



POLITECNICO DI TORINO

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

**Sviluppo di un algoritmo automatico per
l'individuazione e la quantificazione di
strutture patologiche in immagini istologiche
di rene**

Relatori:

Prof. Filippo Molinari

Ing. Massimo Salvi

Candidato:

Alessandro Mogetta



Luglio 2019

Indice

Sommario	8
1 Introduzione	10
1.1 Anatomia e patologie del rene	10
1.1.1 Corpuscolo renale	11
1.1.2 Tubulo renale	12
1.1.3 Funzioni del rene	13
1.1.4 Patologie croniche renali	14
1.2 Sistemi di valutazione di un rene marginale	16
1.2.1 Valutazione istopatologica	17
1.2.2 Score di Karpinski	21
1.2.3 Glomerulosclerosi	22
1.2.4 Atrofia tubulare	24
2 Materiali e Metodi	27
2.1 Dataset	28
2.2 Architettura dell'algoritmo	30
2.3 Introduzione sulle Reti Neurali Convoluzionali (CNN)	32
2.3.1 AlexNet e metodo del Transfer Learning	35
2.3.2 CNN per segmentazione semantica	37
2.3.3 Problema dell'overfitting	39
2.4 Normalizzazione dello stain dell'immagine	41
2.4.1 Stima dei colori e normalizzazione usando Macencko	42
2.5 Segmentazione e classificazione dei glomeruli	45
2.5.1 Struttura e allenamento della rete	45
2.5.2 Individuazione di glomeruli sani e sclerotici	51

2.6	Segmentazione e classificazione dei tubuli	54
2.6.1	Allenamento della rete	55
2.6.2	Individuazione di tubuli atrofici	56
2.6.3	Individuazione dei tubuli sani	64
2.7	Metriche di validazione	73
2.7.1	Metriche di validazione per i glomeruli	74
2.7.2	Metriche di validazione per i tubuli	77
3	Risultati	79
3.1	Validazione dell'individuazione dei glomeruli	79
3.1.1	Risultato dell'allenamento della CNN	79
3.1.2	Risultati sul Training Set	81
3.1.3	Risultati sul Test Set	85
3.2	Validazione dell'individuazione dei tubuli	89
3.2.1	Risultato dell'allenamento della CNN	89
3.2.2	Risultati sul Training Set	90
3.2.3	Risultati sul Test Set	94
3.2.4	Tempo computazionale	97
3.3	Commento dei risultati	97
3.3.1	Individuazione dei glomeruli	97
3.3.2	Individuazione dei tubuli	97
4	Conclusioni e sviluppi futuri	99
4.1	Conclusioni	99
4.2	Sviluppi futuri	100

Elenco delle figure

1.1	Struttura anatomica del rene	11
1.2	Struttura di un nefrone	13
1.3	Peso delle CKD nel mondo	15
1.4	Tecniche istologiche di preparazione di un vetrino	19
1.5	Colorazione con reazione PAS	20
1.6	Glomerulo sano e glomerulo sclerotico in immagine istologica colorata con reazione PAS	23
1.7	Esempio di conta manuale di glomeruli	24
1.8	Tubuli sani e tubuli atrofici in immagine istologica colorata con reazione PAS	25
1.9	Esempio di identificazione di tubuli atrofici da parte del patologo	26
2.1	Esempio di WSI visualizzata in ambiente ImageScope	28
2.2	Immagine estratta dalla WSI	29
2.3	Annotazioni manuali delle strutture da analizzare	30
2.4	Struttura dell'algoritmo	31
2.5	Rete neurale classica e CNN	33
2.6	Strato convoluzionale CNN	34
2.7	Strato di pooling CNN	35
2.8	Struttura della AlexNet	36
2.9	Modalità di transfer learning	37
2.10	Struttura di una rete per segmentazione semantica.	39
2.11	Relazione tra intensità e densità ottica	43
2.12	Normalizzazione	44
2.13	AlexNet per segmentazione semantica	46

2.14	Esempio di immagine in input alla CNN per il riconoscimento dei glomeruli	48
2.15	Diagramma a blocchi per segmentazione e classificazione dei glomeruli	51
2.16	Risultati della CNN per i glomeruli	52
2.17	Maschere dei glomeruli in output dalla CNN	53
2.18	Segmentazione manuale ed automatica dei glomeruli	54
2.19	Esempio di immagine in input alla CNN per il riconoscimento dei tubuli	56
2.20	Workflow per l'individuazione dei tubuli atrofici	57
2.21	Amplificazione del canale colore dei contorni dei tubuli	59
2.22	Prima individuazione dei tubuli atrofici	60
2.23	Maschera ottenuta alla fine del percorso iterativo.	62
2.24	Output della rete nell'individuazione dei tubuli	63
2.25	Confronto tra segmentazione manuale e automatica dei tubuli atrofici	64
2.26	Workflow per l'individuazione dei tubuli sani	65
2.27	Maschera dei lumi dei tubuli	66
2.28	Color deconvolution	67
2.29	Diagramma a blocchi per l'applicazione del contorno attivo di Chan-Vese	71
2.30	Confronto tra segmentazione manuale e automatica dei tubuli sani	72
2.31	Confronto tra segmentazione manuale e automatica dei tubuli	73
3.1	Allenamento AlexNet sui glomeruli	80
3.2	Metriche di validazione Object-based per i glomeruli nel Training Set	82
3.3	Accuratezza Pixel based per i glomeruli nel Training Set	83
3.4	Metriche pixel-based sui veri positivi per i glomeruli nel Training Set	84
3.5	Metriche di validazione object-based per i glomeruli nel Test Set	86
3.6	Accuratezza Pixel based per i glomeruli nel test set	87
3.7	Metriche pixel-based sui veri positivi	88
3.8	AlexNet per segmentazione dei tubuli	89

3.9	Accuratezza di classificazione dei Pixel per i tubuli nel Training Set	91
3.10	Rapporto tra area atrofica e area tubulare nel training set . . .	92
3.11	Errori assoluti e relativi sul rapporto tra aree atrofiche sulle aree tubulari nel training	93
3.12	Valori medi e standard deviation dell'errore assoluto e di quello relativo nelle immagini di training	93
3.13	Accuratezza di classificazione dei Pixel per i tubuli nel test set .	94
3.14	Rapporto tra area atrofica e area tubulare nel test set	95
3.15	Errori assoluti e relativi sul rapporto tra aree atrofiche sulle aree tubulari nel test	96
3.16	Valori medi e standard deviation dell'errore assoluto e di quello relativo nelle immagini di test	96

Elenco delle tabelle

1.1	Score di Karpinski	22
2.1	Parametri della rete	49
2.2	Esempio di <i>confusion matrix</i>	74
3.1	Accuratezza di classificazione della CNN sui glomeruli	80
3.2	Individuazione dei glomeruli sani e dei glomeruli sclerotici nelle immagini del Training Set	81
3.3	Metriche pixel based nei glomeruli valutate sui TP nelle immagini del Training Set	85
3.4	Individuazione dei glomeruli sani e dei glomeruli sclerotici nelle immagini del Test Set	85
3.5	Metriche pixel based nei glomeruli valutate sui TP nelle immagini del Test Set	88
3.6	Accuratezza di classificazione della CNN sui tubuli	90

Sommario

La diagnosi delle malattie del tessuto renale spesso dipende dall'individuazione e dalla quantificazione di determinate strutture del tessuto. Prima di un innesto di rene "marginale" (organo proveniente da un donatore non ideale), nel caso in cui le linee guida lo prevedano, vengono effettuate delle biopsie chirurgiche del tessuto renale. La diagnosi della biopsia è affidata ad un esperto anatomoistopatologo che ispeziona al microscopio i preparati istologici spesso colorati con la reazione PAS (acido periodico - reattivo di Schiff) e definisce uno score morfometrico di "Karpinski" per la valutazione della trapiantabilità del rene e delle modalità di trapianto (singolo oppure doppio). Tali ispezioni risultano essere molto onerose nei tempi e affette da una valutazione soggettiva del patologo che è chiamato a fornire una risposta nel più breve tempo possibile. Le quattro strutture del tessuto renale che devono essere analizzate sono le seguenti: glomeruli, tubuli, tessuto fibrotico e vasi. Nel caso dei glomeruli si tratta di stabilire il numero dei glomeruli sclerotici sul totale dei glomeruli presenti nel campione ispezionato; nel caso dei tubuli si devono quantificare i tubuli atrofici sul totale dei tubuli; per la fibrosi si deve individuare la percentuale di tessuto fibrotico sull'area totale del tessuto; per i vasi l'analisi è più qualitativa e si concentra sugli spessori del lume e della parete.

Questo lavoro di tesi si occupa delle prime due strutture sopraelencate, glomeruli e tubuli. Viene presentato un sistema automatico per l'individuazione e la segmentazione di glomeruli sani e sclerotici e tubuli sani e atrofici in immagini istologiche di rene colorate con reazione PAS, col fine di quantificare queste strutture e ottenere così in maniera più rapida gli scores glomerulare e tubulare che fanno parte dello score di Karpinski. L'algoritmo si sviluppa nei seguenti passi: 1)normalizzazione della colorazione dell'immagine 2)segmentazione e classificazione dei glomeruli 3)segmentazione e classificazione dei tubuli. Sia

per l'individuazione dei glomeruli che per quella dei tubuli è previsto l'utilizzo di una rete neurale convoluzionale (CNN) per segmentazione allenata in modo supervisionato su dataset di numerosità diversa per le due strutture: 1) 500 immagini per il training set e 120 per il test nel caso dei glomeruli 2) 200 immagini per il training set e 9 per il test nel caso dei tubuli. Le prestazioni dell'algoritmo nel test e nel training dei rispettivi dataset risultano avere risultati comparabili. Nell'individuazione dei glomeruli sani si ottiene un F-score pari al 97,7% nel training set e del 96,3% nel test set. Per i glomeruli sclerotici si raggiunge un F-score del 93,1% nel training set e 95,2% nel test set. La quantificazione dei tubuli atrofici si ottiene invece come rapporto di aree tra i tubuli atrofici e tutti i tubuli individuati, arrivando ad un errore assoluto medio tra le annotazioni manuali e i risultati dell'algoritmo di $1.36\% \pm 1.95\%$ per il training e $1.31\% \pm 1.68\%$ per il test. Il tempo medio di processing di un'immagine per segmentare e classificare le strutture è di 14,4s.

La possibilità di disporre di un sistema automatizzato con prestazioni comparabili ad una valutazione manuale per l'individuazione rapida di strutture renali in immagini istopatologiche, potrebbe essere utile al fine di ottimizzare il flusso di lavoro del patologo nella valutazione d'urgenza della trapiantabilità di un rene marginale.

Capitolo 1

Introduzione

Nel primo capitolo vengono brevemente introdotte le caratteristiche fisiologiche ed anatomiche del rene, soffermandosi in particolar modo sulle funzionalità delle due strutture prese in esame dal lavoro di tesi, *glomeruli e tubuli*, e le relative patologie che possono alterare il loro funzionamento. Di seguito si procede ad una breve descrizione delle modalità di trapianto di rene in particolare nel caso di donatore marginale. Si tratta infatti di un donatore ad alto rischio e pertanto risulta molto importante, in questo caso, la valutazione dello score istologico di "Karpinski" della biopsia pre-impianto.

Viene poi introdotta la procedura per ottenere un preparato istologico e vengono descritte le principali colorazioni delle immagini di vetrini (Whole Slide Images).

1.1 Anatomia e patologie del rene

I reni sono organi retro-peritoneali pari situati nella regione posteriore della cavità addominale. La forma del rene ricorda approssimativamente quella di un grande fagiolo, delle dimensioni di circa un pugno [1].

La sezione frontale di un rene mostra la presenza di due regioni principali: uno strato esterno rossastro chiamato corticale e una regione interna dall'aspetto scuro-striato detta midollare. La midollare del rene è suddivisa in regioni coniche dette piramidi renali, ai vertici delle quali si trovano le papille; ogni piramide presenta una serie di tubuli detti dotti collettori che riversano il loro contenuto all'interno dei calici minori. Questi ultimi convergono nei calici

maggiori che a loro volta si fondono a formare un singolo passaggio a forma di imbuto chiamato pelvi renale. L'unità funzionale del rene è il nefrone. Milioni di nefroni si trovano all'interno delle piramidi ed hanno il compito di filtrare il sangue e formare l'urina.

Ogni nefrone in sostanza filtra sangue e forma urina in maniera del tutto autonoma attraverso le sue due componenti: il corpuscolo renale e il tubulo renale.

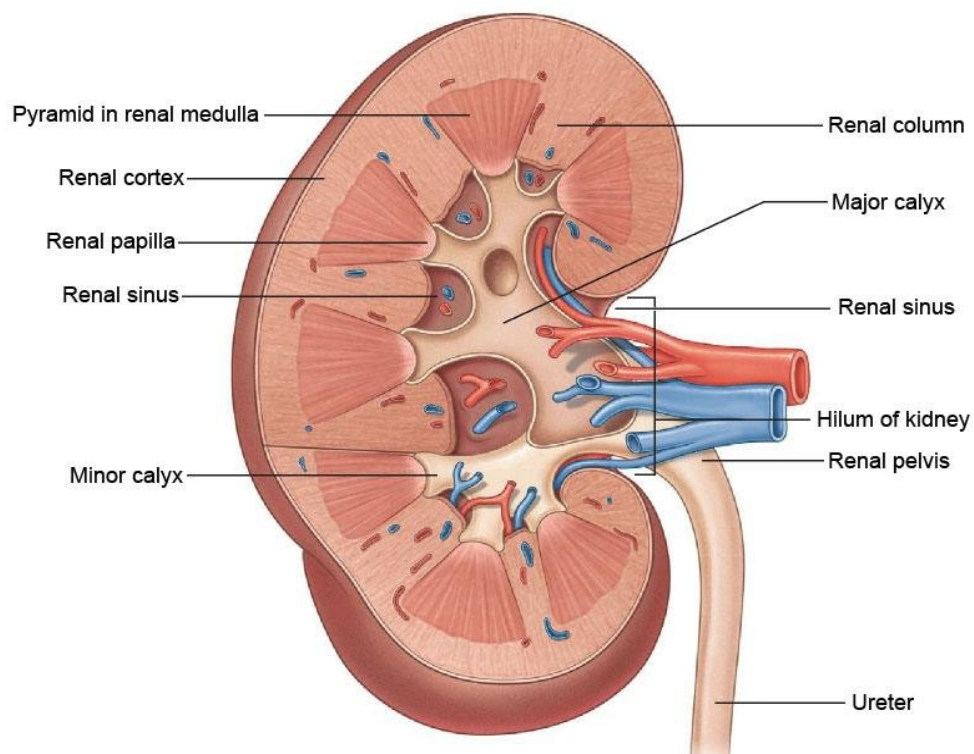


Figura 1.1: Struttura anatomica del rene[2].

