



Figura 2.23: Maschera del lume dopo (a) Filtro di Gabor (b) Sovrapposizione maschera dei vasi e operatori morfologici (c) Valutazione dell'intensità media sui bordi

Purtroppo per alcuni vasi la sola applicazione di questi metodi non hanno portato ad una segmentazione ottimale del lume. Di solito all'interno del vaso il lume non presenta una colorazione biancastra e omogenea a causa di alcune disomogeneità, quali la presenza del sangue in cui nelle immagini istologiche è rappresentato come una zona rosa e viola (figura 2.24a). Per perfezionare la segmentazione del lume viene applicata la tecnica del *Region Growing* utilizzando come punti iniziali (o *seed points*) il contorno del componente in questione. Il *Region Growing* viene applicato singolarmente ad ogni oggetto nella maschera. Il metodo è un processo iterativo dal quale i semi iniziano ad espandersi esplorando per ogni pixel l'insieme 8-connesso, ammettendo al lume soltanto i pixel che hanno un'intensità maggiore alla soglia  $T_2$ . Gli oggetti vengono fatti espandere sull'immagine in scala di grigi su cui è stata eseguita una modifica del contrasto. Sulla base di osservazioni sperimentali  $T_2$  è stata scelta pari a 0,5. L'iterazione continua fino a quando nell'insieme 8-connesso non sono presenti pixel che soddisfano la condizione precedentemente descritta oppure fino a quando non sono state eseguite 150 iterazioni (per ridurre i tempi computazionali). In seguito si effettuano degli operatori morfologici e si valuta l'espansione della regione. Se l'area è cresciuta di almeno 5 volte rispetto all'area del

lume prima dell'esecuzione del *Region Growing*, la componente viene eliminata dalla maschera del lume. Dunque il *Region Growing*, oltre a migliorare la segmentazione del lume, ha permesso di eliminare ulteriori oggetti che non appartengono ai vasi rilevati. In figura 2.24 si mostra un esempio dove l'applicazione di questa tecnica è stata fondamentale per ottenere una segmentazione del lume ottimale, con il colore giallo viene identificato il lume.

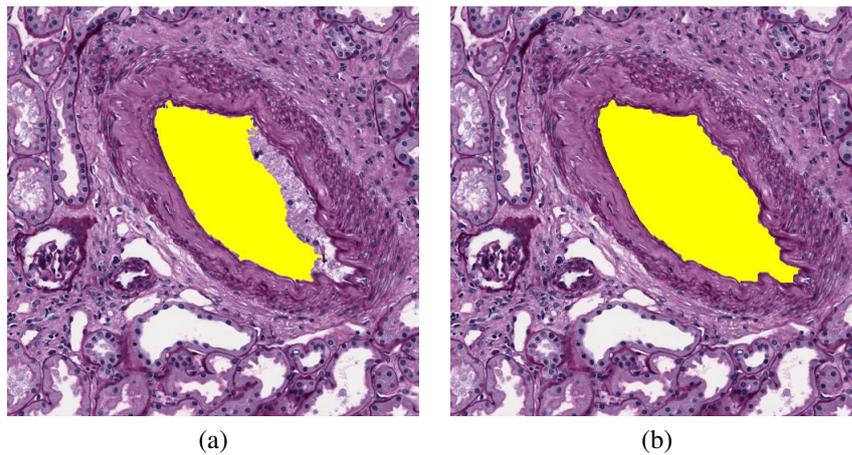


Figura 2.24: Segmentazione del lume (a) prima e (b) dopo il *Region Growing*

Infine si esegue un'ulteriore pulizia della maschera. La prima considerazione è stata quella di eliminare quelle regioni troppo vicine ad una componente più grande, supponendo che le componenti devono avere una certa distanza tra loro a causa della parete dei vasi. L'ultimo criterio utilizzato è stato quello di considerare singolarmente ogni oggetto nella maschera dei vasi, estraendo il/i lume/i appartenente/i a quell'oggetto. La componente può considerare più vasi che sono stati fusi dal risultato della rete, perciò il lume con l'area massima si considera appartenente ad un vaso mentre il resto viene ispezionato, valutando la loro area rispetto al lume più grande e la loro sottigliezza. Tutti i candidati lume che sono troppo piccoli o sottili vengono eliminati dalla maschera, ottenendo la segmentazione finale del lume dei vasi identificati. In figura 2.25 viene mostrato il risultato finale che si ottiene dopo la pulizia della maschera.

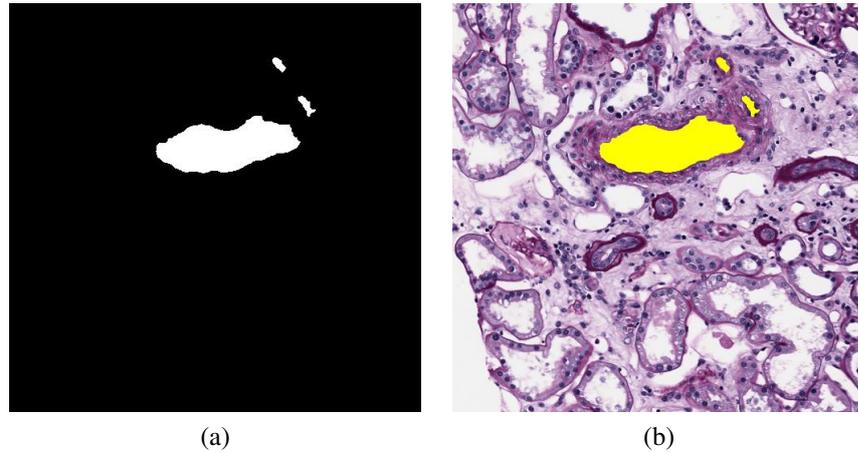


Figura 2.25: (a) Maschera del lume (b) Segmentazione del lume in giallo sull'immagine istologica

### Level-Set di Chan-Vese

Il risultato della rete ha quasi sempre portato ad una sovrastima della segmentazione del vaso. Questo ha giustificato l'uso del *Level-Set di Chan-Vese*, un contorno attivo che ha portato ad un peggioramento dal punto di vista del tempo computazionale (processo iterativo) ma è stato necessario per perfezionare la segmentazione dei vasi.

Il contorno attivo è un approccio tradizionale costituito da un modello deformabile che si adatta al contorno di un'immagine partendo da un profilo preesistente e minimizzando il funzionale di costo (minimizzazione energetica). I contorni attivi quindi sono curve planari deformabili sotto l'effetto di forze interne, dovute alla curva stessa, e forze esterne, dovute alle caratteristiche dell'immagine.

Il *Level-Set* è un modello deformabile di tipo geometrico nel quale il contorno attivo viene interpretato come l'intersezione tra il piano in cui giace l'immagine e un funzionale tridimensionale  $\phi$ . Il modello deformabile geometrico è un processo di adattamento di  $\phi$  sul piano dell'immagine in modo tale che il contorno attivo coincida con l'oggetto da segmentare. I matematici Tony F. Chan e Luminita A. Vese hanno sviluppato un *Level-Set* che individua gli oggetti senza aver necessariamente bisogno del gradiente dell'immagine che definisce i contorni degli oggetti [57].

Nel lavoro di tesi lo stato iniziale del contorno attivo è definito dalla maschera dei vasi. I contorni vengono fatti evolvere sull'immagine RGB in input, impostando i seguenti parametri:

- Numero massimo di iterazioni da eseguire nell'evoluzione della segmentazione = 50.
- *Contraction Bias* = 0,2. Parametro che indica la tendenza del contorno a crescere verso l'esterno o restringersi verso l'interno. In questo caso il valore positivo indica il restringimento del contorno.
- *Smooth Factor* = 1. Grado di regolarità dei contorni delle regioni segmentate.

### **Trasformata di Watershed**

Come già spiegato in precedenza, il risultato della rete in qualche circostanza porta a fondere due vasi vicini tra loro. La trasformata di Watershed è basata sul principio che ogni immagine in *grayscale* può essere considerata come una superficie topografica in cui si possono identificare tre punti:

- Punti appartenenti ad una regione di minimo.
- Punti in cui una “goccia d’acqua” scorrerebbe verso uno dei tali minimi (bacino di raccolta).
- Punti in cui la “goccia d’acqua” potrebbe scendere verso più di un minimo con le stesse probabilità (linee di separazione o *watershed's line*)

Il principio è trovare le linee di separazione dei vasi fusi prendendo in considerazione la maschera del lume trovato. Perciò la trasformata di *Watershed* è eseguita su un'immagine ottenuta applicando la *distance transform* alla maschera dei vasi. Questa operazione permette di ottenere un'immagine in cui per ogni pixel si calcola la distanza euclidea minima con la maschera del lume (utilizzato come immagine contenente i centroidi). La trasformata di Watershed permette dunque di risolvere il problema dato dalla rete dividendo i vasi fusi.

In figura 2.26a viene mostrato il risultato della *distance transform* sulla maschera dei vasi applicando come centroidi la segmentazione del lume in figura 2.25a. Come si può notare le linee di separazione sono ben chiare e vengono utilizzate per dividere la regione in tre oggetti ben distinti visto che sono stati identificati tre lumi. La figura 2.26b mostra la maschera dei vasi dopo aver eseguito la trasformata di Watershed.

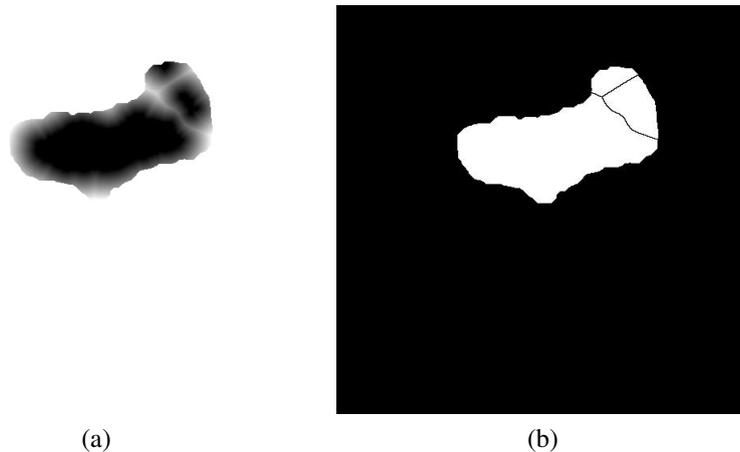


Figura 2.26: (a) *distance transform* (b) maschera dei vasi dopo la trasformata di Watershed

### **Pulizia della maschera**

L'ultimo passo è la pulizia della maschera dei vasi. Vengono eliminati dalla maschera del lume quelle regioni che non hanno almeno un'area pari a 700 pixel, poiché corrispondono al lume di un vaso piccolo. Successivamente viene eseguito un controllo sui vasi andando ad eliminare quelle regioni in cui il lume non è presente e le segmentazioni dei vasi non ottimali da parte della rete. Per quest'ultimo su ogni regione del vaso si elimina la zona del lume andando a valutare il numero di Eulero, un valore che indica se la regione presenta buchi. In questo caso il vaso viene mantenuto se:

- Presenta il lume nella corrispettiva maschera.
- Il suo numero di Eulero è pari a zero (1- il buco dato dal lume).

Infine si rimuovono per l'ultima volta gli oggetti piccoli con un'area inferiore a 8.900 dalla maschera dei vasi. Dal risultato di tutte queste operazioni si ottiene la maschera finale di segmentazione del vaso e del lume.

In figura 2.27 viene mostrato il risultato finale che si ottiene dopo la pulizia della maschera, e dunque dal *postprocessing*, in confronto alla segmentazione manuale visionata da un patologo esperto. In rosso viene indicato la segmentazione del vaso mentre in giallo viene mostrato il lume individuato.

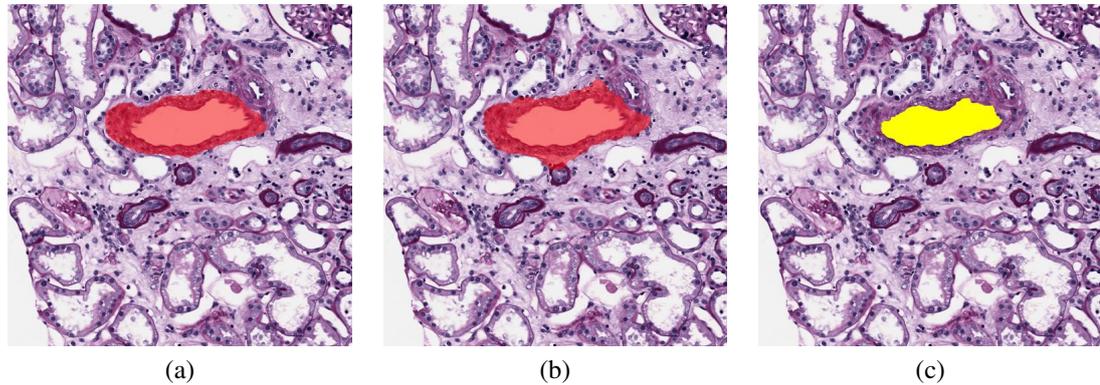


Figura 2.27: (a) Annotazione manuale del vaso (b) Segmentazione automatica del vaso (c) Segmentazione automatica del lume

## 2.6 Calcolo dello score di Karpinski

I metodi precedentemente descritti sono stati uniti con un precedente lavoro di tesi [42], al fine di sviluppare l'algoritmo per il calcolo automatico dello score di Karpinski. In input vengono caricate le immagini digitali PAS e tricromica del paziente alla massima risoluzione consentita (20x). Si esegue la segmentazione del tessuto renale sulle due immagini che vengono precedentemente sottodimensionate di un fattore 4 (risoluzione 5x), in modo da contenere i tempi computazionali. In seguito per ogni fetta di biopsia identificata si calcola la sua *bounding box*. La zona contenuta nella *bounding box* viene estratta sia dall'immagine che dalla maschera di segmentazione e sovradimensionata di un fattore 4, riportando l'immagine alla sua massima risoluzione (20x). Questo passaggio è fondamentale per ridurre drasticamente i tempi computazionali in quanto l'algoritmo non processa le intere immagini date in input ma solo la porzione di nostro interesse.

Successivamente alle regioni estratte si esegue un processo di normalizzazione della colorazione del tessuto, al fine di abbattere la variabilità del colore che può presentarsi nella preparazione del vetrino. Difatti durante il processo di colorazione la quantità di luce assorbita varia tra fette preparate in maniera differente, in base alla quantità relativa di colorante aggiunto e alla successiva conservazione e gestione del vetrino [45]. La figura 2.28 mostra graficamente l'estrazione delle regioni indicando in rosso le *bounding box* per ogni fetta di biopsia individuata sull'immagine e sulla maschera di segmentazione.

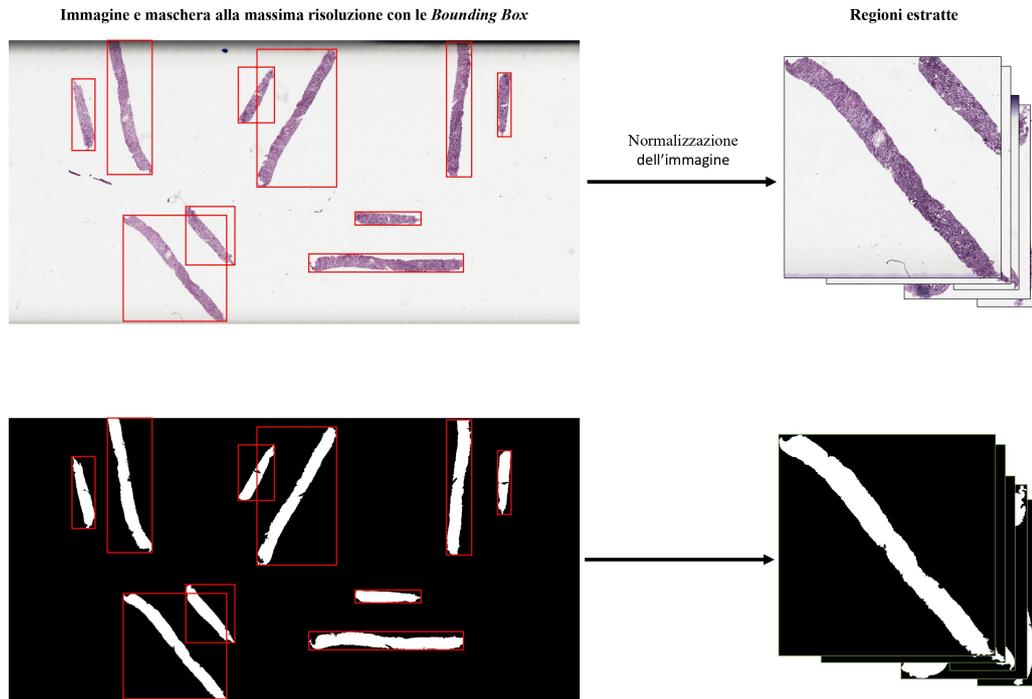


Figura 2.28: Estrazione delle regioni tramite le *Bounding Box*

Dopo questo processo le regioni estratte vengono sottodimensionate di un fattore 2 (risoluzione 10x) e sono pronte per essere processate al fine di ottenere i quattro punteggi che compongono lo score di Karpinski. Le immagini in PAS vengono utilizzate per il calcolo dello score: glomerulare, tubulare e vascolare; mentre le immagini in tricromica sono processate per il calcolo dello score interstiziale.

### 2.6.1 Score Glomerulare

Dalle regioni ottenute precedentemente si estraggono delle ulteriori sotto-regioni (dette *patch*) di dimensione 512x512. L'estrazione si esegue facendo scorrere un'area di forma quadrata (512x512) sull'immagine definendo i seguenti parametri:

- *Padding* (procedimento per cui l'immagine viene "gonfiata" di un supplementare bordo) = non presente.
- *Stride* (la quantità di passi che l'area esegue per muoversi sull'immagine) = 50%

con una sovrapposizione delle *patch* del 50%. La rete è critica ai bordi dell'immagine.

Sono state estratte solo le *patch* aventi almeno 1/20 dei pixel che appartengono al tessuto, informazione fornita dalla maschera di segmentazione estratta per la regione. Solo le *patch* che contengono tessuto vengono dunque processate in modo tale da diminuire ancora di più i tempi computazionali dell'algoritmo. L'estrazione delle *patch* è eseguita anche per il calcolo degli altri score nello stesso modo descritto.

Per ogni sotto-regione si esegue dunque la segmentazione e classificazione dei glomeruli [42] ottenendo come risultato le maschere di segmentazione per i glomeruli sani e sclerotici. A causa della presenza di una sovrapposizione, si estende il risultato del metodo sull'intera regione salvando gli esiti delle sotto-regioni su due nuove maschere (sani, sclerotici) nelle stesse zone da cui le *patch* sono state estratte. In questo modo i glomeruli non vengono contati più di una volta e si ottiene una chiara visualizzazione dell'effetto del metodo sull'intera fetta di biopsia (figura 2.29).

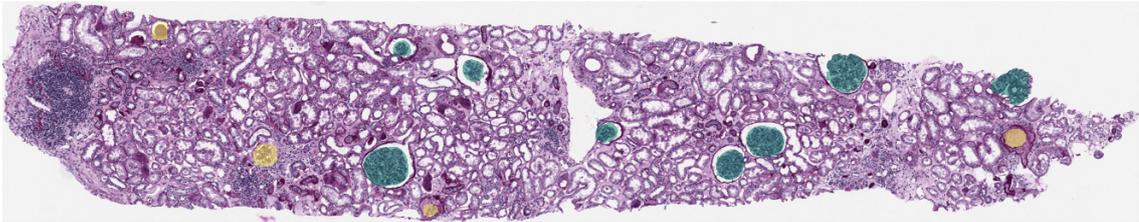


Figura 2.29: Segmentazione e individuazione dei glomeruli sull'intera fetta di biopsia. In verde sono indicati i glomeruli sani mentre in giallo gli sclerotici

Per ogni regione vengono contati il numero di glomeruli sclerotici e sani presenti ed il calcolo dello score glomerulare si esegue considerando la fetta di biopsia che contiene il maggior numero totale di glomeruli. Nel caso siano presenti più casi si considera la regione con più sclerotici, mettendosi quindi nel caso peggiore. La percentuale viene calcolata nel seguente modo:

$$Perc_{glomeruli} = \frac{N_{sclerotici}}{N_{sclerotici} + N_{sani}} \quad (2.13)$$

Dove  $N_{sclerotici}$  e  $N_{sani}$  indica il numero di glomeruli sani e sclerotici. L'assegnazione del punteggio morfometrico è eseguita secondo le indicazioni delle linee guida internazionali elencate nella tabella 1.2.

## 2.6.2 Score Tubulare

Per l'estrazione delle *patch* sono stati definiti i seguenti parametri:

- *Padding* = non presente.
- *Stride* = 75% con una sovrapposizione del 25%.

Per ogni sotto-regione considerata si esegue la segmentazione e classificazione dei tubuli [42] ottenendo come risultato le maschere di segmentazione per i tubuli sani e atrofici. A causa della presenza di una sovrapposizione, si estende il risultato del metodo sull'intera regione salvando gli esiti delle *patch* su due nuove maschere (sani, atrofici) nelle stesse zone da cui le sotto-regioni sono state estratte. In questo modo i tubuli non vengono valutati quantitativamente più di una volta e si ottiene una chiara visualizzazione dell'effetto del metodo sull'intera fetta di biopsia (figura 2.30). Per ogni regione si calcola l'area di

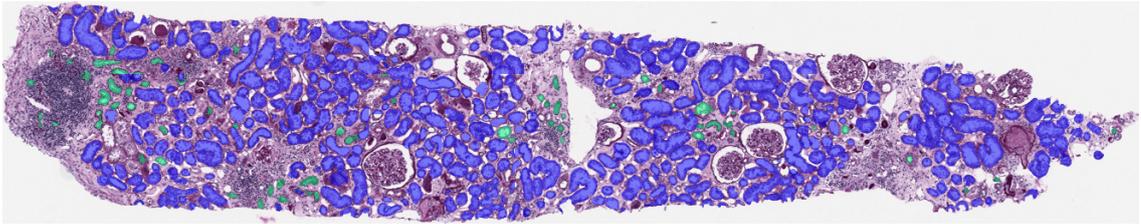


Figura 2.30: Segmentazione e individuazione dei tubuli sull'intera fetta di biopsia. In blu sono indicati i tubuli sani mentre in verde chiaro gli atrofici

tubuli atrofici e sani presenti ed lo score tubulare si esegue considerando tutte le fette di biopsia individuate sul vetrino del paziente. La percentuale viene calcolata nel seguente modo:

$$Perc_{tubuli} = \frac{A_{atrofici}}{A_{atrofici} + A_{sani}} \quad (2.14)$$

Dove  $A_{atrofici}$  e  $A_{sani}$  indica l'area totale di tubuli atrofici e sani ottenuta dalla somma delle aree calcolate per ogni fetta di biopsia. L'assegnazione del punteggio morfometrico è eseguita secondo le indicazioni delle linee guida internazionali elencate nella tabella 1.2.

### 2.6.3 Score Vascolare

Per l'estrazione delle *patch* sono stati definiti i seguenti parametri:

- *Padding* = non presente.
- *Stride* = 50% con una sovrapposizione del 50%. La rete utilizzata è critica ai bordi dell'immagine.