1.1.1 Corpuscolo renale

Il corpuscolo renale è formato da due parti:

- il glomerulo renale
- la capsula di Bowman

Il corpuscolo renale è la sede in cui viene filtrato il sangue e dove si forma il liquido tubulare. Il sangue filtrato entra nei capillari glomerulari attraverso

un'arteriola afferente. Man mano che procede lungo i capillari del glomerulo che sono avvolti su se stessi come a formare un gomitolo, una certa quantità di plasma privo di proteine filtra attraverso le pareti dei capillari verso la capsula di Bowman in un processo chiamato *filtrazione glomerulare*. Il sangue rimasto nei glomeruli è invece drenato verso un'arteriola efferente. Questa organizzazione di due arteriole in serie, inframezzate da un gomitolo capillare, è unica del corpuscolo renale.

1.1.2 Tubulo renale

Il filtrato glomerulare spostatosi nella capsula di Bowman si muove verso la porzione iniziale del tubulo renale, chiamata *tubulo contorto prossimale* per la sua forma ripiegata, che continua nel *tubulo retto prossimale*. I due tubuli insieme formano il *tubulo prossimale* che riversa il suo contenuto nell' *ansa di Henle* ovvero la porzione del tubulo che crea un'ansa ad "U" prolungandosi all'interno della midollare renale. L'ansa di Henle si divide in 3 zone: (1) tratto discendente formato da un sottile tubulo che origina dal prossimale e si estende verso la midollare, (2) tratto ascendente sottile esteso verso la corticale, (3) tratto ascendente spesso. Da quest'ultimo il liquido fluisce nel *tubulo contorto distale* che è molto più corto del prossimale. C'è poi la porzione finale del nefrone, detta *tubulo collettore* che unisce il nefrone al dotto collettore.

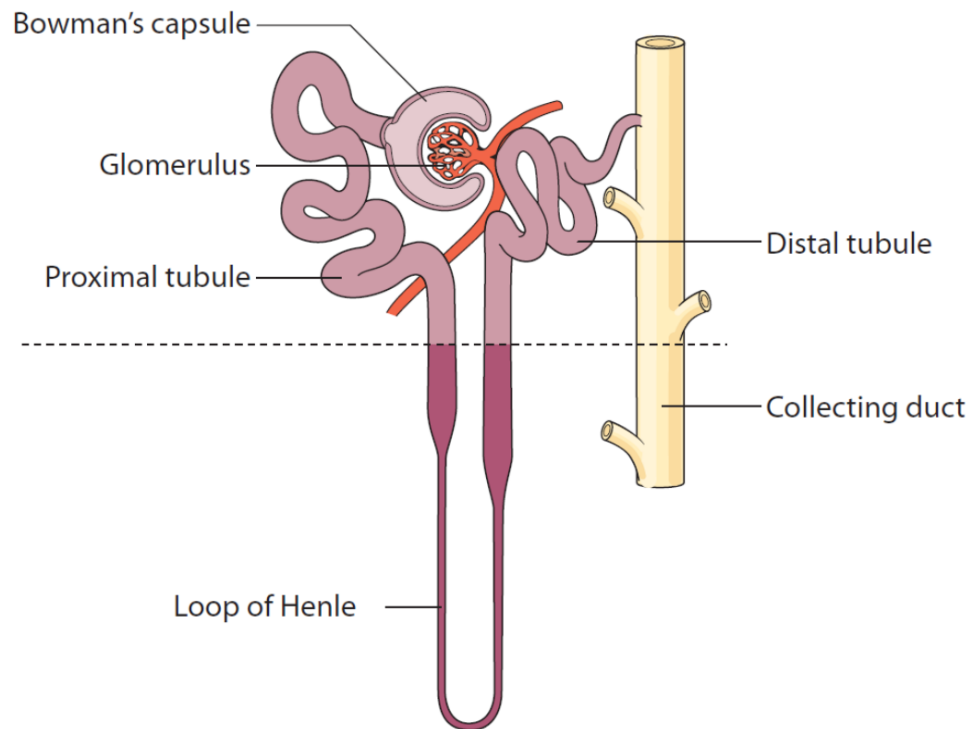


Figura 1.2: Struttura anatomica del nefrone composto da corpuscolo renale e tubulo renale[3].

1.1.3 Funzioni del rene

Le principali funzionalità del rene sono:

- Rimozione di prodotti di scarto del metabolismo e di sostanze estranee dal plasma.
- Regolazione della composizione ionica del plasma, aumentando o diminuendo l'escrezione urinaria di ioni specifici.
- Regolazione del volume plasmatico e dell'osmolarità plasmatica, controllando la velocità di escrezione dell'acqua nell'urina.
- Regolazione del pH, controllando la quantità di ioni idrogeno e bicarbonato nel plasma.
- Secrezione di ormoni, in particolare eritropoietina e renina.

- Gluconeogenesi, capacità cioè di produrre glucosio. La regolazione della produzione del glucosio è ottenuta grazie all'azione di ormoni come l'insulina.[4]

1.1.4 Patologie croniche renali

Le malattie croniche del rene (CKD) possono derivare da diversi fattori che alterano la struttura e la funzionalità del rene in maniera irreversibile [5]. Il miglior indicatore di funzionamento del rene è il *rate di filtrazione glomerulare* (GFR) che indica la quantità di fluido filtrato attraverso tutti i nefroni funzionanti nell'unità di tempo[6]. La definizione e la classificazione delle CKD si è evoluta nel tempo ma le linee guida internazionali definiscono le seguenti caratteristiche per evidenziare una malattia cronica del rene: 1) $GFR < 60 \frac{mL}{min}$ per $1.73m^2$ 2) presenza di almeno uno dei marker di disfunzionalità renale (Albuminuria, anomalia nei sedimenti urinari, anomalie dovute a disordini tubulari, anormalità nell'immagine istologica, anomalie strutturali rilevate nell'imaging, storia di trapianto di rene).

La disfunzionalità del rene è mostrata dalla presenza uno di questi due fattori o da entrambi, a prescindere dalle cause, per una durata temporale di almeno 3 mesi[7]. Quando il $GFR < 15 \frac{mL}{min}$ per $1.73m^2$ si considera raggiunto lo stadio finale di malattia renale cronica (ESKD) e il rene non è più in grado di funzionare a lungo termine. Le uniche azioni possibili per pazienti affetti da ESKD sono la dialisi oppure il *trapianto di rene*.

Le maggiori cause di malattie croniche renali nei paesi sviluppati e in quelli in via di sviluppo sono *diabete* e *ipertensione*[8]. Il peso delle CKD è sostanziale. Secondo le stime della WHO global health, 864226 morti (1,5% delle morti nel mondo) nel 2012 sono da attribuire alle malattie di rene che sono la quattordicesima causa di morte nel mondo. Dal 1990 ad oggi solamente le morti dovute all'infezione per complicazione del virus HIV sono cresciute con un rate più rapido rispetto alle morti dovute a CKD. Secondo previsioni del Global Health Observatory il rate di morte per malattie croniche renali passerà da 12.2 su 100000 persone a 14 su 100000 persone entro il 2030 (figura 1.3).

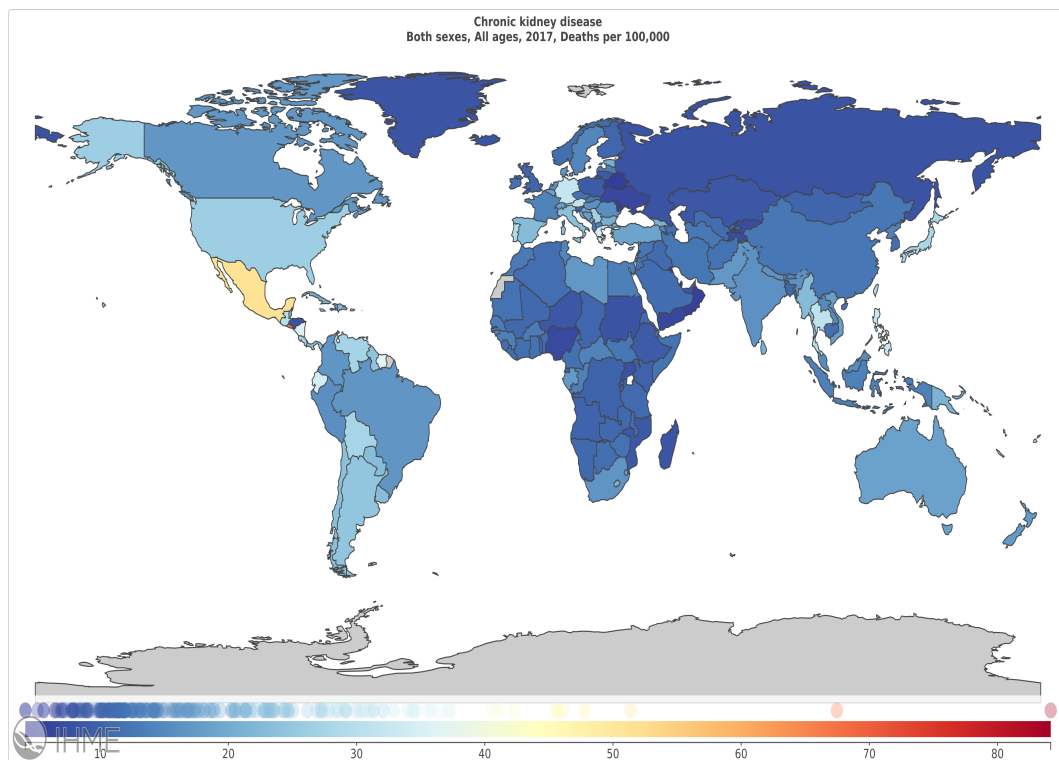


Figura 1.3: Proporzioe della mortalità attribuita alle malattie croniche renali.

Trapianto di rene

Il trapianto di rene è la miglior terapia per la maggior parte dei pazienti affetti da malattia renale cronica terminale ed è superiore al trattamento dialitico in termini di rischio di mortalità a lungo termine[9] [10]. L'aumento progressivo del numero di pazienti affetti da insufficienza renale terminale ha portato ad un numero sempre crescente di richieste di iscrizione nelle liste di attesa per trapianto di rene. C'è così stato un incremento del pool dei candidati idonei al trapianto renale molto maggiore rispetto all'incremento del numero donatori. La necessità di reperire organi idonei al trapianto ha portato ad un progressivo incremento del numero di donatori anziani e, conseguentemente, ad un aumento dell'età media dei donatori cadavere[11]. I criteri di selezione dei donatori sono stati espansi fino ad includere soggetti che prima non sarebbero stati considerati idonei a causa di condizioni non ottimali per la sopravvivenza del trapianto[12]. Si parla pertanto di "*donatore marginale*", un donatore non ottimale che rientra

però in quelli che vengono definiti "*Expanded criteria donors*" (ECD) ovvero donatori selezionati secondo dei criteri poco restrittivi che verranno in seguito descritti.[13] [14]. L'introduzione di questi criteri è dovuta ad una necessità di classificazione universale ed inequivocabile degli organi marginali derivanti da donatori con una serie di fattori comuni che mettono a rischio l'efficacia del trapianto. Sono donatori che presentano una serie di fattori quali età avanzata, storia di ipertensione arteriosa e diabete mellito, prolungato tempo di ischemia fredda ed elevati livelli di creatinina sierica terminale[13].

Criteri di selezione del donatore espansi (ECD)

I donatori che rientrano nei criteri di selezione espansi presentano le seguenti caratteristiche:

- donatori deceduti ad un'età > 59 anni
- donatori deceduti ad un'età compresa tra i 50 e il 59 anni con le seguenti caratteristiche: 1) storia di ipertensione arteriosa 2) morte avvenuta per cause cerebrovascolari 3) creatininemia maggiore di $1.5 \frac{mg}{dl}$ [15] .

il rischio relativo di fallimento di un trapianto da donatore ECD è del 70% superiore rispetto ad un trapianto da donatore ideale[16]. L'idea che è alla base dell'utilizzo del rene del donatore ECD è che pur non essendo un trapianto ottimale come quello di un rene "ideale" migliora la sopravvivenza a lungo termine del ricevente di molto rispetto a coloro che restano in lista d'attesa. Si parla di una riduzione del rischio di mortalità del 25% rispetto a coloro che devono ancora ricevere un trapianto[17].

1.2 Sistemi di valutazione di un rene marginale

L'utilizzo dei reni da donatori marginali, riducendo il numero di organi prelevati da scartare ed evitando i costi relativi al trattamento dialitico, porta molti benefici anche in termini economici.

Non bisogna dimenticare però che un rene proveniente da un donatore ECD ha

una funzionalità ridotta rispetto a quello proveniente da un donatore ottimale. Approssimativamente il numero di nefroni presenti in due reni marginali è circa $\frac{1}{3}$ di quelli presenti in in due reni ideali[18] e il deterioramento è molto più rapido. Inoltre è importante raggiungere un numero teorico di nefroni in grado di sostenere le richieste metaboliche del ricevente, in maniera tale da prevenire una progressiva perdita di funzione dell'organo trapiantato a lungo termine. In questo senso è necessaria una valutazione rapida da parte del patologo per capire quanto il rene in analisi sia trapiantabile e con quale modalità. Si può cioè trapiantare un singolo rene in un paziente oppure optare per un doppio trapianto renale[19]. Con l'obiettivo di riconoscere tra gli organi marginali quelli idonei all'impiego a scopo di trapianto, sono stati elaborati dei criteri di classificazione e allocazione di reni marginali in singolo o doppio trapianto. Si tratta di sistemi che assegnano *score* clinici, istologici oppure misti che tengono conto dell'impatto di variabili istopatologiche o cliniche sull'evoluzione dell'innesto. Il lavoro di tesi si concentra sull'assegnazione di uno score istopatologico.