Per ogni sotto-regione considerata si esegue la segmentazione dei vasi con il metodo descritto nel capitolo 2.5. A causa della presenza di una sovrapposizione, si estende la segmentazione semantica della rete sull'intera regione sommando le *softmax* delle *patch* su una maschera nelle stesse zone da cui le sotto-regioni sono state estratte. In una matrice, di dimensione pari a quella regione, viene contato quante volte ogni pixel viene processato dalla rete. Dividendo la maschera in cui sono state sommate le *softmax* con la matrice si esegue in sostanza una operazione di media ottenendo la mappa di probabilità dei vasi per l'intera fetta di biopsia su cui si esegue il *postprocessing*. In figura 2.31 viene raffigurato il risultato della segmentazione dei vasi e lumi sull'intera fetta di biopsia. Per ogni vaso riconosciuto si misura il diametro del lume e lo spessore

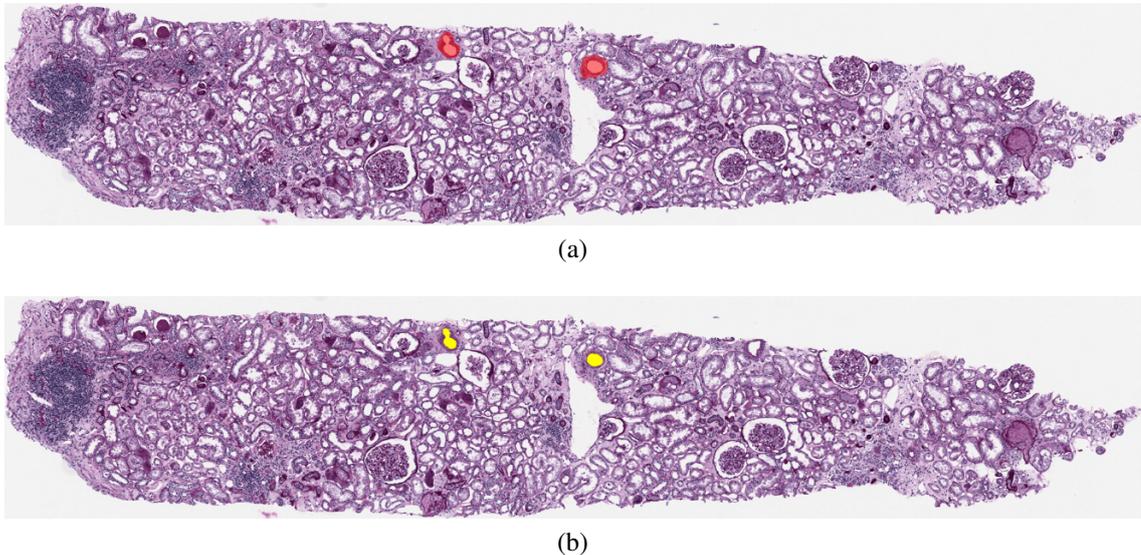


Figura 2.31: Segmentazione dei (a) vasi e (b) lumi sull'intera fetta di biopsia.

della parete, calcolando poi il loro rapporto:

$$d_{lume} = MinorAxisLength_{lume} \quad (2.15)$$

$$s_{parete} = \frac{MinorAxisLength_{vaso} - MinorAxisLength_{lume}}{2} \quad (2.16)$$

$$rapp_{vaso} = \frac{s_{parete}}{d_{lume}} \quad (2.17)$$

Dove  $MinorAxisLength_{vaso}$  e  $MinorAxisLength_{lume}$  sono l'asse minore del vaso e lume. Per ogni vaso si assegna uno score secondo le indicazioni delle linee guida internazionali elencate nella tabella 1.2. Lo score finale assegnato al paziente si ottiene calcolando la moda, cioè il punteggio più frequente fra i vasi.

#### 2.6.4 Score Interstiziale

Per l'estrazione delle *patch* sono stati definiti i seguenti parametri:

- *Padding* = non presente.
- *Stride* = 75% con una sovrapposizione del 25%

Per ogni sotto-regione considerata si esegue l'individuazione del tessuto connettivo fibroso con il metodo descritto nel capitolo 2.4 ottenendo come risultato le maschere di segmentazione per il canale del verde, rosso e residuo. A causa della presenza di una sovrapposizione, si estende il risultato del metodo sull'intera regione salvando gli esiti delle sotto-regioni su tre nuove maschere (verde, rosso, residuo) nelle stesse zone da cui le *patch* sono state estratte. In questo modo i pixel non vengono contati più di una volta e si ottiene una chiara visualizzazione dell'effetto del metodo sull'intera fetta di biopsia (figura 2.32). Per ogni regione si calcola l'area di tessuto verde, rosso e residuo presenti, mentre lo score interstiziale si esegue considerando tutte le fette di biopsia individuate sul vetrino del paziente. La percentuale di incremento viene calcolata nel seguente modo:

$$Inc_{interstizio} = \frac{A_{verde}}{A_{verde} + A_{rosso} + A_{residuo}} - offset \quad (2.18)$$

Dove  $A_{verde}$ ,  $A_{rosso}$  e  $A_{residuo}$  indicano l'area totale del verde, rosso e residuo sull'intero vetrino, ottenute dalla somma delle aree calcolate per ogni fetta di biopsia. L'*offset* invece rappresenta la quantità di fibrosi in una fetta di biopsia di riferimento su cui il patologo assegnerebbe uno score pari a zero. Dalle informazioni date dal patologo, è stato deciso di impostare l'*offset* al 20%. Nel caso in cui la percentuale di tessuto fibroso presente nella fetta biopsia sia minore dell'*offset*, l'incremento viene considerato pari allo 0%. Questo *bias* viene sottratto in modo tale da ottenere la percentuale di incremento

di fibrosi. L'assegnazione del punteggio morfometrico è eseguita secondo le indicazioni delle linee guida internazionali elencata nella tabella 1.2.

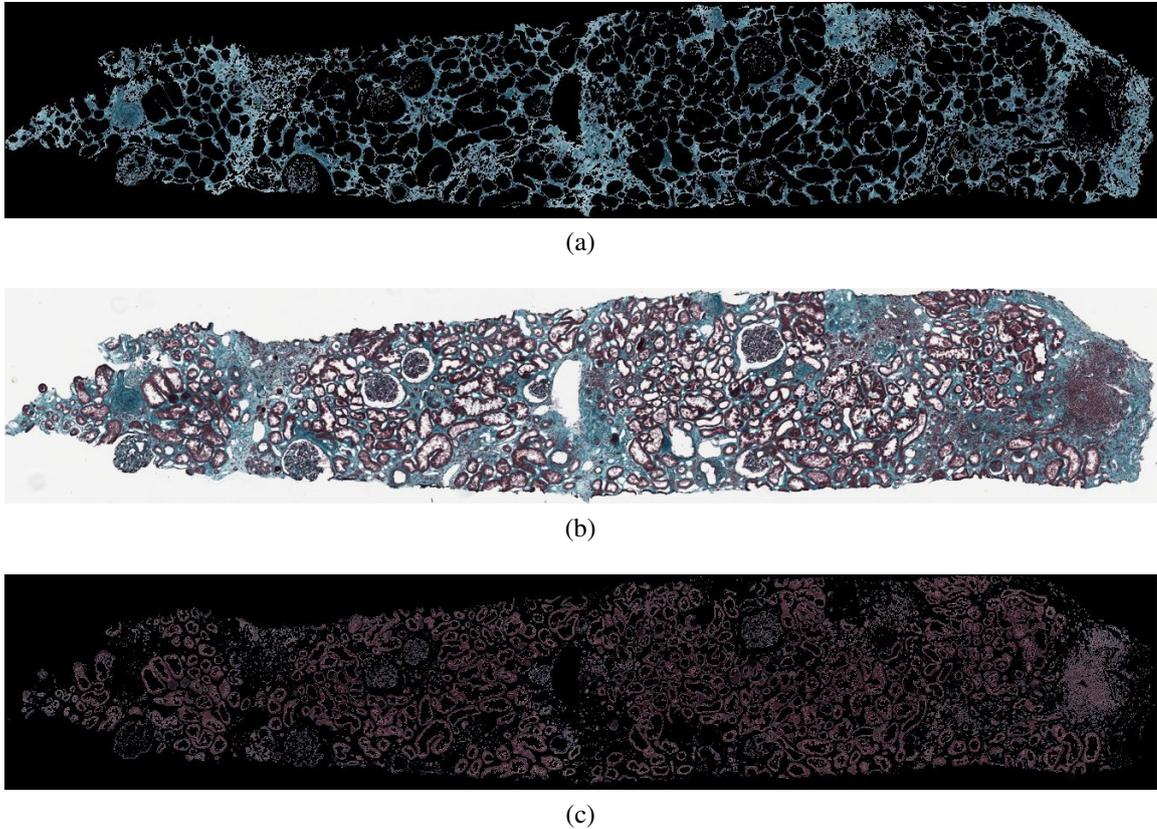


Figura 2.32: Individuazione del tessuto (a) verde e (c) rosso sull'intera (b) fetta di biopsia.

## 2.7 Metriche di validazione

Le metriche di validazione sono necessari per valutare la bontà dei metodi proposti. Le prestazioni sono valutate confrontando il risultato dell'algorithm proposto con le annotazioni manuali (dette *ground truth*) date, in questo caso, da un patologo esperto. La validazione è stata eseguita sugli algoritmi per le segmentazione dei vasi e del tessuto fibroso estraendo dal database immagini di dimensione 512x512. Infine, la validazione è eseguita sull'algorithm per il calcolo dello score di Karpinski. Le metriche proposte sono diverse per ogni algoritmo, dato che il loro scopo è differente.

### 2.7.1 Metriche di validazione dei vasi

Nel caso dell' algoritmo per la segmentazione dei vasi si valuta sia la prestazione della rete sia quella del *postprocessing* con lo scopo di mostrare il miglioramento dei risultati della rete. Il confronto viene eseguito tra la maschera di segmentazione automatica e le *ground truth* supervisionate da un anatomopatologo.

#### Validazione della rete

In questo caso viene effettuata una validazione *Pixel-based*, sia sul training e test set, per valutare la similarità e accuratezza tra le maschere automatiche e manuali. Nel caso di valutazioni mediche molto spesso per stimare le prestazioni di un classificatore viene utilizzata la tavola di contingenza (o *confusion matrix*), strumento che permette di visualizzare le *performance* di un classificatore. In questo caso viene utilizzata una *confusion matrix 2x2*, come mostrato nella tabella 2.2. I pixel con valore 1 indicano l'appartenenza al vaso, mentre se appartengono a tutto il resto dell'immagine assumono valore 0. Nella

Tabella 2.2: *Confusion matrix* per la classificazione *Pixel-based*.

		Classe predetta		Totale
		0	1	
Classe attuale	0	Veri Negativi (TN)	Falsi Positivi (FP)	TN+FP
	1	Falsi Negativi (FN)	Veri Positivi (TP)	FN+TP
Totale		TN+FN	FP+TP	N

validazione *Pixel-based* i valori nella tabella 2.2 assumono i seguenti significati:

- Veri Positivi (TP): pixel classificati correttamente come appartenenti ai vasi.
- Falsi Positivi (FP): pixel classificati erroneamente come appartenenti ai vasi.
- Falsi Negativi (FN): pixel classificati erroneamente come non appartenenti ai vasi.
- Veri Negativi (TN): pixel classificati correttamente come non appartenenti ai vasi.

Da questi valori sono state calcolate le seguenti metriche di validazione per ogni immagine:

- *Accuracy*: si valuta l'accuratezza dell'immagine

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + TN + FN + FP} \quad (2.19)$$

- *Precision* (o Valore Predittivo Positivo): dei pixel riconosciuti come classe 1 dall'algoritmo, misura la percentuale di quanti appartengano realmente a quella classe.

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (2.20)$$

- *Recall* (o Valore Predittivo Negativo): misura la percentuale di quanti pixel appartenenti realmente alla classe 1 sono correttamente riconosciuti dall'algoritmo.