1.2.1 Valutazione istopatologica

Molti studi hanno mostrato come la valutazione istologica basata su una biopsia pre-trapianto riesca ad evidenziare il grado di deterioramento patologico del rene e la sua idoneità al trapianto in maniera più oggettiva e completa di una semplice valutazione clinica[20]. Prima dell'innesto di un rene marginale devono essere effettuate delle operazioni standard per poter classificare correttamente l'organo. Innanzitutto vengono effettuate delle *biopsie chirurgiche* che generalmente, nel caso di biopsia renale, possono essere di due tipi:

- *tru-cut*: l'ago, composto da una parte scanalata e una tagliente che vi scorre sopra, viene posizionato e si esegue il prelievo mediante un meccanismo a scatto che consente l'asportazione di un cilindro di tessuto della lunghezza di circa 1-2 cm.
- *a cuneo*: si effettua un'incisione nel parenchima renale e se ne asporta una piccola piramide.

Il tessuto così prelevato viene inviato al laboratorio di anatomia patologica che, in regime di urgenza (qualsiasi ora del giorno e della notte, compresi festivi), provvede alla preparazione rapida del vetrino da analizzare. Solitamente si preparano due vetrini per ogni biopsia, uno in colorazione PAS e l'altro in colorazione tricromica.

Preparazione del vetrino

Esistono molti passaggi nella preparazione di un tessuto biologico da analizzare al microscopio (figura 1.4):

- *Prelievo*
- *Fissazione e inclusione*
- *Disidratazione*
- *Sezionamento*
- *Colorazione*

Dopo il prelievo tramite biopsia, i tessuti vengono sottoposti al processo di fissazione per prevenirne la decomposizione dovuta al cambiamento di temperatura e pH e all'azione di microorganismi che attaccano il materiale biologico. Questo processo consiste nel trattamento dei tessuti con alcol e aldeidi che fissano le molecole del tessuto nella loro posizione di prelievo e ne mantengono lo stato chimico. A questo punto si applica l'inclusione di materiali più resistenti che possano fungere da sostegno per i contenuti biologici fissati. Nell'allestimento di preparati istologici per la microscopia ottica il materiale più utilizzato a questo scopo è la paraffina. Per poter effettuare l'inclusione di materiali apolari nella cellula che è principalmente composta da acqua (polare) è necessario il processo di disidratazione. Si utilizza a questo scopo l'alcol, insolubile in paraffina, che verrà poi rimosso tramite l'utilizzo di sostanze quali benzene e xilene (*diafanizzazione*) solubili invece in paraffina. A questo punto il tessuto deve essere reso sufficientemente sottile per permettere alla luce di attraversarlo, condizione necessaria per l'osservazione al microscopio ottico. Pertanto si procede al sezionamento del tessuto tramite uno strumento chiamato microtomo

con il quale si possono raggiungere sezioni sottilissime dello spessore anche di $20\text{-}30\mu\text{m}$. Infine la fase di colorazione permette di riconoscere le strutture principali dell'organo esaminato ed identificare i costituenti chimici del tessuto. I coloranti che vengono utilizzati in ambito citologico o istologico consentono di legarsi alle strutture aumentando il contrasto dell'immagine[21].

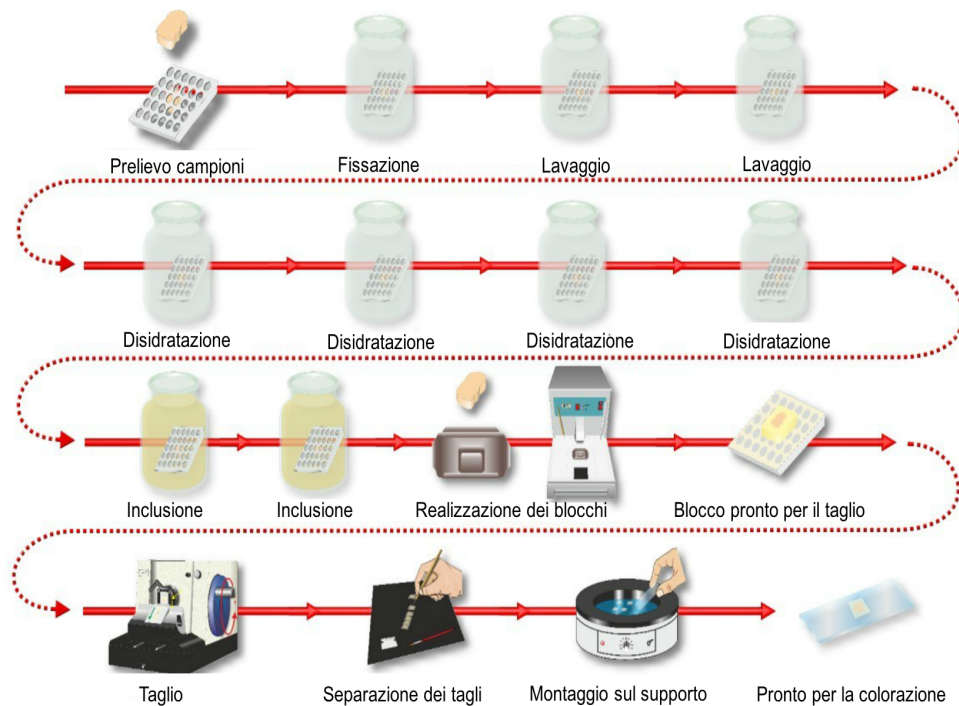


Figura 1.4: Tecniche istologiche di preparazione di un vetrino[22]

Colorazioni di immagini istologiche

La fase di colorazione del preparato istologico è quella che permette di ottenere immagini chiare e distinguere le singole strutture che andranno poi analizzate dal patologo.

Esistono molte tecniche di colorazione dei tessuti utilizzate sia in ambito patologico che istologico, come ad esempio:

- Ematossilina-Eosina
- Tricromica di Mallory

- Tricromica di Masson
- PAS (acido periodico - reattivo di Schiff)

Tra le tecniche di colorazione elencate, Il gold standard da più di cento anni è la colorazione con ematossilina e eosina.[23].

Le immagini fornite per il lavoro di tesi hanno una colorazione ottenuta con la reazione PAS che verrà dunque descritta più approfonditamente.

Colorazione PAS

La reazione PAS (*acido periodico - reattivo di Schiff*) è una reazione istochimica che evidenzia, colorandoli in rosso magenta, componenti tessutali contraddistinti da gruppi glicolici o aminoidrossilici adiacenti. Questa tecnica evidenzia maggiormente componenti glucidici del glicocalice, della membrana basale, della mucina e dell'eparina. La presenza di gruppi carbossilici o solforici può bloccare la reattività dei gruppi glicolici nella reazione PAS e per questo alcuni glucidi (in particolare GAG acidi o solforati) non vengono evidenziati (per renderli visibili si utilizza spesso l'Alcian blu al posto della reazione PAS).

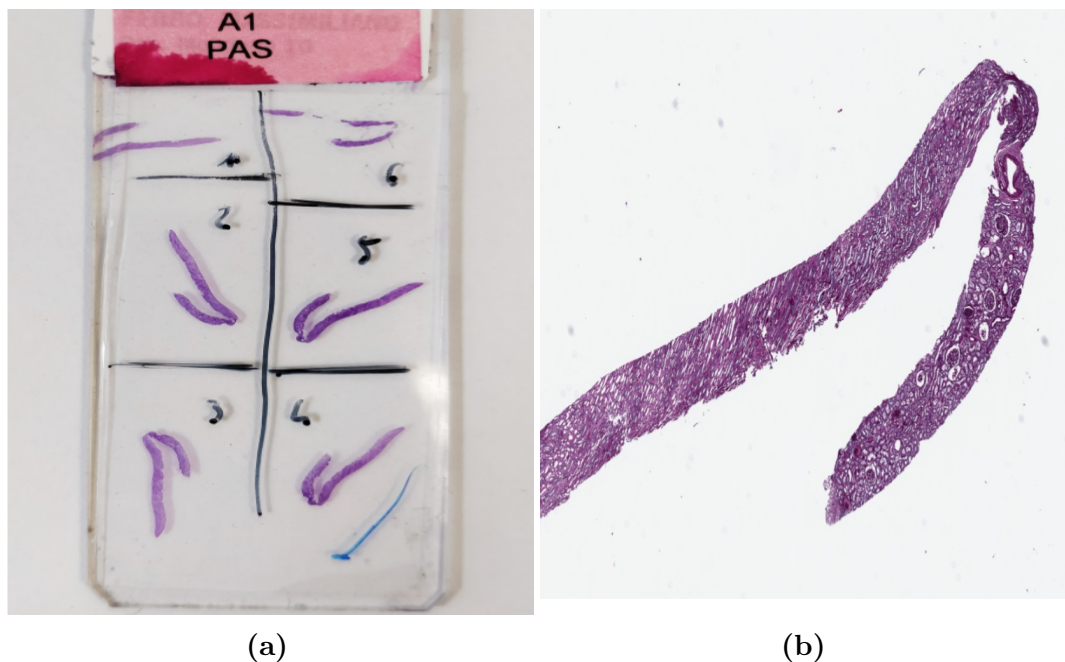


Figura 1.5: a) Vetrino con tessuti colorati con reazione PAS. b) Zoom su un frustino del vetrino in figura 1.5a

1.2.2 Score di Karpinski

Analizzando al microscopio ottico i tessuti preparati su vetrino ,il patologo deve attribuire dei punteggi al rene in base al quali si deciderà se trapiantarli e, in caso affermativo, se effettuare un trapianto singolo oppure doppio (ovviamente anche in base alle compatibilità clinica con il paziente ricevente). A questo proposito, per standardizzare la valutazione istologica pre-trapianto dei reni di donatori marginali, è stato proposto da un gruppo internazionale di patologi uno specifico sistema di classificazione sulla biopsia pre-impianto, noto come *"score di Karpinski"*[24]. Questo score prende in considerazione, nel campione prelevato, le percentuali di:

- Sclerosi glomerulare
- Atrofia tubulare
- Fibrosi intersiziale
- Riduzione del calibro dei vasi

A ciascuna delle variabili istologiche elencate viene assegnato un punteggio compreso tra 0 (assenza di lesioni) e 3 (marcate alterazioni) (tabella 1.1). Ogni rene può ricevere dunque un punteggio tra 0 e 12 dato dalla somma dei singoli score. Secondo i criteri di allocazione proposti da Remuzzi et al., reni con punteggio pari o inferiore a 3 risultano presumibilmente contenere un numero sufficiente di nefroni vitali per poter essere impiegati in trapianti singoli; quelli con punteggio pari a 4, 5 o 6 sono utilizzati per trapianti doppi, assumendo che la somma dei nefroni vitali contenuti in ciascuno di essi raggiunga il numero contenuto in un rene ideale; reni con punteggio pari o superiore a 7 sono invece scartati, considerando che nemmeno in combinazione raggiungerebbero un numero di nefroni sufficiente a far fronte alle richieste metaboliche del ricevente[25]. Il valore predittivo dello score di Karpinski è stato anche valutato a lungo termine da uno studio prospettico che ha mostrato che i reni trapiantati classificati in base a questo score, nelle metodologie suggerite da Remuzzi et al. hanno una sopravvivenza simile a quella dei reni singoli ricevuti da donatori "ideali" e molto superiore a quella dei reni ricevuti da donatori marginali allocati sulla base di criteri clinici, senza ricorrere alla biopsia prima dell'impianto. Il

Score di Karpinski	
Score glomerulare	
0	non ci sono glomeruli sclerotici globalmente
1	sclerosi glomerulare globale < 20%
2	20% < sclerosi glomerulare globale < 50%
3	sclerosi glomerulare globale > 50%
Score tubulare	
0	non ci sono tubuli atrofici globalmente
1	tubuli affetti da atrofia < 20%
2	20% < tubuli affetti da atrofia < 50%
3	tubuli affetti da atrofia > 50%
Fibrosi interstiziale	
0	assenza di tessuto renale sostituito da fibrosi
1	tessuto renale sostituito da fibrosi < 20%
2	20% < tessuto renale sostituito da fibrosi < 50%
3	tessuto renale sostituito da fibrosi > 50%
Score Vascolare*	
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

Tabella 1.1: Score di Karpinski.

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

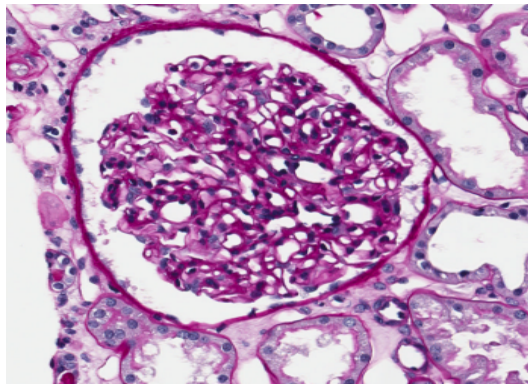
lavoro di tesi si concentra sulle prime due patologie renali sopraelencate, ovvero la glomerulosclerosi e l'atrofia tubulare.