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN} \quad (2.21)$$

- *F<sub>1</sub> score*: media armonica tra *Precision* e *Recall*.

$$F_1 = \frac{2}{Precision^{-1} + Recall^{-1}} = 2 \cdot \frac{Precision \cdot Recall}{Precision + Recall} \quad (2.22)$$

- *Jaccard Index*: noto anche come *Intersection over Union*, è un indice statistico utilizzato per valutare la similarità e diversità tra le segmentazioni automatiche e manuali.

$$Jaccard = \frac{TP}{TP + FN + FP} \quad (2.23)$$

### Validazione del postprocessing

Le maschere di segmentazione ottenute dal *postprocessing* sono state confrontate con le annotazioni manuali aggiornate. Difatti nelle *ground truth* sono stati eliminati i vasi piccoli con lo stesso criterio applicato nell'algoritmo, in modo tale che il confronto non presenti un *bias* a causa dei vasi non considerati intenzionalmente. Viene effettuata una validazione *Pixel-based* con le stesse metriche descritte precedentemente, e una validazione *Object-based* per valutare la classificazione al livello dell'intero vaso.

Per quest'ultimo i valori presenti nella tabella 2.2 assumono un diverso significato:

- Veri Positivi (TP): vaso presente sia nella maschera di segmentazione automatica e nel *ground truth*.

- Falsi Positivi (FP): vaso presente nella maschera di segmentazione automatica, ma non nel *ground truth*.
- Falsi Negativi (FN): vaso presente nel *ground truth*, ma non nella maschera di segmentazione automatica.

Nella validazione basata sugli oggetti i Veri Negativi (TN) non offrono ulteriori informazioni utili poiché si riferiscono a tutte le aree che non appartengono ai vasi, quindi tutto il resto dell'immagine. Un vaso nella segmentazione automatica viene considerato Vero Positivo se esiste un vaso corrispondente nel *ground truth* e che la loro sovrapposizione sia al più maggiore del 50% rispetto all'area del vaso trovato nella maschera automatica o nell'annotazione manuale. Un vaso nella segmentazione automatica viene considerato Falso Negativo se esiste un vaso corrispondente nel *ground truth* e che la loro sovrapposizione sia minore del 50% rispetto all'area del vaso trovato nella maschera automatica o nell'annotazione manuale. Per questi valori identificati sono stati calcolati le seguenti metriche: *Precision*, *Recall*, *F<sub>1</sub> score* e *Jaccard Index*.

## 2.7.2 Metriche di validazione per il grado di fibrosi

Le prestazioni dell'algorithmo per l'individuazione del tessuto connettivo fibroso sono state valutate andando a confrontare la percentuale di fibrosi (formula 2.18) automatica con la valutazione manuale di un anatomopatologo. La validazione si esegue calcolando l'errore assoluto per tutte le 300 immagini estratte, riportando la media e deviazione standard. Questa metrica è utile per valutare se la valutazione automatica è in *agreement* con un patologo esperto. L'errore assoluto per un'immagine *i*-esima è calcolato come segue:

$$EA_i = |P_{manuale} - P_{automatica}| \quad (2.24)$$

Inoltre è stata eseguita un'ulteriore valutazione quantitativa confrontando i punteggi morfometrici automatici e manuali dati per ogni immagine al fine di valutare l'accuratezza dell'algorithmo proposto, ovvero se lo score automatico coincide con quello di un patologo esperto:

$$Accuracy = \frac{N_{automatica=manuale}}{N_{immagini}} \quad (2.25)$$

Dove  $N_{automatica=manuale}$  indica il numero di volte che il punteggio automatico e manuale coincidono, mentre  $N_{immagini}$  è il numero di immagini valutate (in questo caso 300).

Infine viene effettuata una validazione *Pixel-based* per la maschera del tessuto fibrotico (verde) con le stesse metriche descritte precedentemente: *Precision*, *Recall*, *F<sub>1</sub> score* e *Jaccard Index*.

### 2.7.3 Metriche di validazione per lo score

I punteggi delle quattro strutture (glomeruli, tubuli, interstizio, vasi) ottenuti dall'algoritmo sull'intero dataset sono stati confrontati con le valutazioni morfometriche stabilite da un patologo esperto.

Viene calcolato per ogni struttura le seguenti metriche:

- Accuratezza: è un indicatore di *agreement* tra la valutazione automatica e manuale.

$$Accuracy = \frac{N_{automatica=manuale}}{N_{pazienti}} \quad (2.26)$$

Dove  $N_{automatica=manuale}$  indica il numero di volte che il punteggio automatico e manuale coincidono, mentre  $N_{pazienti}$  è il numero di pazienti su cui lo score è stato calcolato.

- Errore relativo: utile per valutare un'eventuale sovrastima o sottostima da parte dell'algoritmo.

$$ER = Score_{manuali} - Score_{automatici} \quad (2.27)$$

- Errore assoluto: utile per valutare se il calcolo dello score da parte dell'algoritmo automatico è in *agreement* rispetto alla valutazione di un anatomopatologo

$$EA = |Score_{manuali} - Score_{automatici}| \quad (2.28)$$

## Capitolo 3

# Risultati

In questo capitolo vengono mostrati i risultati dell’algoritmo e dei metodi descritti nel capitolo 2. La valutazione quantitativa per la segmentazione dei vasi e l’individuazione del grado di fibrosi viene eseguita usando le metriche descritte nel paragrafo 2.7. Successivamente vengono analizzate le prestazioni dell’algoritmo nel calcolo dello score di Karpinski sui 10 pazienti nel dataset, mettendole a confronto con le valutazioni di un patologo esperto. Si conclude poi con un breve commento dei risultati ottenuti.

### 3.1 Validazione segmentazione vasi

Le prestazioni della rete nella segmentazione dei vasi viene valutata sia sul *training* che sul *test set*. In seguito vengono valutate le prestazioni dopo l’esecuzione del *postprocessing* per comprendere se è presente un miglioramento della segmentazione processando ulteriormente il risultato della rete.

#### 3.1.1 Risultati dell’allenamento della CNN

Dopo aver scelto il metodo di *transfer learning* adeguato, il passo successivo è eseguire un addestramento supervisionato alla rete neurale convoluzionale per la segmentazione semantica. In figura 3.1 è mostrato l’andamento dell’apprendimento che si ferma al raggiungimento del numero massimo di epoche imposte, ovvero 100. L’addestramento mostra la curva di perdita (o *loss*), una misura della bontà del risultato della rete rispetto alle annotazioni manuali, e la curva di accuratezza. Per entrambi viene mostrato l’andamento sia del *training set* che del *validation set*. Si può notare che le prestazioni tra il

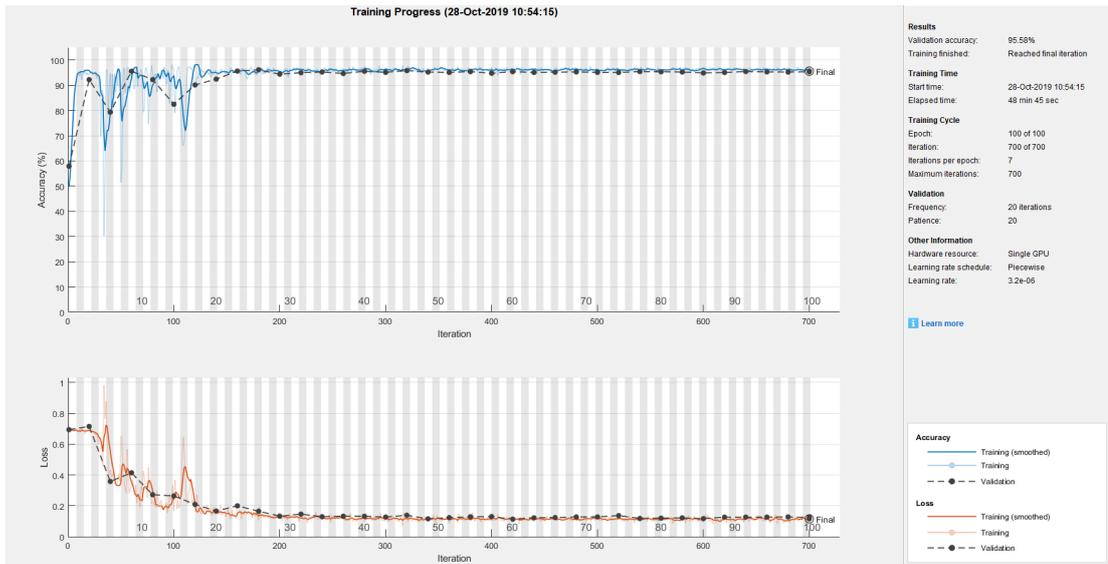


Figura 3.1: Andamento dell'allenamento della AlexNet per la segmentazione semantica dei vasi.

*training* e *validation* durante il l'addestramento sono molto simili, escludendo la presenza di *overfitting*.

L'accuratezza finale della rete è al 95,58%, mentre la perdita decresce durante l'allenamento raggiungendo un valore tra 0 e 0,2. Entrambe le metriche sono state valutate sul *validation set*.

I risultati ottenuti dalla rete vengono valutati quantitativamente sia sul *training set* che sul *test set*, mantenendoli separati. Ciò permette di valutare se la rete presenta un valore di *bias* alto, ovvero che le prestazioni non sono buone sul *training set*, e/o un valore alto di varianza, cioè i risultati ottenuti sul *test set* sono peggiori rispetto al *training set* (la rete non è capace a generalizzare).

### 3.1.2 Risultati sul Training set

Vengono mostrati in seguito i risultati delle metriche indicate nel capitolo 2.7.1, ovvero una validazione *Pixel-based*. In figura 3.2 viene mostrato l'accuratezza per ogni immagine nel *training set*. L'accuratezza media di segmentazione è di  $94,37 \pm 4,33\%$ , mostrando un'identificazione accurata in tutte le immagini. Tuttavia nella figura 3.2 si può notare che per alcuni campioni si è arrivato ad avere un'accuratezza minore del 80%. In figura

3.3 vengono mostrati, utilizzando una raffigurazione grafica *boxplot*, le seguenti metriche: *Precision*, *Recall*, *F<sub>1</sub> score* e *Jaccard Index*.

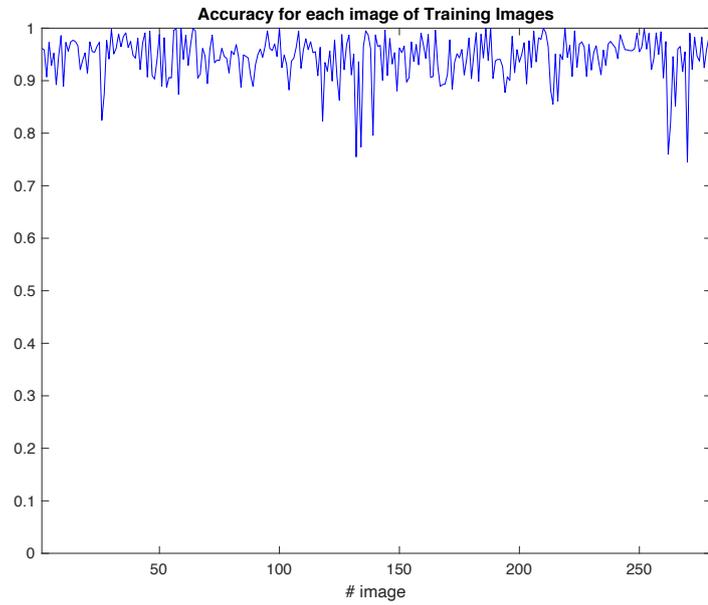


Figura 3.2: Andamento dell'accuratezza nelle immagini di *training set*

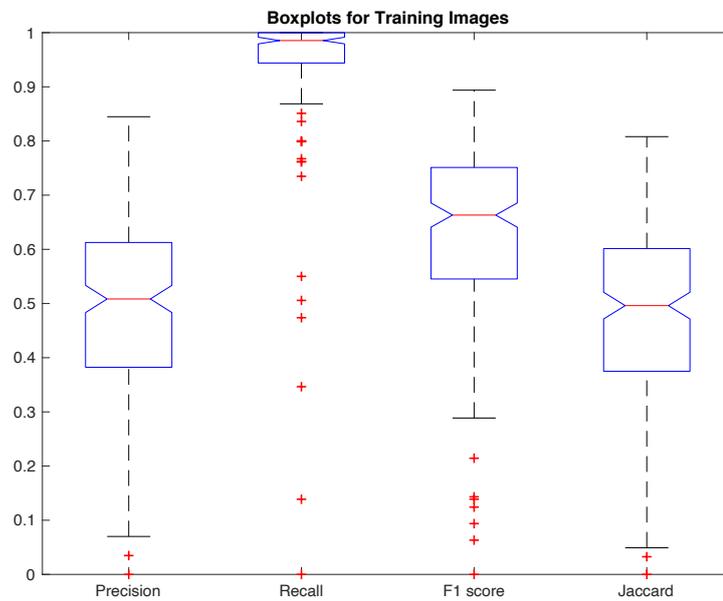


Figura 3.3: *Boxplot* delle metriche nelle immagini di *training set*

Sul *training set* la rete, escludendo alcuni *outlier*, ha una distribuzione di valori alti per la *Recall* grazie ai pochi falsi negativi identificati nelle immagini. Ciò nonostante la rete è debole da un punto di vista dei falsi positivi identificati, come si può vedere dal *boxplot* della *Precision*. Inoltre questo risultato ha portato ad avere valori bassi nella *F<sub>1</sub> score* e nel *Jaccard Index*, indicando quindi una scarsa similarità delle maschere automatiche con le annotazioni manuali. Nella tabella 3.1 sono elencati i valori medi e le deviazioni standard per ogni metrica.