1.2.3 Glomerulosclerosi

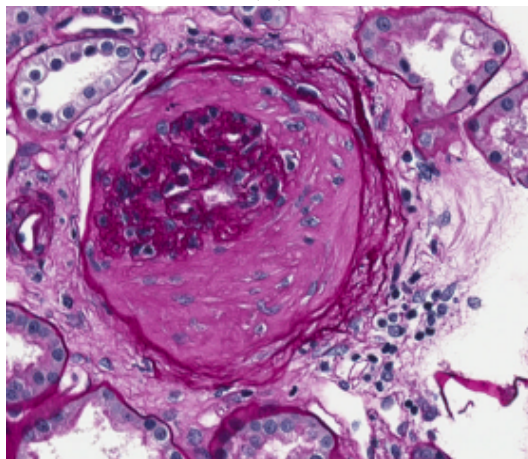
La *glomerulosclerosi* segmentaria e focale indica una lesione istologica aspecifica che interessa parte del glomerulo e parte dei glomeruli[26] e ne provoca un cambiamento istologico e morfologico. La ialinosi interessa solo una parte (glomerulosclerosi segmentaria) di meno del 50% (glomerulosclerosi focale) dei glomeruli nel frammento biotico prelevato. Può presentarsi in due forme,

una primitiva che identifica generalmente una patologia associata a sindrome nefrosica con una tendenza a progredire verso l'insufficienza renale cronica, una secondaria, la cui evoluzione varia notevolmente in relazione alla patologia primitiva che l'ha causata (HIV, diabete mellito, malattia di Fabry, sialidosi e malattia di Charcot-Marie-Tooth) [27].

A livello glomerulare si nota un accumulo di materiale ialino acellulare sub-endoteliale e il distacco tipico dei podociti dalla membrana basale; le anse che originano dai glomeruli interessati sono spesso collassate. A livello di microscopia ottica l'evidenza più grande è il collasso della matassa capillare del glomerulo come si vede in figura 1.6.



(a)



(b)

Figura 1.6: a) Glomerulo sano in immagine istologica colorata con PAS. b) Glomerulo sclerotico in immagine istologica colorata con PAS

Score glomerulare

Per valutare lo score glomerulare il patologo effettua una conta dei glomeruli sclerotici sul totale dei glomeruli presenti nella biopsia. Vediamo in figura 1.7 un esempio di individuazione da parte di un patologo dei glomeruli sani e di quelli sclerotici su un frustino di una biopsia renale.

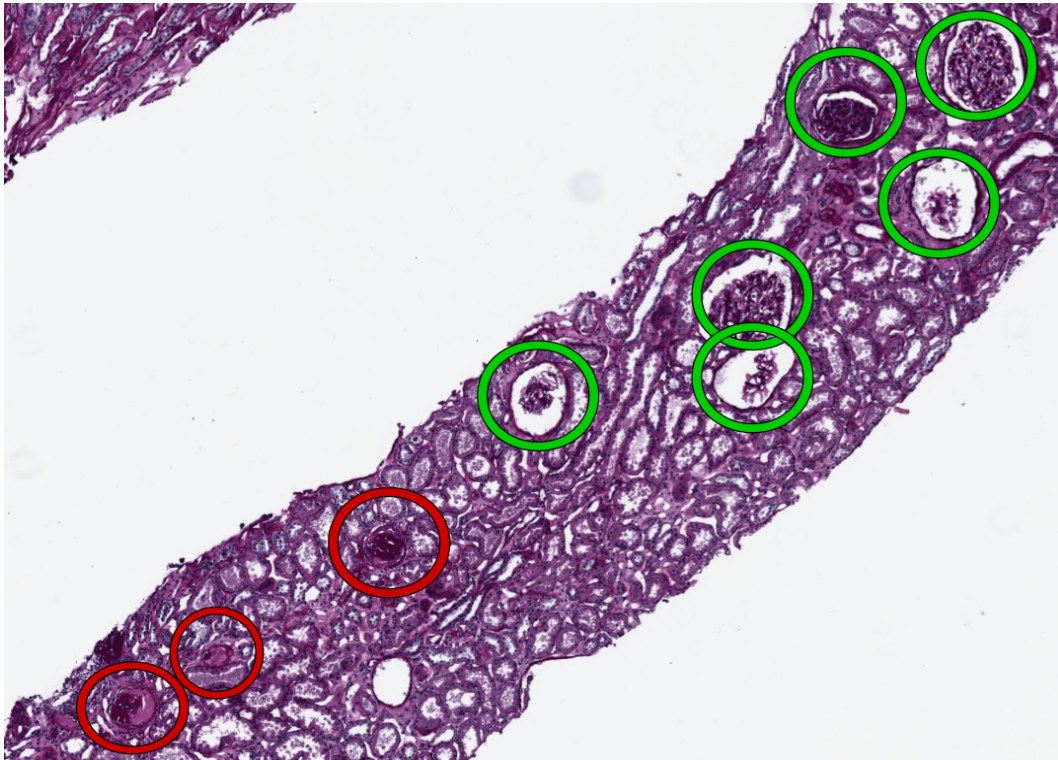
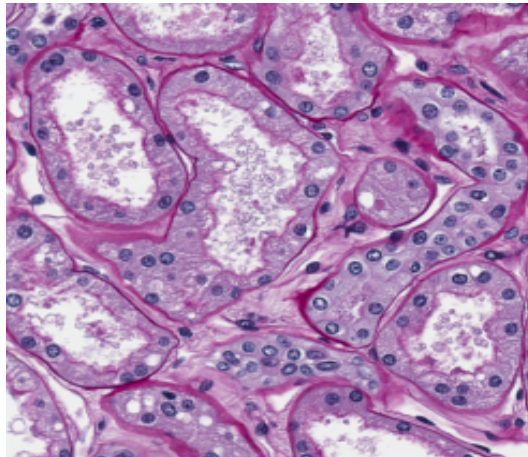


Figura 1.7: Esempio di conta manuale di glomeruli sclerotici e sani da parte di un patologo su un frustino. In verde i glomeruli sani, in rosso quelli sclerotici.

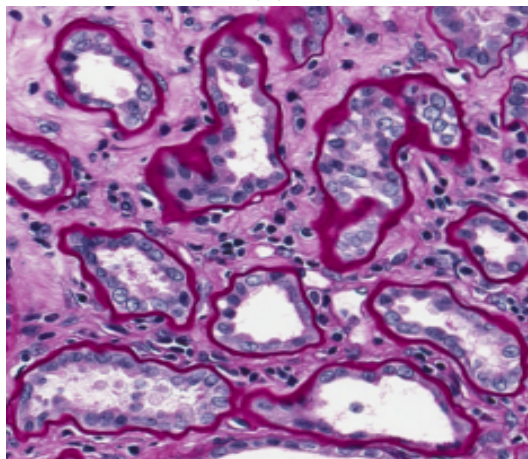
1.2.4 Atrofia tubulare

L'*atrofia tubulare* è causata da una patologia, detta *nefrite tubulo-interstiziale*, quando questa insorge nella sua forma cronica. La nefrite tubulo-interstiziale è infatti un danno primario ai tubuli renali e all'interstizio e può manifestarsi in due forme: 1) la forma acuta che è il più delle volte dovuta a reazioni allergiche da farmaci o a infezioni 2) La forma cronica che si verifica per diverse cause, tra cui disturbi genetici o metabolici, l'uropatia ostruttiva e l'esposizione cronica

a tossine ambientali o ad alcuni farmaci ed erbe.[28] Nei tubuli si genera una modificazione istologica che può essere visibile analizzando una biopsia renale al microscopio ottico. I lumi tubulari, infatti, variano in diametro, e possono mostrare una marcata dilatazione con formazione di cilindri omogenei come si può vedere nella figura 1.8.



(a)



(b)

Figura 1.8: a) Esempi di tubuli sani in immagine istologica colorata con PAS. b) Esempi di tubuli atrofici in immagine istologica colorata con PAS.

Score tubulare

Per valutare lo score tubulare il patologo cerca di quantificare i tubuli atrofici sulla totalità dei tubuli presenti come si può vedere nella figura 1.9

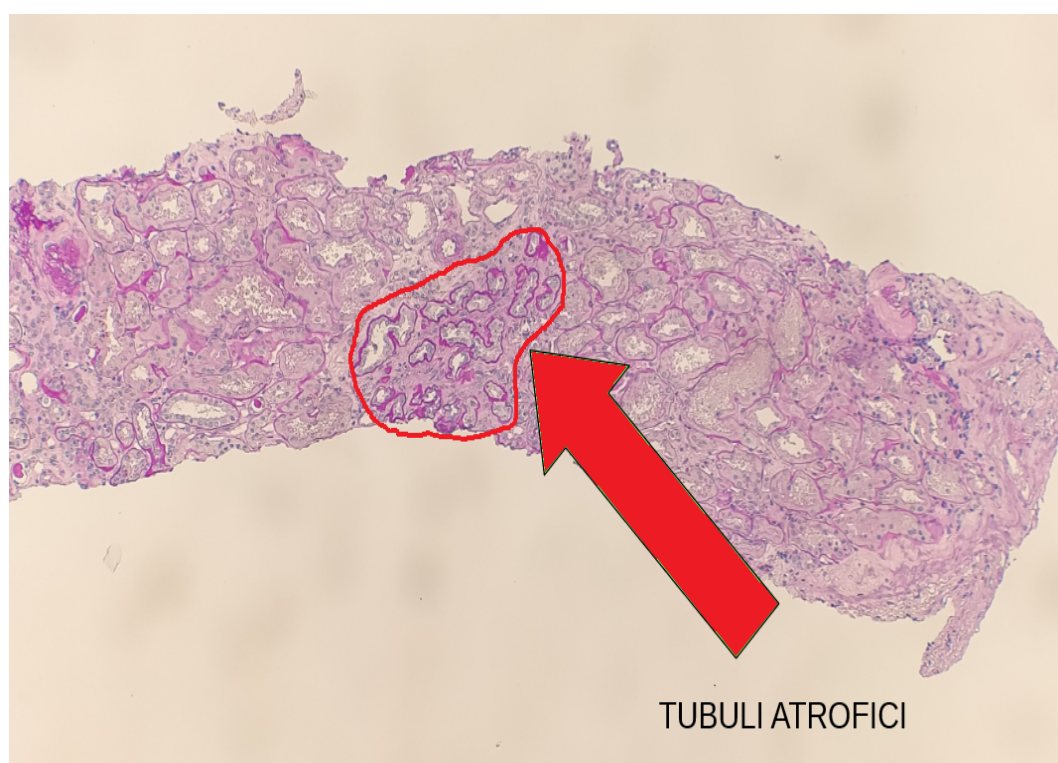


Figura 1.9: Esempio di identificazione di tubuli atrofici da parte del patologo in un frustino colorato con reazione PAS

Capitolo 2

Materiali e Metodi

Come spiegato precedentemente, la tesi si pone l'obiettivo di quantificare le strutture che il patologo identifica per la definizione dello *score glomerulare* e dello *score tubulare*. Quindi si propone un algoritmo per l'individuazione e la quantificazione di:

- Glomeruli sani e sclerotici
- Tubuli sani e atrofici

Il riconoscimento delle strutture è applicato ad immagini, tutte di stessa dimensione, estratte dalla *Whole slide image*, ovvero l'immagine digitalizzata dell'intero vetrino della biopsia della quale il patologo deve valutare gli score descritti in tabella 1.1. Non è compito di questa tesi, ma una naturale estensione di essa, definire gli score sull'intera biopsia.

In questo capitolo si descrive il dataset utilizzato per lo sviluppo e la successiva validazione dell'algoritmo. Si analizzano poi i vari macroblocchi che lo compongono per individuare le strutture nell'immagine. L'algoritmo si compone di due pipeline, una per i glomeruli e una per i tubuli. Entrambe le pipeline prevedono l'utilizzo di una rete neurale convoluzionale (CNN) le cui modalità di allenamento e testing verranno approfondite insieme ai vari metodi utilizzati per segmentare e classificare glomeruli sani, glomeruli sclerotici, tubuli sani e tubuli atrofici. Infine si propongono le metriche di validazione utilizzate per quantificare la corretta individuazione delle strutture.

2.1 Dataset

Sono state fornite dall'Azienda Ospedaliero-Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino vetrini digitalizzati di intere biopsie renali di 12 pazienti diversi effettuate nell'anno 2018. La colorazione dei campioni è ottenuta con la reazione PAS e le WSIs in formato .svs sono state ricavate digitalizzando l'intero vetrino tramite AperioScanscope XT. Questa codifica rappresenta lo standard della maggior parte dei microscopi digitali, tra i più importanti troviamo Aperio ScanScope XT Slide Scanner[29]. I file in formato .svs possono essere visualizzati ed elaborati utilizzando il software ImageScope di Aperio (figura 2.1).

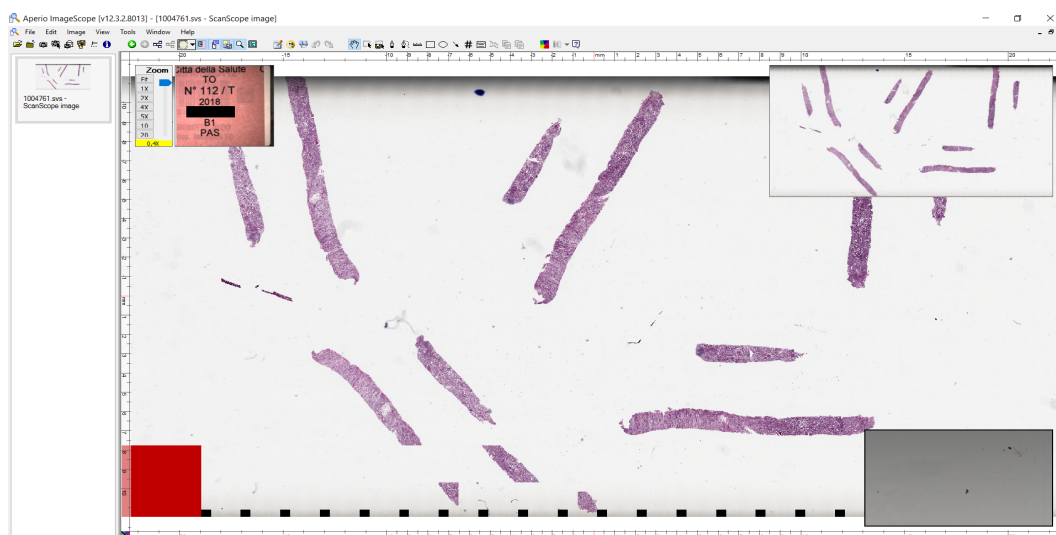


Figura 2.1: WSI in formato .svs visualizzata in ambiente Aperio ImageScope

Per analizzare le strutture si hanno a disposizione diversi possibili ingrandimenti. La biopsia può essere visualizzata a partire da una risoluzione minima (ingrandimento 1X) fino alla una massima risoluzione consentita (ingrandimento 20X).

Dalla intere immagini delle biopsie dei diversi pazienti sono state estratte complessivamente 620 immagini con le seguenti caratteristiche, come possiamo vedere nell'esempio riportato in figura 2.2 :

- Dimensioni: 512x512

- Risoluzione: 10x
- Formato: .tif

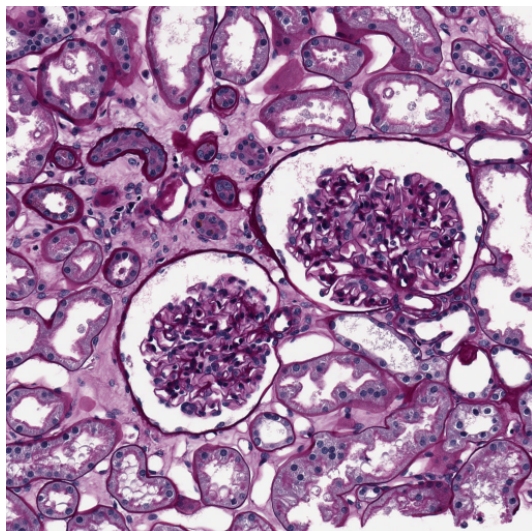


Figura 2.2: Immagine di dimensioni 512x512 estratta dalla WSI ad ingrandimento 10x.

Le immagini sono state selezionate cercando di evitare zone affette da artefatti creatisi in fase di preparazione del vetrino (come ad esempio inclusioni di oggetti estranei al preparato, bolle d'aria che si formano tra il vetrino anteriore e quello posteriore) che alterano la corretta visualizzazione dei tessuti.

Seguendo le indicazioni di un esperto patologo, sono state effettuate le annotazioni manuali delle strutture prese in esame dal lavoro di tesi, creando il "Ground Truth" utile per l'allenamento delle reti neurali convoluzionali e per la successiva validazione dell'algoritmo. L'algoritmo è diviso in due pipeline sviluppate su due dataset di diversa numerosità:

- Nel caso dei glomeruli le due strutture da identificare (glomeruli sani e glomeruli sclerotici) sono state annotate in tutte le 620 immagini estratte dalle WSI. Totalmente sono stati individuati 500 glomeruli sani e 65 sclerotici.
- Nel caso dei tubuli le due strutture da identificare (tubuli sani e tubuli atrofici) sono state annotate in 209 immagini delle 620 estratte dalle WSI. Totalmente sono stati individuati 10232 tubuli sani e 525 tubuli atrofici.

Vediamo due esempi di annotazioni manuali per glomeruli e tubuli in figura 2.3.

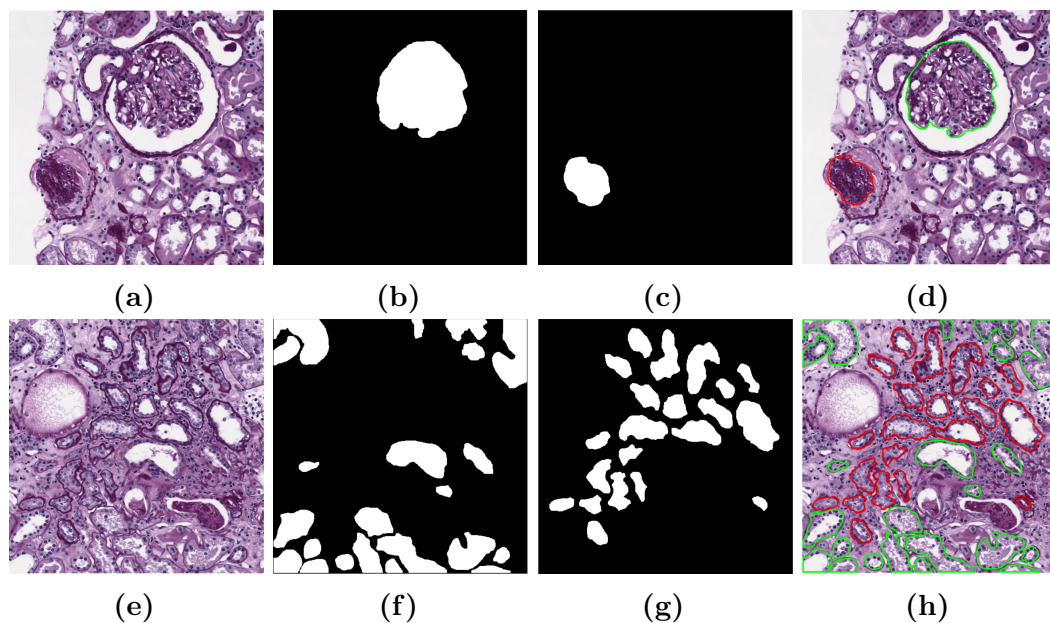


Figura 2.3: a) Immagine estratta con un glomerulo sano e uno sclerotico. b) Maschera manuale del glomerulo sano. c) Maschera manuale del glomerulo sclerotico. d) Immagine annotata manualmente (in rosso lo sclerotico in verde il sano). e) Immagine estratta con tubuli sani e atrofici. f) Maschera manuale dei tubuli sani. g) Maschera manuale dei tubuli atrofici. h) Immagine annotata manualmente (in rosso gli atrofici in verde i sani).

2.2 Architettura dell'algoritmo

L'architettura generale dell'algoritmo proposto viene riportata in figura 2.4.

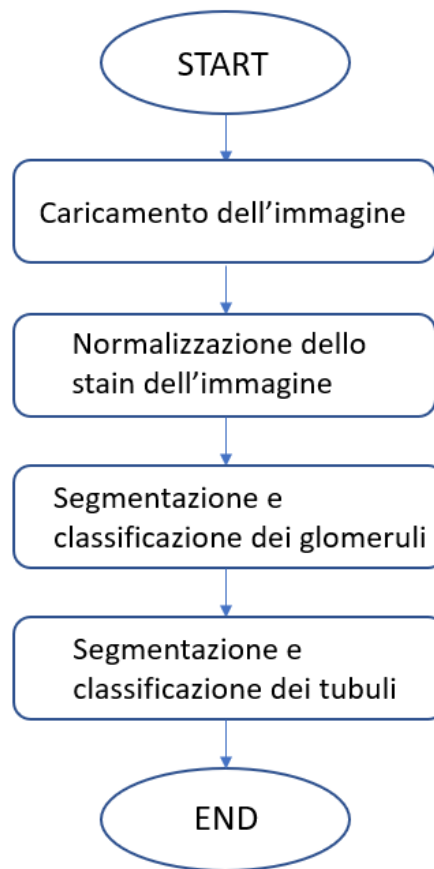


Figura 2.4: Struttura logica dell'algoritmo proposto

Presa in input una singola immagine del dataset, il primo step da eseguire è quello della normalizzazione dello stain. Questo step consiste nell'adattamento del colore dell'immagine di input al colore di una immagine del dataset che è stata scelta come *target*. Viene utilizzato lo stesso target per tutte le immagini del dataset ed il motivo di questa operazione è quello di abbattere la variabilità dovuta a possibili colorazioni di diversa intensità delle biopsie dei pazienti ottenute con la reazione PAS. Inoltre l'algoritmo prevede l'utilizzo di reti neurali convoluzionali che sono allenate al riconoscimento di immagini normalizzate sul target scelto. A questo punto vengono eseguite le due pipeline che portano all'identificazione delle diverse strutture:

1) Nel caso dei glomeruli, dopo aver allenato una CNN(con le modalità che

verranno descritte nel corso di questo capitolo) al riconoscimento di glomeruli sani e glomeruli sclerotici, si lavora sull'output della rete che fornisce le probabilità di riconoscimento delle due strutture e si esegue un postprocessing sull'immagine per identificarle in maniera corretta.

2) Nel caso dei tubuli la rete neurale convoluzionale viene allenata sul riconoscimento del lume e dei contorni dei tubuli non distinguendo tra atrofici e sani. Pertanto si provvede alla segmentazione dei tubuli atrofici utilizzando un metodo euristico che si basa sull'amplificazione del colore del contorno di questi tubuli (molto più scuro di quello dei sani). Sfruttando invece l'output della CNN e la scomposizione dei colori principali delle immagini si provvede all'identificazione dei tubuli sani.

2.3 Introduzione sulle Reti Neurali Convoluzionali (CNN)

Prima di procedere alla descrizione in dettaglio dell'algoritmo, è necessaria un'introduzione sul funzionamento delle *Reti Neurali Convoluzionali* utilizzate sia per identificare i glomeruli sia per identificare i tubuli. In particolare ci si sofferma sull'architettura della AlexNet e sulle modalità di Transfer Learning. Una rete neurale convoluzionale (CNN o ConvNet) è una rete artificiale feed-forward e profonda che molto spesso è utilizzata per l'analisi delle immagini visive. Il pattern di connettività tra i suoi neuroni è ispirato all'organizzazione della corteccia visiva animale, i cui neuroni individuali sono disposti in maniera tale da rispondere alle regioni di sovrapposizione che tassellano il campo visivo[30]. Il principio di funzionamento non differisce da quello di una normale rete neurale, la CNN è composta da neuroni che ricevono un input e forniscono un output secondo diverse possibili funzioni di attivazione. Ogni neurone è composto da pesi (W) e biases (b) che sono i parametri che vengono modificati durante l'allenamento della rete attraverso una propagazione all'indietro dell'errore tra l'output generato e quello atteso, col fine di minimizzare quella che è definita "funzione obiettivo" o funzionale d'errore:

$$J(W, b) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m L(\hat{y}_i, y_i) \quad (2.1)$$

dove L è la funzione di perdita tra l'output \hat{y}_i ottenuto dall' i -esimo input e l'output atteso y_i .

Il motivo per cui le CNN sono più vantaggiose rispetto ad una semplice rete neurale quando l'input è un'immagine, è che a differenza della rete neurale gli strati di una CNN hanno i neuroni che sono disposti in 3 dimensioni: larghezza, altezza e profondità. I neuroni in uno strato della CNN sono connessi ad una piccola regione dello strato precedente, invece di essere connessi a tutti i neuroni dello strato precedente come avviene nel caso della Rete Neurale classica. Questo rende la CNN particolarmente adatta agli input volumetrici (come nel caso dell'immagine composta dagli strati rosso, verde e blu) perchè permette di contenere il numero dei parametri (pesi e biases) da modificare che altrimenti sarebbe smisuratamente elevato. Vediamo la differenza in figura 2.5

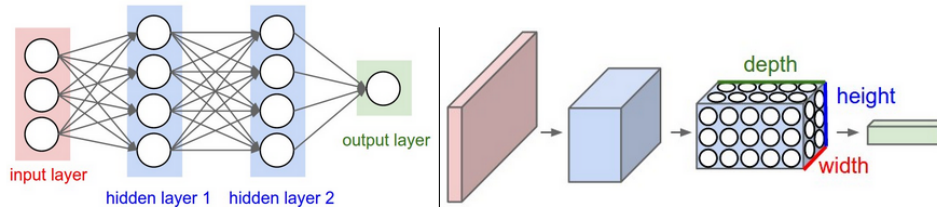


Figura 2.5: Differenza tra gli strati di rete neurale classica (a sinistra) e di una CNN (a destra)[31]

Generalmente una CNN è costituita da due blocchi principali: *Blocco convoluzionale* e *Classificatore*.

Il blocco convoluzionale ha il compito di generare le caratteristiche dall'immagine, partendo da caratteristiche più generiche nei primi strati per arrivare a quelle più specifiche. I principali strati che lo costituiscono sono i seguenti:

- *Strato convoluzionale*. Questo è lo strato principale di una CNN. I parametri di uno strato convoluzionale consistono in una serie di *filtri* che hanno solitamente piccole dimensioni di altezza e larghezza ma la stessa profondità del volume di input (ad esempio ad un input di dimensioni $m \times m \times s$ devono corrispondere filtri di dimensioni $n \times n \times s$). Ogni filtro viene convoluto lungo la larghezza e l'altezza del volume di input fornendo in output il prodotto scalare tra i propri pesi e i valori di ogni regione locale dell'input delle dimensioni equivalenti al filtro. Facendo scorrere il

filtro lungo il volume in questo modo si crea una mappa di attivazione 2D che rappresenta gli output del filtro per ogni regione locale dell'input su cui si è mosso. La profondità dell'output dipenderà dal numero di filtri, poichè tutti quelli che vengono applicati producono una mappa di attivazione 2D che verrà concatenata con quella prodotta da un altro filtro. Pertanto lo strato convoluzionale è costituito da una serie di neuroni ognuno connesso ad una singola regione di input. L'estensione spaziale di questa connettività è il "campo recettivo" del neurone: l'altezza e la larghezza sono identiche alla dimensione del filtro, mentre l'estensione spaziale lungo l'asse della profondità è sempre uguale alla profondità del volume d'ingresso. Il volume di output derivante dall'intera convoluzione dipende dalla scelta di tre *iperparametri*:

- 1) *numero di filtri*. Parametro che corrisponde alla profondità del volume di output.
- 2) *stride*. Parametro che specifica quanto il filtro si muoverà sul volume di input nella convoluzione. Se lo stride è 1 allora il filtro si muoverà di un pixel alla volta, se lo stride è n si muoverà di n pixel alla volta generando output spazialmente più piccoli.
- 3) *padding*. Parametro che permette di controllare la dimensione spaziale dell'output aggiungendo degli zeri intorno alla matrice di input così da poter avere un output spaziale più ampio dopo la convoluzione.

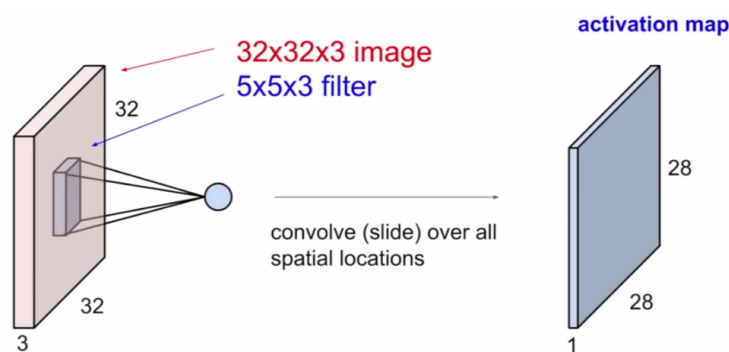


Figura 2.6: Esempio di convoluzione di un filtro su un volume di input. Ogni neurone è collegato ad un campo recettivo del volume di input[32].