Tabella 3.1: Risultati delle metriche per la classificazione *Pixel-based*.

Precision	Recall	F <sub>1</sub> score	Jaccard
49,66 ± 16,72%	94,94 ± 11,95%	63,68 ± 16,61%	48,68 ± 16,44%

### 3.1.3 Risultati sul Test set

In figura 3.4 viene mostrato l'accuratezza per ogni immagine nel *test set*. L'accuratezza media di segmentazione è di  $94,75 \pm 5,13\%$ , mostrando un'identificazione accurata in tutte le immagini. In più il valore di accuratezza media è simile a quella ottenuta dal *training set* dimostrando che la rete è in grado di generalizzare.



Figura 3.4: Andamento dell'accuratezza nelle immagini di *test set*

Tuttavia nella figura 3.4 si può notare che per alcuni campioni si è arrivato ad avere un'accuratezza minore del 90%. In figura 3.5 vengono mostrati, utilizzando una raffigurazione grafica *boxplot*, le seguenti metriche: *Precision*, *Recall*, *F<sub>1</sub> score* e *Jaccard Index*. Sul *test set* la rete, escludendo alcuni *outlier*, ha una distribuzione di valori alti per la *Recall* grazie ai pochi falsi negativi identificati nelle immagini. Ciò nonostante la rete è debole nell'abbondante identificazione di falsi positivi, come si può vedere dal *boxplot* della *Precision*. Inoltre questo ha portato ad avere valori bassi nella *F<sub>1</sub> score* e nel *Jaccard Index*, indicando quindi una scarsa similarità delle maschere automatiche con le annotazioni manuali. Nella tabella 3.2 sono elencati i valori medi e le deviazioni standard per ogni metrica. Dalla tabella 3.2 e 3.1 si può osservare che i risultati sono molto simili, dunque la rete non mostra varianza.

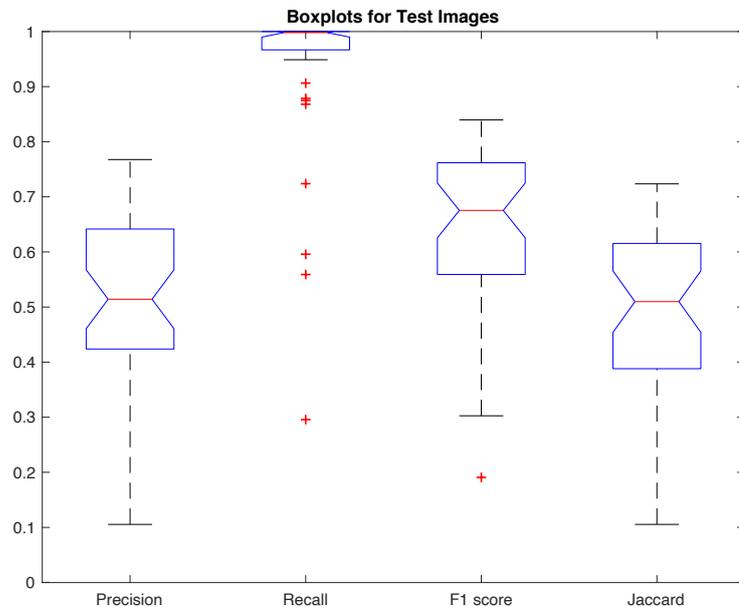


Figura 3.5: *Boxplot* delle metriche nelle immagini di *test set*

Tabella 3.2: Risultati delle metriche per la classificazione *Pixel-based*.

Precision	Recall	F <sub>1</sub> score	Jaccard
53,52 ± 15,67%	94,2 ± 11,44%	66,83 ± 15,35%	51,93 ± 15,8%

### 3.1.4 Risultati sul postprocessing

Prima di esporre le prestazioni del *postprocessing*, in figura 3.6 viene mostrato un esempio di segmentazione manuale e automatica (indicate in rosso) su cui sono state valutate le *performance* della segmentazione dei vasi.

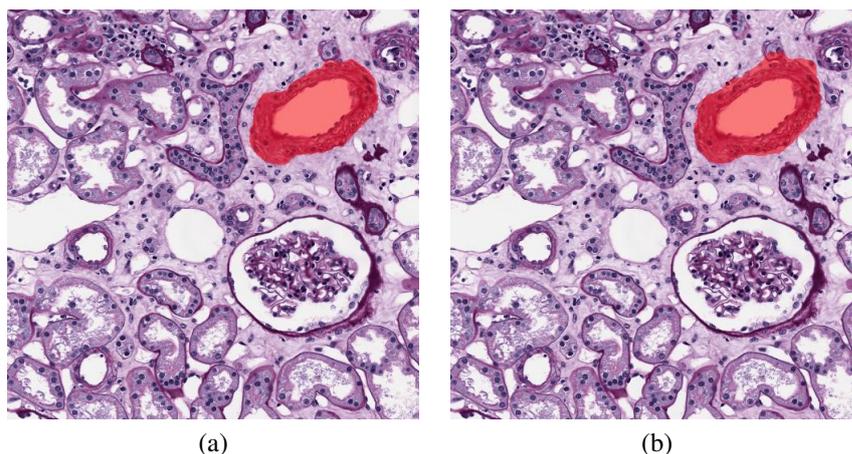


Figura 3.6: Confronto segmentazione (a) manuale e (b) automatica

Vengono mostrati in seguito i risultati delle metriche indicate nel capitolo 2.7.1, ovvero una validazione *Pixel-based* e *Object-based*.

#### Validazione Pixel-based

In figura 3.7 viene mostrato l'accuratezza per ogni immagine estratta per la validazione. L'accuratezza media di segmentazione è di  $98,63 \pm 2,27\%$ , mostrando un'identificazione accurata in tutte le immagini. L'accuratezza media è migliorata in confronto ai risultati della rete. Tuttavia nella figura 3.7 si può notare che per alcuni campioni si è arrivato ad avere un'accuratezza minore del 90%. In figura 3.8 vengono mostrate le seguenti metriche utilizzando una raffigurazione grafica *boxplot*: *Precision*, *Recall*,  $F_1$  score e *Jaccard Index*. Dopo l'applicazione del *postprocessing* i risultati sono migliorati in confronto agli esiti della rete, soprattutto per la *Recall* e conseguentemente la  $F_1$  score. Tuttavia nel caso della *Precision* i risultati sono leggermente peggiorati mantenendo comunque ottime prestazioni. La similarità tra le maschere automatiche e le annotazioni manuali è significativamente aumentata, di fatti la distribuzione dei valori della *Jaccard Index* è

più alta rispetto alla rete. Nella tabella 3.3 sono elencati i valori medi e le deviazioni standard per ogni metrica che conferma le considerazioni dette precedentemente.

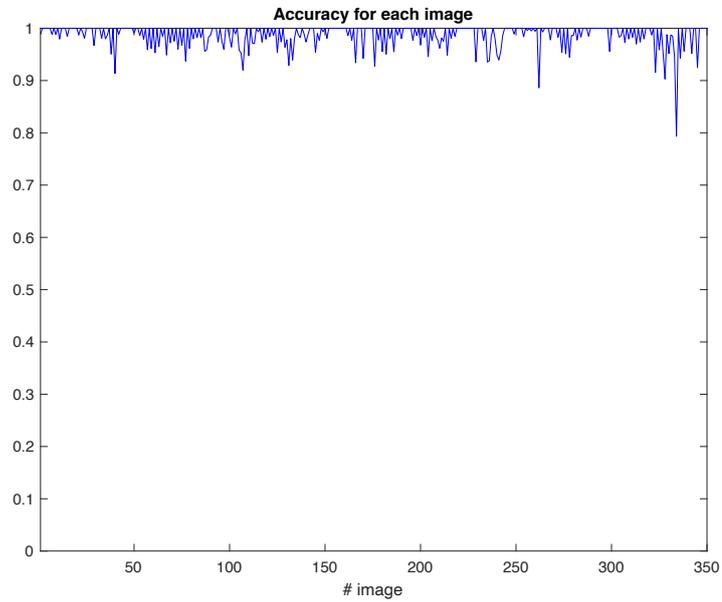


Figura 3.7: Andamento dell'accuratezza nelle immagini estratte

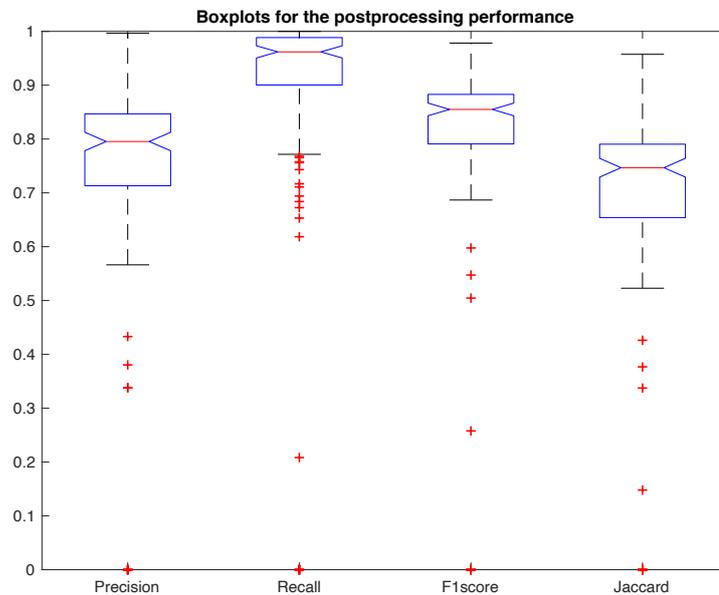


Figura 3.8: *Boxplot* delle metriche nelle immagini estratte

Tabella 3.3: Risultati delle metriche per la classificazione *Pixel-based*.

Precision	Recall	F <sub>1</sub> score	Jaccard
74,33 ± 20,10%	88,36 ± 22,08%	79,91 ± 19,72%	69,59 ± 19,00%

### Validazione Object-based

Nelle maschere di segmentazione manuale sono state annotate 166 vasi di grandi dimensioni. Nella tabella 3.4 sono riportati i risultati della classificazione confrontando le maschere di segmentazione date dal *postprocessing* con le annotazioni manuali aggiornate. Nella figura 3.9 sono raffigurate le seguenti metriche tramite la raffigurazione *bar diagram*: *Precision*, *Recall*, *F<sub>1</sub> score* e *Jaccard Index*. L’algoritmo sviluppato ha un valore minore di *Recall* rispetto alla *Precision*, infatti presenta più falsi negativi che positivi. L’algoritmo di segmentazione dei vasi mostra comunque delle ottime prestazioni visto che le metriche di validazione calcolate sono tutte maggiori del 90%. Questo dimostra che l’algoritmo è molto preciso nella individuazione di vasi grandi.

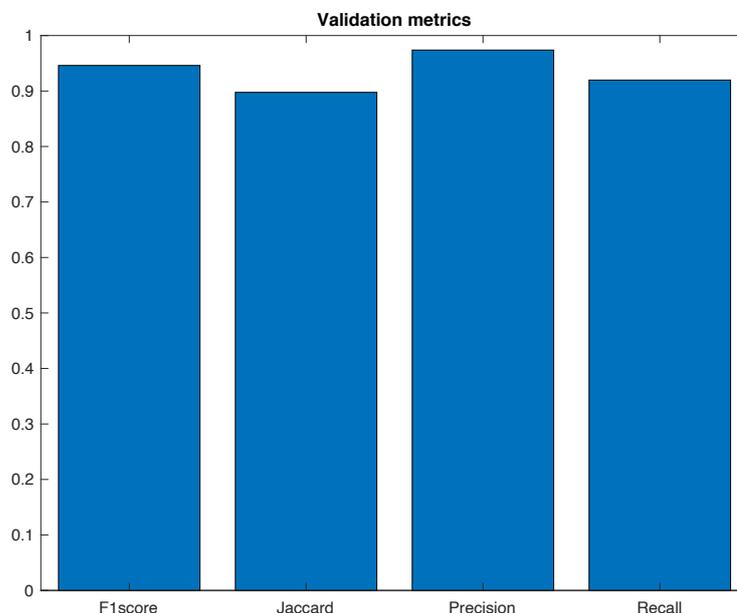
Figura 3.9: *Bar diagram* delle metriche per la validazione *Object-based*

Tabella 3.4: Risultati delle metriche per la validazione *Object-based*.

Veri Positivi	Falsi Positivi	Falsi Negativi
149	4	13

### 3.2 Validazione grado di fibrosi

Prima di esporre le prestazioni del metodo euristico, in figura 3.10 viene mostrata un'immagine di riferimento e un esempio di segmentazione manuale e automatica del canale verde su cui sono state valutate le *performance* dell'individuazione del tessuto connettivo fibroso.

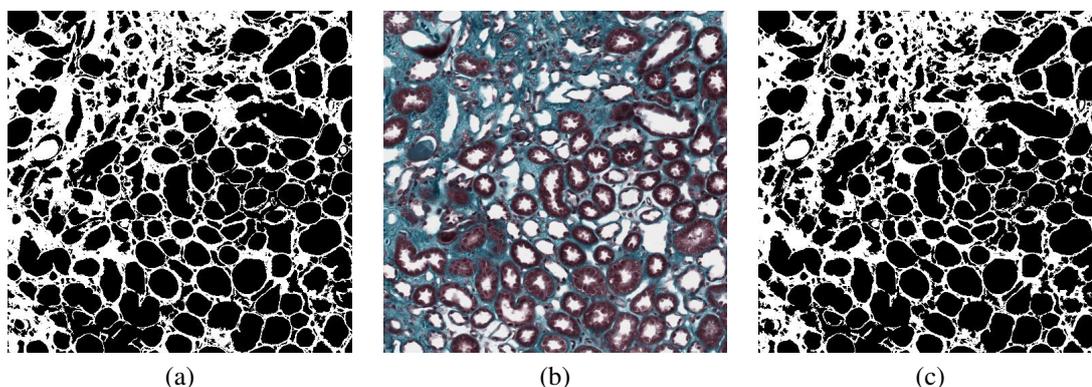


Figura 3.10: Confronto segmentazione manuale e automatica: (a) manuale (b) immagine originale (c) automatica

Per una corretta valutazione dell'incremento del grado di fibrosi nello score di Karpinski è fondamentale ottenere una segmentazione del tessuto connettivo fibroso concorde con le annotazioni manuali di un patologo esperto. Sulla maschera automatica del verde quindi è stata eseguita una validazione *Pixel-based*. In figura 3.11 viene mostrata l'accuratezza per ogni immagine in tricromica estratta per la validazione. L'accuratezza media di segmentazione è di  $91,37 \pm 2,01\%$  e tutte le immagini, come si può notare nella figura 3.11 hanno un'accuratezza maggiore del 85%. In figura 3.12 vengono mostrati le seguenti metriche utilizzando una rappresentazione grafica *boxplot*: *Precision*, *Recall*, *F<sub>1</sub> score*, *Jaccard Index*. Le distribuzioni della *Precision* e *Recall* dimostrano che dal metodo euristico proposto si ottiene una individuazione del tessuto connettivo fibroso in maniera accurata, con la presenza di pochi falsi positivi e negativi nelle immagini.

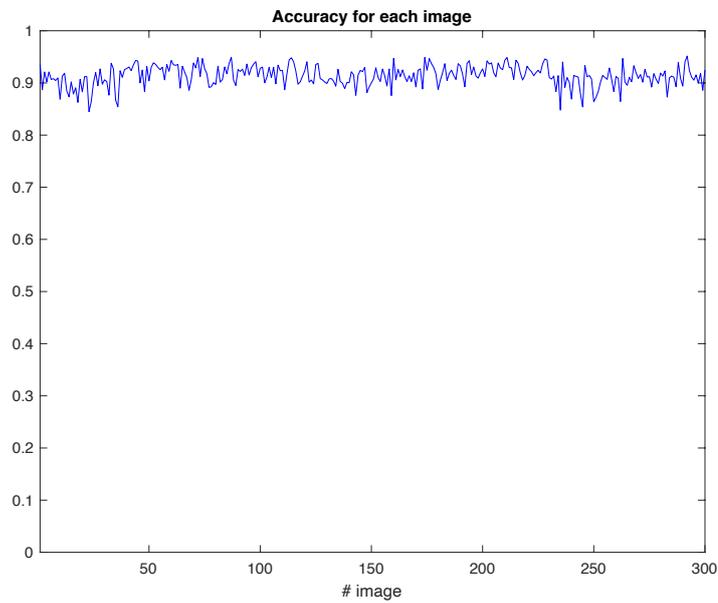


Figura 3.11: Andamento dell'accuratezza nelle immagini in tricromica estratte.

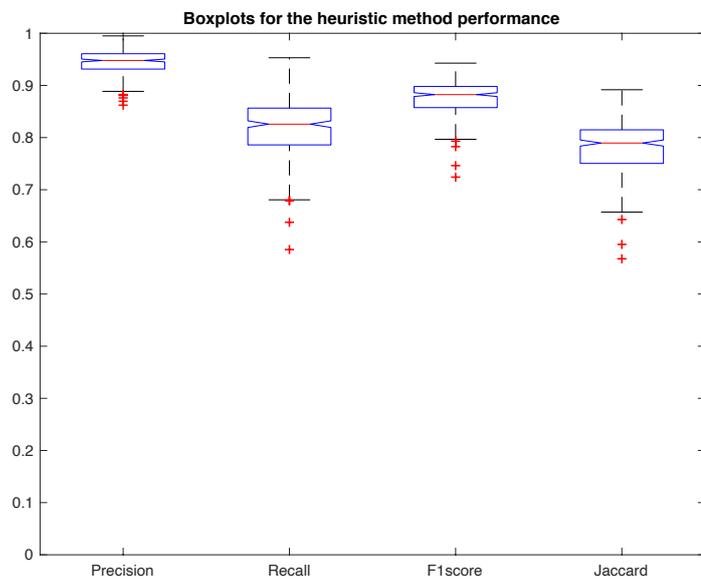


Figura 3.12: *Boxplot* delle metriche nelle immagini in tricromica estratte.

Inoltre si dimostra che con questo metodo si ottiene una buona similarità tra le maschere automatiche e manuali, come si può notare dalla distribuzione del *Jaccard Index* nella

figura 3.12. Nella tabella 3.5 sono elencati i valori medi e le deviazioni standard per ogni metrica.

Tabella 3.5: Risultati delle metriche per la classificazione *Pixel-based* nelle immagini in tricromica.

Precision	Recall	F <sub>1</sub> score	Jaccard
94,58 ± 2,32%	81,81 ± 5,36%	87,62 ± 3,27%	78,11 ± 5,07%

Oltre al confronto tra le maschere automatiche e manuali, la bontà dell’algoritmo è stata ulteriormente valutata confrontando le percentuali di incremento del grado di fibrosi calcolate automaticamente con le valutazioni di un patologo esperto. In figura 3.13 viene mostrato l’istogramma degli errori assoluti in cui si può notare che la distribuzione maggiore degli errori è presente tra il 2 e 8%. L’errore medio è pari a  $5,33 \pm 2,98\%$ . Sebbene è stata dimostrata una buona accuratezza nell’individuazione del tessuto, è comunque presente un *bias* tra il calcolo automatico e la valutazione manuale della percentuale. Questo è dovuto al fatto che il patologo non calcola l’incremento della fibrosi in maniera precisa ma esegue una valutazione quantitativa che dipende fortemente dalla sua esperienza e dalla sua percezione visiva.

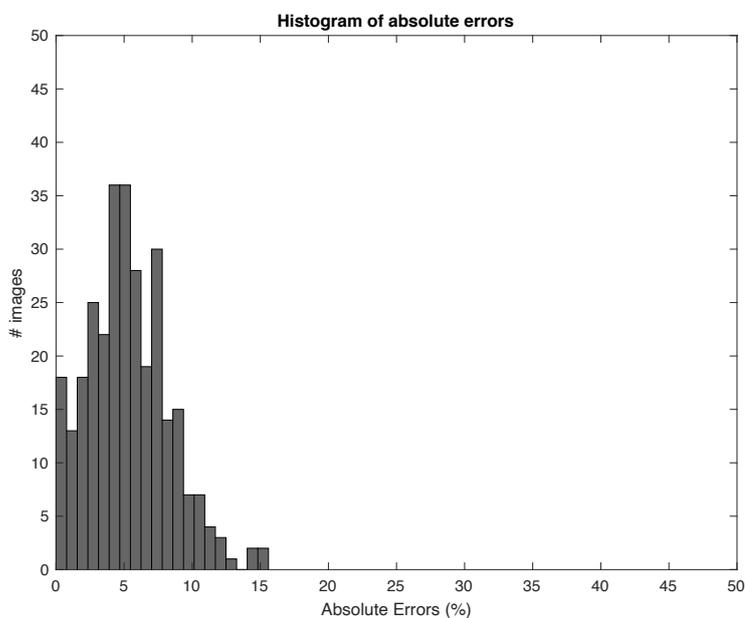


Figura 3.13: Iistogramma degli errori assoluti.

Infine per ogni percentuale è stato assegnato un punteggio interstiziale secondo le linee guida nella tabella 1.2. Il confronto tra i punteggi morfometrici automatici e manuali ha portato ad un'accuratezza di assegnazione pari al 81%. Difatti nell'assegnazione dello score interstiziale, le soglie imposte dalle linee guide internazionali (0%, 20% e 50%) consentono di avere un'ampia tolleranza tra i punteggi riducendo così il *bias* presente tra la valutazione automatica e manuale.

### 3.3 Validazione dello score di Karpinski

Vengono mostrati in seguito i risultati delle metriche indicate nel capitolo 2.7.3, con lo scopo di valutare se gli score automatici calcolati dall'algorithm coincidono con le valutazioni di un patologo esperto. Le metriche sono state calcolate utilizzando gli score mostrati nella tabella 3.6. In figura 3.14 vengono mostrati i valori di accuratezza sui

Tabella 3.6: Valutazione automatica e manuale dello score di Karpinski.