- *Strato di pooling*. E' uno strato utilizzato per ridurre il numero dei parametri e il tempo computazionale della rete. Lo strato di pooling

ridimensione spazialmente l'input scorrendo lungo le regioni d'interesse come nel caso dello strato convoluzionale ma applicando o un'operazione di massimo ("*max pooling*") o un'operazione di media ("*average pooling*"). La profondità dell'output resta quindi invariata.

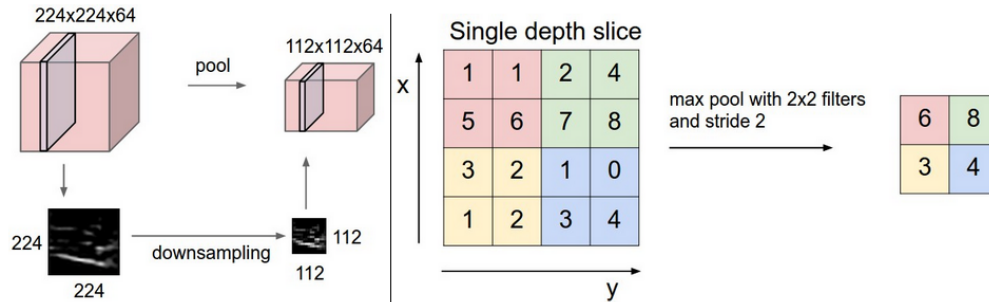


Figura 2.7: esempio di max pooling su un volume di input[31]

- *Strato di attivazione.* Strato che applica al proprio input una funzione di attivazione per ottenere un nuovo output. La funzione più utilizzata è la ReLU: $f(x) = \max(0, x)$.

Il classificatore normalmente è composto generalmente da uno *Strato completamente connesso*. I neuroni in questo strato sono connessi a tutte le attivazioni dello strato precedente, come nelle reti neurali classiche. Lo scopo principale di questo blocco dell'aCNN è quello di classificare l'immagine in base alle caratteristiche che sono state individuate dal blocco convoluzionale.

2.3.1 AlexNet e metodo del Transfer Learning

La AlexNet è una CNN con un'architettura molto profonda (figura 2.8) proposta da Alex Krizhevsky, Ilya Sutskever, and Geoffrey E. Hinton[33]. La rete neurale convoluzionale AlexNet è stata creata per la classificazione di 1,2 milioni di immagini ad alta risoluzione nel concorso ImageNet LSVRC-2010. L'input dell'AlexNet è generalmente un'immagine di dimensioni 256x256x3. La rete prevede 60 milioni di parametri e 650.000 neuroni ed è costituita da 5 *strati convoluzionali* alcuni dei quali sono *strati di max pooling* e da 3 *strati completamente connessi*, l'ultimo dei quali è collegato ad una *softmax*, ovvero un

classificatore che in questo caso è un vettore di 1000 elementi che rappresenta la probabilità che l'immagine di input appartenga a una delle 1000 classi. Dopo ogni strato convoluzionale e ogni strato completamente connesso è applicato uno strato di attivazione non lineare ReLU.

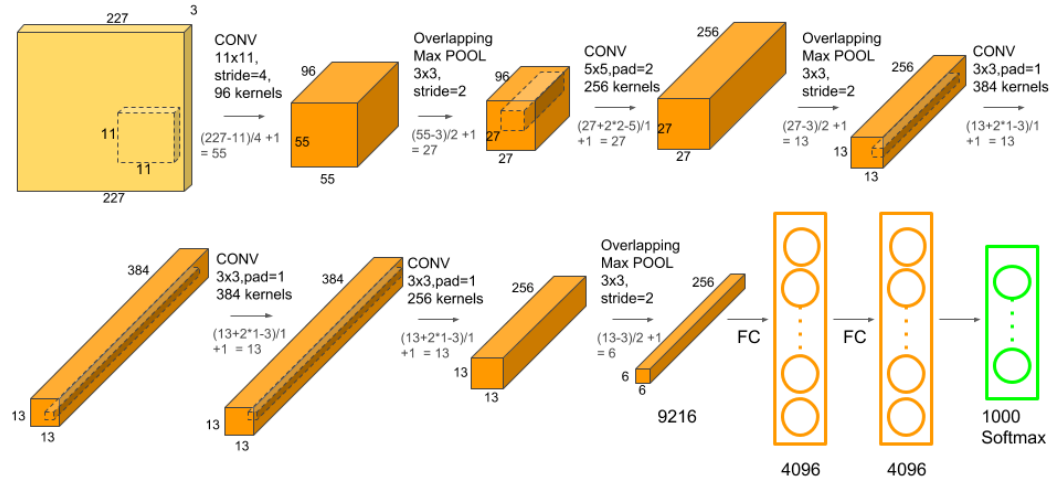


Figura 2.8: Struttura della AlexNet[34].

Per poter utilizzare una rete pre-allenata su un altro tipo di task è possibile utilizzare un metodo noto come *Transfer Learning*[35]. E' un approccio molto utilizzato in *machine learning* perchè consente di risparmiare sul tempo computazionale e di ottenere comunque dei buoni modelli.[36]. In *Computer Vision* nel deep learning, il transfer learning consiste spesso nell'uso di modelli pre-allenati, ovvero modelli addestrati su un set di dati di riferimento di grandi dimensioni che riguardano però un task simile a quello che viene preso in analisi[37]. Quando si costruisce una rete su un modello pre-allenato innanzitutto bisogna rimuovere il classificatore originale e aggiungere un classificatore adatto allo scopo che si vuole raggiungere. Dopo di che bisogna trovare il miglior modo di allenamento possibile secondo tre possibili strategie come si può vedere in figura 2.9 :

- Allenare l'intero modello. In questo caso si usa l'architettura del modello pre-allenato e lo si allena sul proprio dataset.

- Allenare qualche strato e lasciare gli altri "congelati". Gli strati più bassi del blocco convoluzionale generano le features delle immagini indipendenti dal problema specifico, mentre gli strati più alti si riferiscono al problema specifico. Gli strati congelati non cambiano durante l'allenamento della rete.
- Si "congela" l'intera base convoluzionale della rete pre-allenata. Si utilizza solamente nel caso in cui il problema da risolvere sia simile a quello risolto dal modello pre-allenato.

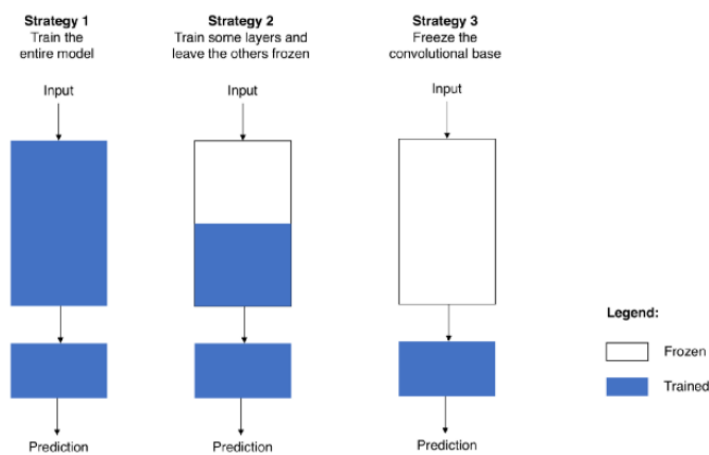


Figura 2.9: Modalità di transfer learning[38]

La rete utilizzata nel lavoro di tesi si basa sul primo modello di transfer learning descritto, si utilizza cioè una AlexNet pre-allenata e modificata nella maniera che verrà successivamente descritta.

2.3.2 CNN per segmentazione semantica

La rete utilizzata per questo lavoro di tesi si fonda sulla struttura base della AlexNet (figura 2.8) pre-allenata per classificare in mille categorie diverse immagini di input di dimensioni $227 \times 227 \times 3$. Però tale rete deve essere modificata con lo scopo di effettuare non classificazione delle immagini ma *segmentazione semantica* su immagini di dimensioni $512 \times 512 \times 3$. Lo scopo della segmentazione

semantica di immagini è quello di attribuire una classe ad ogni pixel dell'immagine. Poichè si crea una predizione per ogni pixel dell'immagine, questo tipo di task è spesso definito *predizione densa*[39]. Quindi l'immagine che si vuole ottenere è un'immagine ad alta risoluzione (delle stesse dimensioni dell'input) in cui ogni pixel sia associato ad una classe. Per poter far questo bisogna introdurre l'operazione di *Convoluzione trasposta*. Lo strato convoluzionale trasposto ha un funzionamento simile allo strato convoluzionale descritto precedentemente, ma lo scopo è quello di aumentare la risoluzione degli output fino ad ottenere un'immagine delle stesse dimensioni dell'input della rete in cui ogni pixel abbia una classe. Per tanto una rete di segmentazione semantica (esempio in figura 2.10) è costituita da tre blocchi principali:

- *Blocco convoluzionale*. Utile per estrarre le caratteristiche delle immagini.
- *Blocco convoluzionale trasposto*. Ricampiona l'immagine alla dimensione iniziale.
- *Classificatore*. Classifica ogni pixel in base alla possibilità che appartenga ad una determinata classe. Lo strato softmax ha dunque le stesse dimensioni in altezza e larghezza dell'immagine di input e una profondità pari al numero delle classi.

L'operazione di convoluzione trasposta semplicemente è inversa all'operazione di convoluzione. L'operazione di convoluzione crea una relazione tra una matrice (campo recettivo) e un numero, mentre l'idea alla base della convoluzione trasposta è quella di invertire la direzione di questa operazione.

Si può ottenere infatti lo stesso risultato della convoluzione tra un input e un kernel attraverso un prodotto tra matrici riformalizzando l'input sotto forma di vettore e riarrangiando il kernel sotto forma di matrice (utilizzando zero-padding in zone differenti) in maniera tale che ogni riga di questa matrice corrisponda ad una operazione di convoluzione che si voleva effettuare. La moltiplicazione tra questa matrice e il vettore di input risulterà in un vettore che riadattato su una matrice quadrata darà lo stesso output della convoluzione iniziale. Quindi in breve un'operazione di convoluzione può essere espressa utilizzando una matrice di convoluzione. Il risultato inverso si può ottenere trasponendo la matrice di convoluzione e facendo lo stesso percorso descritto all'inverso. Si

ottiene così un ricampionamento di un input che farà corrispondere ad un pixel un campo recettivo di dimensioni maggiori[40].

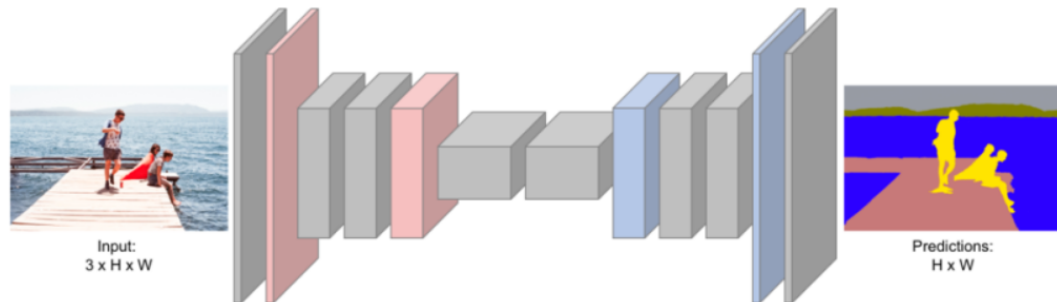


Figura 2.10: Struttura di una rete per segmentazione semantica. In input un'immagine e in output una predizione per ogni pixel[41]

2.3.3 Problema dell'overfitting

Un problema di cui bisogna tenere conto quando si allena una rete neurale convoluzionale è quello dell' *overfitting* dei dati. Ci si riferisce cioè alla situazione in cui il modello si adatta bene ai dati su cui viene allenato ma non riesce a generalizzare per poter fare predizioni attendibili su nuovi dati. Ci sono alcuni metodi con i quali è possibile provare a prevenire l'overfitting.

- Divisione del dataset che si ha a disposizione in 3 parti: 1) *Training Set* 2) *Validation Set* 3) *Test Set*. Il modello si allenerà solamente sui dati del Training set e validato sul Validation set, e poi le performance verranno valutate anche sul Test set composto da dati che la rete non ha mai visto durante l'allenamento. La divisione più comune della numerosità dei tre dataset è quella di assegnare il 60% del totale dei dati al training e dividere in maniera uguale il restante 40% tra validation e test. Però la scelta dipende molto dalla quantità di dati che si ha a disposizione per allenare la rete. Se si dovessero avere milioni di dati anche una divisione 98%/1%/1% porterebbe ad una numerosità di dati sufficiente per test e validation. Valutare le differenti prestazioni sui dati di test e su quelli di training ci permette di capire se la rete è in grado di generalizzare le predizioni sui dati oppure no.