ID	Glomerular score		Tubular score		Interstitial score		Vascular score	
	<i>Auto</i>	<i>Manual</i>	<i>Auto</i>	<i>Manual</i>	<i>Auto</i>	<i>Manual</i>	<i>Auto</i>	<i>Manual</i>
Paz1	1	2	1	2	2	2	1	1
Paz2	1	1	1	1	2	2	1	1
Paz3	1	1	1	1	2	2	1	1
Paz4	1	1	1	1	2	2	1	1
Paz5	2	2	1	2	2	2	2	2
Paz6	1	1	1	1	2	2	1	1
Paz7	1	1	1	1	2	2	3	2
Paz8	1	1	1	1	2	1	1	1
Paz9	1	1	1	1	2	1	1	1
Paz10	1	1	1	1	2	2	3	3

quattro punteggi morfometrici ottenuti sull'intero dataset. Per lo score glomerulare e vascolare la valutazione è concorde con quella dell'anatomopatologo 9 volte su 10, ottenendo quindi un'accuratezza del 90%.

Mentre per lo score tubulare e interstiziale la valutazione è concorde con quella dell'anatomopatologo 8 volte su 10, come è dimostrato dall'accuratezza pari a 80%. In tabella 3.7 vengono elencati gli errori relativi per comprendere eventuali sottostime e sovrastime da parte dell'algorithm.

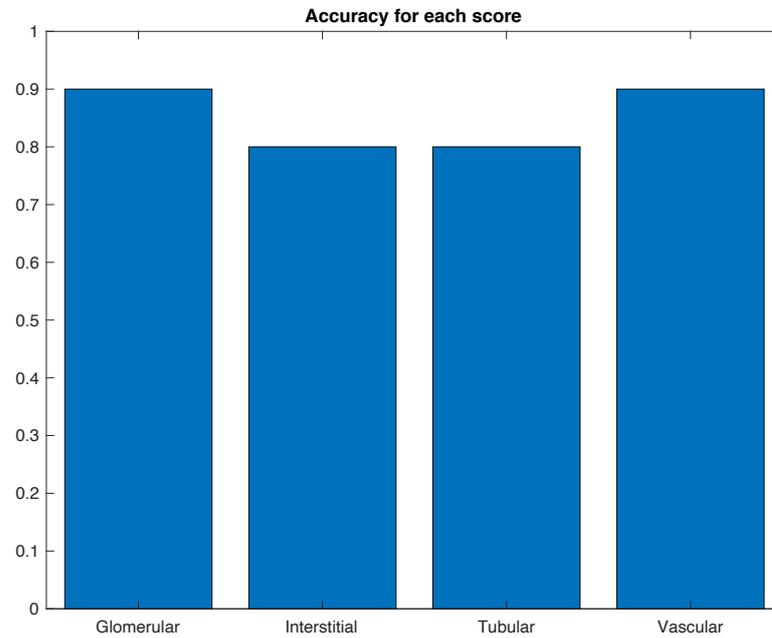


Figura 3.14: *Bar diagram* dell'accuratezza per la validazione dello score di Karpinski

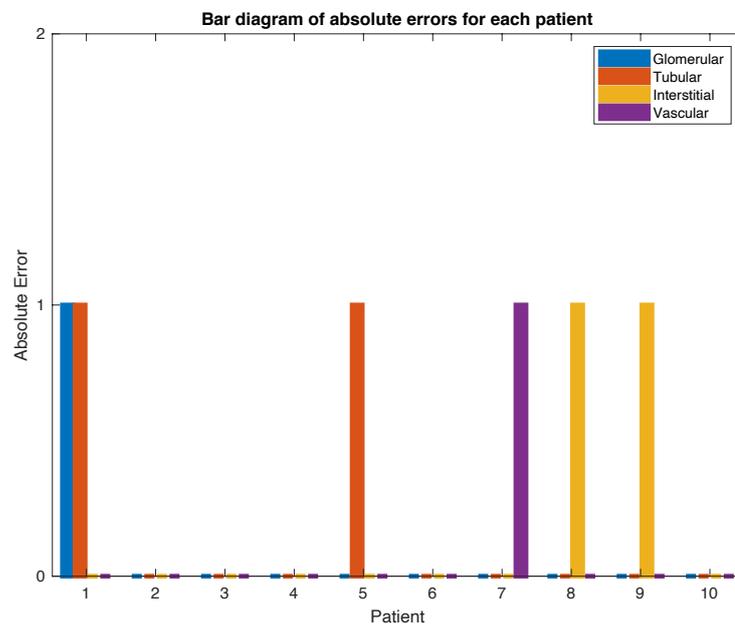


Figura 3.15: *Bar diagram* degli errori assoluti per la validazione dello score di Karpinski

Nel caso dello score glomerulare e tubulare si osserva una sottostima da parte dell’algoritmo. L’errore nel caso del glomerulo si presenta una volta mentre nel caso dei tubuli la sottostima si verifica due volte. Nel caso dello score interstiziale e vascolare si osserva una sovrastima da parte dell’algoritmo. L’errore nel caso dei vasi si presenta una volta mentre nel caso del grado di fibrosi la sottostima si verifica due volte. Nella figura 3.15

Tabella 3.7: Errori relativi per ogni paziente sui quattro punteggi dello score di Karpinski.

ID	Glomerulare	Tubulare	Interstiziale	Vascolare
Paz1	1	1	0	0
Paz2	0	0	0	0
Paz3	0	0	0	0
Paz4	0	0	0	0
Paz5	0	1	0	0
Paz6	0	0	0	0
Paz7	0	0	0	-1
Paz8	0	0	-1	0
Paz9	0	0	-1	0
Paz10	0	0	0	0

vengono mostrati gli errori assoluti sui quattro punteggi morfometrici per ogni paziente nel dataset, tramite la raffigurazione *bar diagram*. Si può constatare, infine, che per 5 pazienti nel dataset lo score di Karpinski totale calcolato dall’algoritmo coincide con la valutazione di un patologo esperto. Nel caso peggiore la differenza tra due punteggi è pari a 2.

## 3.4 Commento dei risultati

### 3.4.1 Segmentazione dei vasi

I risultati mostrano un  $F_1$  score medio del 63,68% per il *Training set* e  $F_1$  score medio del 66,83% per il *Test set*. Questo dimostra come la CNN sviluppata è in grado di generalizzare perché consente di ottenere le stesse prestazioni su immagini non utilizzate durante il suo apprendimento. La precisione della segmentazione viene necessariamente migliorata attraverso il *postprocessing* arrivando ad un  $F_1$  score medio del 79,91%. Dunque il risultato dato dal *postprocessing* è sufficiente per ottenere una segmentazione del vaso utilizzabile per il calcolo dello score vascolare. Inoltre il metodo proposto riesce ad

individuare i vasi medio/grandi in maniera assolutamente soddisfacente con un  $F_1$  score del 94,60%.

### 3.4.2 Individuazione del grado di fibrosi

I risultati mostrano come il metodo euristico proposto riesca ad individuare in maniera precisa e soddisfacente il tessuto connettivo fibroso, con un  $F_1$  score del 87,62%. Tuttavia l'errore medio tra la percentuale automatica e manuale dell'incremento della fibrosi (utilizzata per il calcolo dello score interstiziale) è del 5,33%. Questo risultato indica la presenza di un *bias* poiché la valutazione quantitativa manuale è operatore-dipendente, difatti il calcolo può variare in base alla esperienza e alla percezione visiva di un patologo esperto. Ciò nonostante il *bias* tra le percentuali viene ridotto grazie alle soglie non restrittive indicate nelle linee guida internazionali ottenendo un'accuratezza tra gli score automatici e manuali del 81%.

### 3.4.3 Calcolo dello score di Karpinski

I punteggi morfometrici delle quattro strutture (glomeruli, tubuli, vasi e fibrosi) ottenute dall'algoritmo hanno mostrato un buon *agreement* con la valutazione manuale effettuata da un anatomopatologo. I risultati mostrano un'accuratezza al più del 80% per tutte e quattro le strutture. Nei casi in cui i punteggi non coincidono, l'algoritmo presenta una sottostima per lo score glomerulare e tubulare; mentre presenta una sovrastima per lo score vascolare e interstiziale. Nel caso di analisi mediche una sovrastima è più accettabile rispetto ad una sottostima. Difatti è più grave il caso in cui un rene viene valutato trapiantabile dall'algoritmo, quando in realtà è da scartare, rispetto a non considerare un vaso ideale per il trapianto. Lo score totale di Karpinski calcolato dall'algoritmo coincide con quello del patologo esperto il 50% delle volte.

## Capitolo 4

# Conclusioni e sviluppi futuri

### 4.1 Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un algoritmo automatico per il calcolo dello score di Karpinski. Questo strumento si pone come *tool* di *second opinion* che può essere utilizzato dal patologo per potere avere un riscontro sulla sua valutazione in breve tempo. Fornire al patologo uno strumento che esegue un'analisi accurata sulle condizioni istopatologiche del rene in tempi brevi potrebbe essere molto utile soprattutto nel flusso di lavoro in regime di urgenza.

Si è dimostrato che per il metodo utilizzato per la segmentazione dei vasi è stato sviluppato un sistema preciso ( $F_1$  score medio del 79,91%) e che ha delle prestazioni molto soddisfacenti nell'individuazione di vasi medio/grandi ( $F_1$  score del 94,60%). Anche il tessuto connettivo fibroso viene individuato in maniera molto precisa dal metodo euristico proposto, con un  $F_1$  score del 87,62%. Infine è stato dimostrato che l'algoritmo sviluppato è *in agreement* con la valutazione manuale di un anatomopatologo esperto, mostrando un'accuratezza al più del 80% sui punteggi calcolati per ogni struttura che compone il rene (glomeruli, tubuli, vasi, interstizio). Il tempo computazionale medio impiegato dall'algoritmo per calcolare lo score di Karpinski per un dato paziente è pari a  $53,08 \pm 22,59$  min, utilizzando un dispositivo con un processore Intel(R) Core(TM) i7-7700HQ CPU @ 2.80 GHz. Dunque il lavoro di tesi propone un algoritmo rapido e sufficientemente preciso per il calcolo dello score di Karpinski.

Dalle qualità dei risultati e delle performance raggiunte, il lavoro di tesi potrebbe essere utilizzato come base di partenza per sviluppare un sistema *Computer Aided Diagnostic*

(CAD) sempre più preciso e robusto per l'analisi istopatologica del rene, e che può essere quindi utilizzato realmente nei reparti di Anatomia Patologica.

## 4.2 Sviluppi futuri

L'algoritmo è stato provato su un dataset di 10 pazienti per cui un primo sviluppo è provare l'algoritmo su un database più ampio e su più pazienti, in modo tale da poter ottenere dei risultati da un dataset eterogeneo e che contenga tutte le possibili casistiche che l'algoritmo potrebbe affrontare.

Un ulteriore sviluppo è quello di migliorare i metodi proposti per l'individuazione delle quattro strutture del rene (glomeruli, tubuli, vasi e fibrosi) in modo tale da ottenere un algoritmo più robusto e affidabile, e riducendo eventuali sovrastime e sottostime.

La *coloredge* si è rivelata ottima per la segmentazione del tessuto renale, per cui il metodo proposto può essere utilizzato per segmentare altri tipi di tessuti istologici.

L'approccio basato sul *Deep Learning* si è rivelato promettente sulla localizzazione dei vasi, ma è stato necessario un *postprocessing* impegnativo per migliorare e rendere precisa la segmentazione. Per cui un ulteriore sviluppo è modificare la CNN in modo tale da diminuire il *bias* presente e quindi risolvere il problema dell'*underfitting*. Delle possibili soluzioni potrebbero essere: allenare più a lungo la rete, utilizzare un dataset più ampio e modificare la rete rendendola più profonda. In questo modo si potrà evitare di utilizzare un *postprocessing* ottenendo già dalla rete una ottima segmentazione semantica.

Infine l'obiettivo finale sarebbe quello di migliorare il sistema in modo tale che le percezioni soggettive del patologo non generino alcun *bias* nel calcolo dello score di Karpinski, come accade per esempio nel calcolo della percentuale di incremento della fibrosi nelle fette di biopsia renali.

# Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il Prof. Filippo Molinari per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi. Ringrazio l'Ing. Massimo Salvi per avermi seguito e per i suoi preziosi consigli durante tutto il percorso.

Voglio ringraziare mia madre, Daniela, che mi ha sempre appoggiato nelle mie scelte e che mi ha riportato sui binari nei momenti più difficili. Senza di te non avrei mai mantenuto la testa sulle spalle in tutti questi anni universitari.

Ringrazio anche te papà, Francesco, per aver sempre creduto in me e nelle mie capacità. Grazie per tutte le volte di essere stato l'ottimista della famiglia ogni volta che ritornavo a casa dopo un esame.

Un ringraziamento speciale va anche a mia sorella, Annalisa, per l'affetto e il continuo sostegno in tutti questi anni. Grazie per tutte le volte che hai gioito insieme a me e per esserci sempre stata nel momento del bisogno. Ringrazio anche Francesco per il sostegno dato e che già da un po' ti considero parte della famiglia.

Non può di certo mancare il ringraziamento alla mia fidanzata, Rebecca. Grazie per tutto il sostegno e l'affetto che mi hai dato, soprattutto nei momenti più difficili. Ti ringrazio per tutte le volte che hai ascoltato le mie lamentele e per i consigli che mi hai dato durante questi anni universitari. Tu hai sempre visto il meglio di me e non hai mai dubitato delle mie capacità, soprattutto quando io non credevo in me. Alla fine questa tesi ha anche la tua firma e quindi per certi versi è un po' tua.

Ringrazio i miei due migliori amici, Jonathan e Luca. Vi ringrazio per il vostro continuo sostegno e per tutte le risate e le serate ignoranti che abbiamo fatto in questi anni.

Ringrazio i miei nonni, zii, cugini e parenti che mi hanno dimostrato sempre affetto. Ringrazio tutti i miei colleghi ed amici che hanno condiviso con me questi anni universitari.

*Infine, un pensiero speciale va a nonno Giuseppe e a nonna Rosaria che mi stanno proteggendo da lassù. A loro voglio dedicare il traguardo più importante della mia vita.*

# Bibliografia

- [1] Emilio Carbone, Frr Cicirata, Grr Aicardi et al. «Fisiologia: dalle molecole ai sistemi integrati». In: (2009).
- [2] Marina Bentivoglio et al. *Anatomia umana e istologia*. EDIZIONI MINERVA MEDICA SpA, 2010.
- [3] *Picture of kidney*. 2019. URL: <https://www.emanuelescarponi.it/le-alte-vie-urinarie.html>.
- [4] *Picture of renal circulation*. 2019. URL: <https://slideplayer.it/slide/1007202/>.
- [5] *Picture of nephron*. 2019. URL: <https://wauniversity.it/come-funziona-il-rene-uno-sguardo-approfondito-al-nefrone/>.
- [6] Andrew S Levey e Josef Coresh. «Chronic kidney disease». eng. In: *The Lancet* (2011).
- [7] Angela C Webster et al. «Chronic Kidney Disease». eng. In: *Lancet (London, England)* 389.10075 (2017).
- [8] Francesco Porpiglia. *Urologia*. EDIZIONI MINERVA MEDICA SpA.
- [9] Richard J. Baker e Christopher J.E. Watson. «Renal transplantation». eng. In: *Medicine* 43.9 (2015), pp. 497–506.
- [10] Sundaram Hariharan et al. «Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996». In: *New England Journal of Medicine* 342.9 (2000), pp. 605–612.
- [11] John Mendeloff et al. «Procuring organ donors as a health investment: how much should we be willing to spend?» In: *Transplantation* 78.12 (2004), pp. 1704–1710.

- [12] Paul Eggers. «Comparison of treatment costs between dialysis and transplantation». In: *Seminars in nephrology*. Vol. 12. 3. Elsevier. 1992, pp. 284–289.
- [13] Paul I Terasaki et al. «High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors». In: *New England Journal of Medicine* 333.6 (1995), pp. 333–336.
- [14] Argiris Asderakis et al. «Pre-emptive kidney transplantation: the attractive alternative.» In: *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association* 13.7 (1998), pp. 1799–1803.
- [15] Bruce R Rosengard et al. «Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor». In: *American Journal of Transplantation* 2.8 (2002), pp. 701–711.
- [16] MA Belger. «Changing donor pattern study of cadaveric kidney donors in the UK and Republic of Ireland, 1985-1994. United Kingdom Transplant Support Service Authority (UK TSSA) Users' Kidney Advisory Group and Audit SubGroup.» In: *Transplantation proceedings*. Vol. 29. 1-2. 1997, p. 106.
- [17] HM Kauffman et al. «Trends in organ donation, recovery and disposition: UNOS data for 1988-1996». In: *Transplantation proceedings*. Vol. 29. 8. 1997, pp. 3303–3304.
- [18] Vincent Audard et al. «Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview». In: *Transplant International* 21.1 (2008), pp. 11–17.
- [19] DA Goldfarb. «Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors.» In: *The Journal of urology* 169.6 (2003), p. 2434.
- [20] Robert A Metzger et al. «Expanded criteria donors for kidney transplantation». In: *American Journal of Transplantation* 3 (2003), pp. 114–125.
- [21] JR Nyengaard e TF Bendtsen. «Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man». In: *The Anatomical Record* 232.2 (1992), pp. 194–201.

- [22] JOHAN W DE FIJTER et al. «Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys». In: *Journal of the American Society of Nephrology* 12.7 (2001), pp. 1538–1546.
- [23] Michael L Nicholson et al. «A comparison of the results of renal transplantation from non–heart-beating, conventional cadaveric, and living donors». In: *Kidney international* 58.6 (2000), pp. 2585–2591.
- [24] Akinlolu O Ojo et al. «Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates». In: *Journal of the American Society of Nephrology* 12.3 (2001), pp. 589–597.
- [25] Parmjeet Randhawa. «Role of donor kidney biopsies in renal transplantation». In: *Transplantation* 71.10 (2001), pp. 1361–1365.
- [26] K Lopes et al. «The prognostic value of pre-implantation graft biopsy on the outcomes of renal transplantations». In: *Transplantation proceedings*. Vol. 43. 1. Elsevier. 2011, pp. 67–69.
- [27] Patrick D Walker, Tito Cavallo e Stephen M Bonsib. «Practice guidelines for the renal biopsy». In: *Modern Pathology* 17.12 (2004), p. 1555.
- [28] *Histological techniques*. 2019. URL: [http://www.wesapiens.org/%20class/4933003/file/2/Histological+techniques%3A+How+is+done+to+get+%20histological+sections%2C+Embedding+and+sectioning+\(diagram+in+spanish\)](http://www.wesapiens.org/%20class/4933003/file/2/Histological+techniques%3A+How+is+done+to+get+%20histological+sections%2C+Embedding+and+sectioning+(diagram+in+spanish)).
- [29] Nasar Alwahaibi, Azza Alkhatri e Johannes Kumar. «Hematoxylin and eosin stain shows a high sensitivity but sub-optimal specificity in demonstrating iron pigment in liver biopsies». In: *International Journal of Applied and Basic Medical Research* 5.3 (2015), pp. 169–171.
- [30] Alexander JE Foss et al. «Reassessment of the PAS patterns in uveal melanoma». In: *British journal of ophthalmology* 81.3 (1997), pp. 240–246.
- [31] Syed Taqi et al. «A review of artifacts in histopathology». In: *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 22.2 (2018), pp. 279–279.
- [32] Jolanta Karpinski et al. «Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function». In: *Transplantation* 67.8 (1999), pp. 1162–1167.

- [33] G Fuiano et al. «Glomerulosclerosi focale segmentaria». In: *Giornale Italiano di Nefrologia* 18 (2001), pp. 510–523.
- [34] Edith Grishman e Jacob Churg. «Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: An electron microscopic study of glomerular podocytes». In: *Kidney international* 7.2 (1975), pp. 111–122.
- [35] Melvin M Schwartz e Edmund J Lewis. «Focal segmental glomerular sclerosis: The cellular lesion». In: *Kidney international* 28.6 (1985), pp. 968–974.
- [36] Timo Jahnukainen et al. «Clinical outcome and occurrence of uveitis in children with idiopathic tubulointerstitial nephritis». In: *Pediatric Nephrology* 26.2 (2011), pp. 291–299.
- [37] Peter D Vize, Adrian S Woolf e Jonathan BL Bard. *The kidney: from normal development to congenital disease*. Elsevier, 2003.
- [38] Tim D Hewitson. «Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple». In: *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 296.6 (2009), F1239–F1244.
- [39] Adalbert Bohle, Susanne Mackensen-Haen e Harolo v Gise. «Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution». In: *American journal of nephrology* 7.6 (1987), pp. 421–433.
- [40] Claude G Biava et al. «Renal hyaline arteriosclerosis an electron microscope study». In: *The American journal of pathology* 44.3 (1964), p. 349.
- [41] Giuseppe Remuzzi et al. «Long-term outcome of renal transplantation from older donors». In: *New England Journal of Medicine* 354.4 (2006), pp. 343–352.
- [42] Filippo Molinari, Massimo Salvi e Alessandro Mogetta. «Sviluppo di un algoritmo automatico per l'individuazione e la quantificazione di strutture patologiche in immagini istologiche di rene». In: (2019).
- [43] I Sobel. «An Isotropic  $3 \times 3$  Gradient Operator, Machine Vision for Three-Dimensional Scenes». In: *Freeman, H., Academic Pres, NY* (1990), p. 376379.
- [44] Nobuyuki Otsu. «A threshold selection method from gray-level histograms». In: *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics* 9.1 (1979), pp. 62–66.
- [45] Marc Macenko et al. «A method for normalizing histology slides for quantitative analysis». In: *2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*. IEEE. 2009, pp. 1107–1110.

- [46] Milan Gavrilovic et al. «Blind color decomposition of histological images». In: *IEEE transactions on medical imaging* 32.6 (2013), pp. 983–994.
- [47] *Convolutional Neural Networks*. 2019. URL: <http://cs231n.github.io/convolutional-networks/>.
- [48] Alex Krizhevsky, Ilya Sutskever e Geoffrey E Hinton. «Imagenet classification with deep convolutional neural networks». In: *Advances in neural information processing systems*. 2012, pp. 1097–1105.
- [49] *AlexNet*. 2019. URL: <https://www.learnopencv.com/understanding-alexnet/>.
- [50] Jeremy West, Dan Ventura e Sean Warnick. «Spring research presentation: A theoretical foundation for inductive transfer». In: *Brigham Young University, College of Physical and Mathematical Sciences* 1 (2007), p. 32.
- [51] Waseem Rawat e Zenghui Wang. «Deep convolutional neural networks for image classification: A comprehensive review». In: *Neural computation* 29.9 (2017), pp. 2352–2449.
- [52] *Methods of transfer learning*. 2019. URL: <https://towardsdatascience.com/transfer-learning-from-pre-trained-models-f2393f124751>.
- [53] Lisa Torrey e Jude Shavlik. «Transfer learning». In: *Handbook of research on machine learning applications and trends: algorithms, methods, and techniques*. IGI Global, 2010, pp. 242–264.
- [54] Jonathan Long, Evan Shelhamer e Trevor Darrell. «Fully convolutional networks for semantic segmentation». In: *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*. 2015, pp. 3431–3440.
- [55] Luis Perez e Jason Wang. «The effectiveness of data augmentation in image classification using deep learning». In: *arXiv preprint arXiv:1712.04621* (2017).
- [56] Francois Bergeaud e Stephane Mallat. «Matching pursuit of images». In: *Proceedings., International Conference on Image Processing*. Vol. 1. IEEE. 1995, pp. 53–56.
- [57] Tony F Chan e Luminita A Vese. «Active contours without edges». In: *IEEE Transactions on image processing* 10.2 (2001), pp. 266–277.