- Aumento dei dati di training. Più dati vengono utilizzati per allenare la rete più diminuisce la probabilità di overfitting poichè la rete non riesce ad aderire alla vastità del dataset e deve generalizzare. Per ingrandire il training set, nel caso in cui i dati siano delle immagini, è possibile applicare delle trasformazioni all'input come ad esempio rotazioni, traslazioni, aggiunte di rumore, deformazioni. In questo modo si forniscono molti più dati in ingresso alla rete.
- Ridurre la complessità del modello. Il modello deve essere abbastanza semplice da prevenire l'overfitting ma allo stesso tempo deve avere la complessità necessaria per allenarsi nella maniera corretta.
- Terminazione anticipata dell'allenamento. Generalmente un modello di rete neurale convoluzionale inizia ad allenarsi bene sui dati che gli vengono forniti e ad un certo punto inizia ad adattarsi troppo a quei dati. Viene dunque impostato un limite di iterazioni durante il quale non viene registrato alcun progresso sul validation set. Se questo valore viene superato l'allenamento termina anticipatamente.
- Regularizzazione. Comporta l'aggiunta di un elemento alla funzione di perdita che viene utilizzata per aggiornare i parametri della rete. La più comunemente utilizzata è la regularizzazione L2 che va a modificare la funzione d'errore 2.1 in questo modo:

$$J(W, b) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m L(\hat{y}_i, y_i) + \lambda \|w\|_2 \quad (2.2)$$

$$\|w\|_2 = \sum_{i=1}^n w_j^2 \quad (2.3)$$

Intuitivamente l'aggiornamento dei pesi sarà regolamentato dal parametro λ . L'lesimo strato della rete, se λ assume valori alti avrà dei pesi vicini allo zero, $w^l \simeq 0$ il che vuol dire che la rete viene notevolmente semplificata e sarà più facile prevenire l'overfitting dei dati.

- Regularizzazione con dropout. L'idea è quella di disattivare in maniera casuale neuroni (*dropout*) o connessioni (*dropconnect*) della rete durante

l'allenamento. Questa regolarizzazione forza la rete a non poter fare affidamento sempre sugli stessi neuroni per poter estrarre le caratteristiche dei dati. Alla fine dell'allenamento tutti i neuroni e le connessioni vengono ristabilite.

2.4 Normalizzazione dello stain dell'immagine

Il primo passo da eseguire per lo sviluppo dell'algoritmo è quello della normalizzazione della colorazione dell'immagine su quella di un target scelto. Il motivo di questa operazione è quello di abbattere la variabilità della colorazione che può presentarsi nella preparazione del vetrino. La CNN infatti viene allenata su immagini tutte normalizzate sullo stesso target in maniera tale da avere gli input in un range di valori simile e facilitare l'allenamento della rete. Pertanto ogni immagine prima di essere processata per l'individuazione delle strutture, dovrà essere normalizzata sul target scelto.

I tessuti, dopo essere stati prelevati dal paziente per le analisi, vengono trattati con delle colorazioni che hanno delle affinità specifiche per diverse sostanze biologiche. I coloranti utilizzati assorbono determinate lunghezze d'onda della luce, per questo i vetrini vengono osservati al microscopio illuminati dal basso. Le aree in cui il colorante ha aderito a delle sostanze biologiche del tessuto assorbono parte della luce, le aree in cui invece non c'è colorante risulteranno molto chiare. La proporzione di ciascuna lunghezza d'onda assorbita dal campione forma il *vettore colorazione*[42]. La colorazione può variare molto anche tra vetrini colorati allo stesso modo. Questo dipende dalla quantità relativa di colorante utilizzato nella preparazione del vetrino e poi anche dalla conservazione e successiva manipolazione del campione stesso che può portare ad un colore più sbiadito se, ad esempio, esposto troppo tempo alla luce[43].

Per poter eseguire la normalizzazione di un'immagine su un target è innanzitutto necessario stimare le colorazioni principali dei due preparati istologici. Il metodo seguito è quello proposto da Macenko et al. che si concentra su immagini colorate in ematossilina-eosina, ma che può essere applicato allo stesso modo alle immagini ottenute con colorazione PAS, che presentano due stain principali. Una volta stimati i colori dell'immagine si procederà alla normalizzazione.

2.4.1 Stima dei colori e normalizzazione usando Macenko

La quantità di luce assorbita da un campione biologico è in relazione con le proprietà del materiale secondo la legge di Lambert-Beer. Da un'immagine RGB si può ottenere una matrice di intensità $I \in R^{m,n}$ dove m è il numero di canali RGB (quindi 3) e n il numero di pixel su ogni canale. Definiamo poi la matrice dei vettori di colorazione $W \in R^{m,r}$, dove r indica il numero delle colorazioni principali (2 nel caso della colorazione PAS) e dove ogni colonna rappresenta la base del colore, in RGB, di ciascuna colorazione. Infine si può definire la matrice di concentrazione di ogni colorante $H \in R^{r,n}$ dove le righe indicano i valori di concentrazione per ogni pixel del colorante r -esimo. Detta I_0 l'intensità della luce incidente sul campione, si può scrivere:

$$I = I_0 10^{-WH} \quad (2.4)$$

Definendo la densità ottica di un'immagine come:

$$V = \log \frac{I}{I_0} \quad (2.5)$$

si può scrivere che

$$V = WH. \quad (2.6)$$

Partendo dunque dalla matrice V di densità ottica dell'immagine si cerca un metodo per trovare la matrice dei vettori di colorazione W e la matrice di concentrazione di ogni colorante H [43]. Per poter ottenere il vettore colorazione W di un'immagine innanzitutto la matrice d'intensità viene convertita da RGB a OD (*optical density*) secondo l'equazione 2.5. La matrice di intensità dei pixel trasformata in densità ottica è linearmente separabile ed è dunque possibile riuscire a calcolare le diverse colorazioni degli stain all'interno dell'immagine come si vede in figura 2.11.

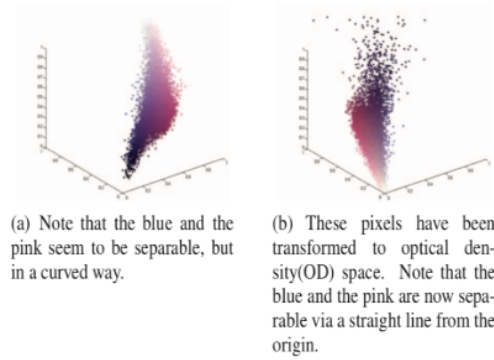


Figura 2.11: Ogni punto nello spazio 3D corrisponde ad un pixel selezionato in maniera casuale dall'immagine e colorato col colore originale in ematossilina-eosina.[43]

Si effettua poi un'operazione di sogliatura sulla matrice I in OD eliminando tutti i pixel con un'intensità inferiore ad una soglia scelta di $\beta = 0.15$ poichè le zone con un valore di densità ottica basso corrispondono a zone in cui il colorante non ha aderito.

Il passo successivo consiste nella scomposizione a valori singolari (SVD) della matrice d'intensità in OD. Si calcola il piano corrispondente ai due vettori con i valori singolari maggiori, e tutti i pixel della matrice d'intensità vengono proiettati su questo piano e successivamente normalizzati alla lunghezza unitaria. Si calcola a questo punto l'angolo tra ogni punto dei due vettori ottenuti rispetto alla prima direzione SVD andando alla ricerca di estremi robusti (scegliendo come minimo il α^{th} percentile dell'angolo e come massimo il $100 - \alpha^{th}$ percentile dell'angolo con $\alpha = 1$). A questo punto questi valori estremi vengono convertiti nello spazio OD. Si ottiene quindi la matrice W che contiene nelle colonne i valori RGB dei coloranti espressi da ogni riga. Nel caso della colorazione PAS la matrice appartiene allo spazio $R^{2,3}$. Seguendo poi l'equazione 2.6 si può ottenere la matrice H delle concentrazioni di ogni colorante.

Normalizzazione dell'immagine

Avendo dunque due immagini, una originale (s) e una di target (t) con colorazioni diverse, è possibile stimare le due matrici dei vettori colorazione W_s e W_t partendo dalle matrici di intensità trasformate in Densità Ottica V_s

e V_t , per poi ottenere H_s e H_t dall'equazione 2.6. A questo punto si vuole normalizzare la colorazione dell'immagine originale su quella dell'immagine di target combinando la matrice di concentrazione dei coloranti di s H_s con la matrice dei vettori di colorazione di t W_t [44]. Il porcedimento può essere descritto secondo questi passi:

$$H_s^{norm}(j, :) = \frac{H_s(j, :)}{H_s^{RM}(j, :)} H_t^{RM}(j, :), j = 1, \dots, r \quad (2.7)$$

$$V_s^{norm} = W_t H_s^{norm} \quad (2.8)$$

$$I_s^{norm} = I_0 10^{-V_s^{norm}} \quad (2.9)$$

dove r sono i coloranti utilizzati (2 nel nostro caso), e $H_i^{RM} = RM(H_i)$ con $i=(s,t)$ e $H_i \in R^{r,1}$ è il vettore ottenuto compiendo il 99% percentile di ogni vettore della matrice H . Moltiplicare la matrice di concentrazione dei coloranti normalizzata dell'equazione 2.7 di per la matrice dei vettori colorazione del target W_t permette di conservare le colorazioni originali in termini di densità e ne modifica la colorazione rendendole più simile al target.

Un esempio di immagine normalizzata viene riportata in figura 2.12.

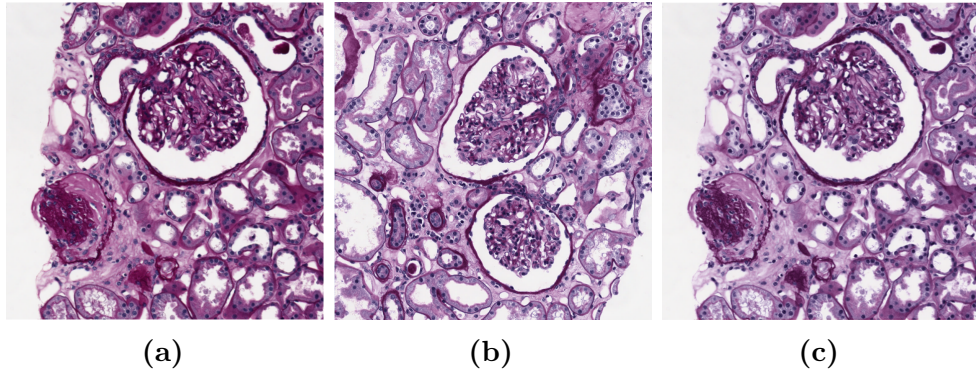


Figura 2.12: a)Immagine originale. b)Target. c)Immagine normalizzata.

2.5 Segmentazione e classificazione dei glomeruli

Si descrivono ora tutti i passi seguiti per arrivare ad una segmentazione dei glomeruli sani e dei glomeruli sclerotici. Si parte dall'architettura della CNN utilizzata e dalla sua modalità di allenamento per poi descrivere il resto del processing attuato per arrivare al risultato.

2.5.1 Struttura e allenamento della rete

Partendo dalla struttura della AlexNet (figura 2.8) la rete utilizzata è stata modificata al fine di ottenere una struttura in grado di fare segmentazione semantica come in figura 2.10. Una CNN come la AlexNet infatti è stata costruita per fornire un output non spaziale per classificare immagini di dimensione fissa. Le coordinate spaziali scompaiono negli strati completamente connessi che fanno in modo di classificare l'intera immagine di input in una delle possibili classi[45]. Ma gli strati completamente connessi possono anche essere visti come degli strati convoluzionali con dei filtri la cui regione d'interesse è la dimensione dell'intero input. Attuando queste trasformazioni è così possibile ottenere una rete in grado di ricevere un input di qualunque dimensione in ingresso e fornire in output una mappa di probabilità di appartenenza di ogni pixel ad una classe. La rete utilizzata per le strutture glomerulari è stata costruita in ambiente MATLAB® 2018b partendo dalla AlexNet pre-allenata a cui sono state apportate le seguenti modifiche per ottenere segmentazione di un'immagine di dimensioni 512x512x3:

- *Strato di input*: si passa da una dimensione di input 227x227x3 ad una dimensione 512x512x3.
- *2 strato*: si sostituisce lo strato convoluzionale della AlexNet con uno strato identico ma fissando il padding a 100. Pesi e bias vengono mantenuti.
- *17 strato e 20 strato*: Questi strati completamente connessi della AlexNet vengono sostituiti con strati convoluzionali equivalenti riformalizzando pesi e bias.

- *classificatore*: si elimina il classificatore dell'AlexNet e si dispongono al suo posto nell'ordine:
 - 1) uno strato convoluzionale composto da 3 filtri di dimensione $1 \times 1 \times 4096$, uno stride di 1 e senza padding.
 - 2) Uno strato convoluzionale trasposto composto da 3 filtri di dimensione $64 \times 64 \times 3$ con uno stride di 32. Questo strato viene unito all'input della rete.
 - 3) Una softmax che sia in grado di fare una predizione densa della classe dei pixel. Avrà quindi dimensione $512 \times 512 \times n$ dove n è il numero delle classi che si vogliono riconoscere.
 - 4) Uno strato di classificazione dei pixel che dia in output la maschera con le varie classi assegnate secondo la probabilità della softmax.

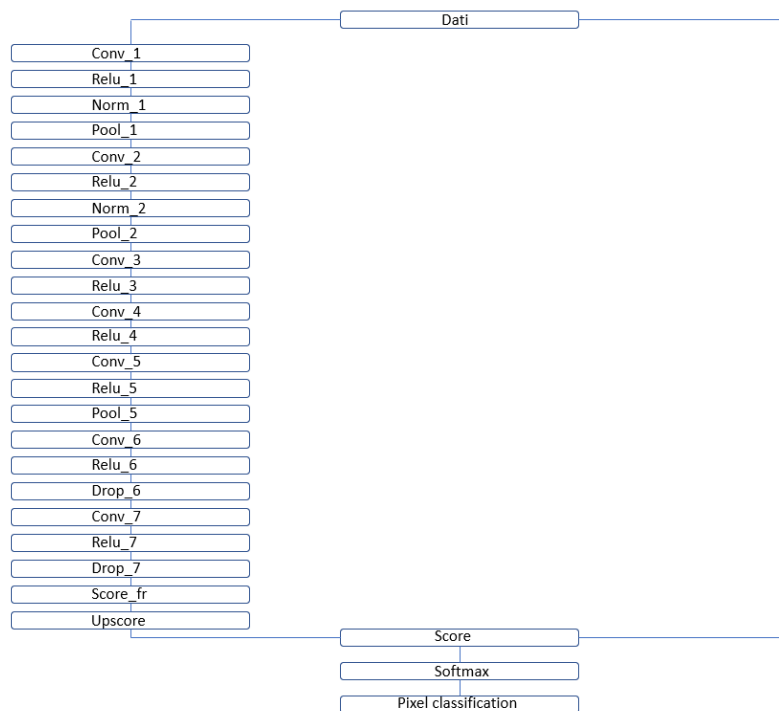


Figura 2.13: Struttura della AlexNet modificata per segmentazione semantica.

Allenamento della rete

Il dataset estratto per la classificazione dei glomeruli prevede 620 immagini. L'80% dell'intero dataset (quindi 500 immagini) va a comporre il *Training set* e il *Validation set* (90% training e 10% validation diviso in maniera random) mentre il restante 20% (120 immagini) va a comporre il *Test set*. L'allenamento della rete è supervisionato, ovvero si forniscono in input le immagini con la rispettiva classe a cui ogni pixel appartiene. Le classi sono le seguenti:

- *classe 0*: tutti i pixel che non fanno parte nè dei glomeruli sani nè di quelli sclerotici.
- *classe 1*: glomeruli sani.
- *classe 2*: glomeruli sclerotici.

In figura 2.14 un esempio di immagine fornita per l'allenamento della rete.

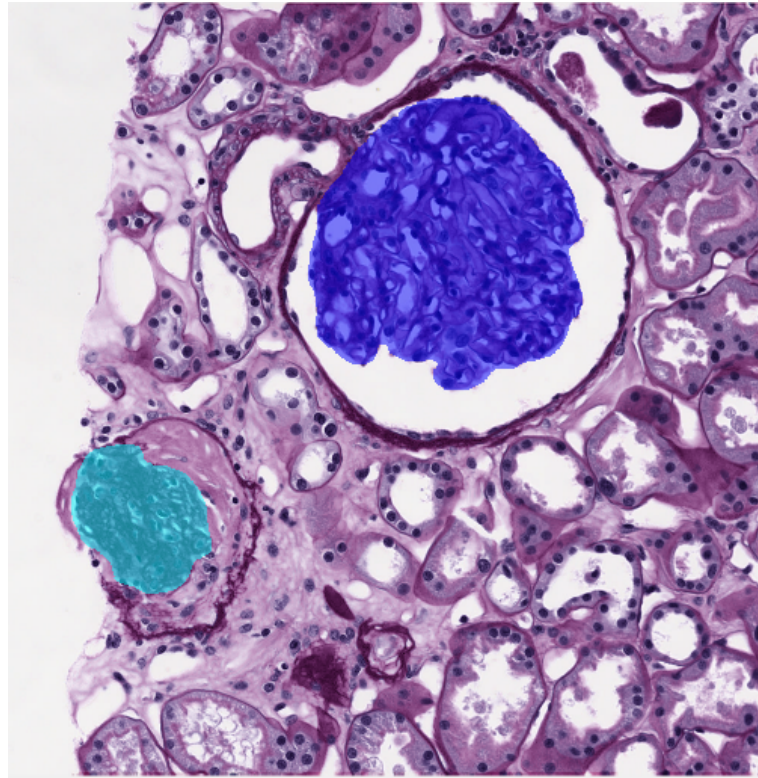


Figura 2.14: Esempio di immagine data in input alla CNN. In blu vengono evidenziati i pixel appartenenti alla classe 1 dei glomeruli sani, in azzurro chiaro quelli appartenenti alla classe 2 degli sclerotici. La classe 0 non viene evidenziata con nessun colore

Le immagini del dataset sono state divise in maniera proporzionale tra Training-Validation e Test, in maniera tale che ci fosse la stessa proporzione tra immagini contenenti glomeruli sani, glomeruli sclerotici od entrambi sul totale delle immagini del dataset. Inoltre i pesi dello *strato di classificazione* vengono moltiplicati per un fattore dipendente dal numero di Pixel appartenenti ad ogni classe. Questo perchè nelle immagini ci sono molti più pixel appartenenti alla classe 0 e alla classe 1 piuttosto che alla classe 2. I dati di Training sono poi stati aumentati secondo attuando in cascata in maniera random le seguenti trasformazioni:

- Traslazione lungo l'asse x in un range di pixel compreso tra $[-100,100]$.
- Traslazione lungo l'asse y in un range di pixel compreso tra $[-100,100]$.

- Rotazione in un range di pixel compreso tra $[-45,45]$.
- Specchiamento dell'immagine lungo l'asse x.
- Specchiamento dell'immagine lungo l'asse y.

Sono inoltre stati impostati i parametri della rete riportati in tabella 2.1:

Parametri della rete	
Algoritmo di ottimizzazione	SGDM
Learning rate iniziale	0.05
Momento	0.9
Dimensione del mini-batch	32
Numero massimo di epoche	50
Validation patience	10 epoche
regolarizzazione L2	0.0005
fattore di diminuzione del learning rate	0.03
periodo di diminuzione del learning rate	5 epoche
metodo della soglia del gradiente	12norm
soglia sul gradiente	0.5
Frequenza di validazione	50 iterazioni
Rimescolamento dei dati	ogni epoca

Tabella 2.1: Parametri per l'allenamento della CNN

L'algoritmo di risoluzione scelto è quello della *discesa del gradiente stocastico con momento* (SGDM). I parametri della rete (pesi e biases) vengono aggiornati per minimizzare il funzionale di errore in questo modo:

$$W_{l+1} = W_l - \alpha \nabla L(W_l) + \gamma(W_l - W_{l-1}) \quad (2.10)$$

$$b_{l+1} = b_l - \alpha \nabla L(b_l) + \gamma(b_l - b_{l-1}) \quad (2.11)$$

dove l è il numero dell'iterazione, α è il learning rate (che si modifica durante le iterazioni), e L è la funzione d'errore. γ (momento) indica invece il contributo del gradiente precedente all'aggiornamento dei pesi nell'iterazione corrente.

Si è inoltre scelto l'utilizzo di una dimensione del mini-batch di 32. Un mini-batch è un sottoinsieme del training set che è utilizzato per valutare il gradiente della funzione di perdita scelta e aggiornare i pesi. Un'iterazione corrisponde

all'aggiornamento dei pesi dovuti al passaggio di un mini-batch nella rete, un'epoca invece indica il passaggio di tutto il training set nella rete. Si è scelto dunque un numero massimo di epoche per l'allenamento di 50 e una "*validation patience*" di 10. Quest'ultima corrisponde al numero di volte che la funzione di perdita ("*cross-entropy*") sul validation set può essere maggiore o uguale al precedente valore più piccolo prima che il training venga interrotto. Ad ogni epoca del training set e ad ogni validazione del validation set i dati vengono rimescolati. Questo perchè se il numero di immagini del training non fosse perfettamente divisibile per la dimensione del mini-batch verrebbero scartate sempre le stesse immagini se non fossero rimescolate ogni volta. Il learning rate α parte da un valore iniziale e viene decrementato ogni 5 epoche di un fattore pari a 0.03 poichè durante l'apprendimento l'algoritmo ha progressivamente bisogno di cambiare i pesi di un valore più piccolo avvicinandosi al minimo del gradiente. Inoltre il gradiente che varia ad ogni iterazione non può superare la soglia massima impostata di 0.5. Infatti se il gradiente incrementasse in maniera esponenziale allora l'allenamento sarebbe instabile e divergerebbe in poche iterazioni. Questa "esplosione del gradiente" è indicata da una funzione di perdita che assume il valore di Nan oppure di Inf. L'utilizzo di una soglia sul gradiente stabilizza il training quando il learning rate è ancora alto e in presenza di outliers.[46]. Porre una soglia sul gradiente permette alla rete di allenarsi più velocemente e non impatta sul task di allenamento. La funzione di perdita utilizzata è quella dell'entropia incrociata ("*cross entropy*"). Infatti in un problema di classificazione gli ultimi due strati sono quello che applica la funzione softmax all'input fornendo la possibilità di appartenenza di un pixel ad una determinata classe, e lo strato di classificazione vera e propria. Questo strato prende i valori dalla softmax e assegna ogni input ad una delle k-classi diverse usando la seguente equazione:

$$loss = - \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^K t_{ij} \ln y_{ij} \quad (2.12)$$

dove N è il numero dei campioni, K quello delle classi, t_{ij} è l'indicatore del fatto il campione i-esimo appartenga alla j-esima classe, e y_{ij} è la probabilità che l'i-esimo campione venga assegnato alla classe j.

2.5.2 Individuazione di glomeruli sani e sclerotici

Dopo aver allenato la rete per la segmentazione dei glomeruli sani e di quelli sclerotici i passi seguiti per arrivare al risultato finale sono illustrati nella figura 2.15. Non c'è bisogno di un post-processing particolarmente impegnativo poichè l'output della rete ha un'accuratezza di segmentazione molto alta.

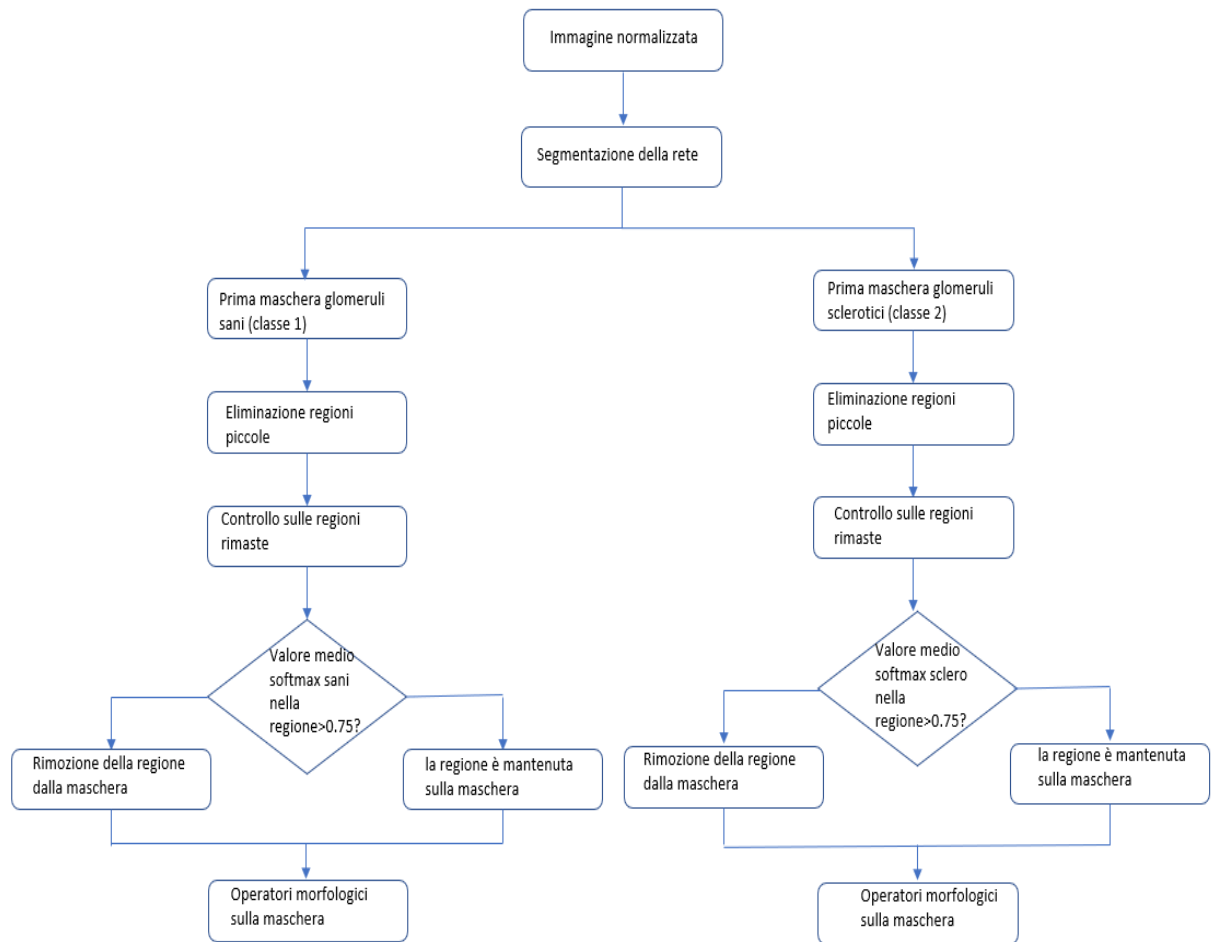


Figura 2.15: Diagramma a blocchi per segmentazione e classificazione dei glomeruli.

Segmentazione della CNN

Il primo passo è quello del caricamento dell'immagine di dimensioni 512x512x3 estratta dalla WSI del vetrino colorato con la reazione PAS. Si prosegue poi con la normalizzazione del colore dell'immagine sul target scelto (2.12.b) che viene

fornita in input alla rete per ottenere la prima segmentazione dei glomeruli sani (classe 1) e dei glomeruli sclerotici (classe 2). In figura si riportano i risultati dei passi appena descritti su un'immagine di test in cui siano presenti sia glomeruli sani che sclerotici.

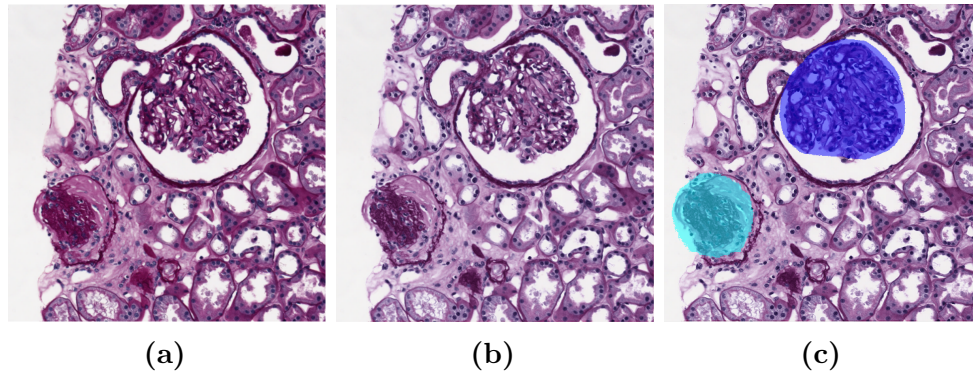


Figura 2.16: a)Immagine originale. b)Immagine normalizzata. c)Output della segmentazione della rete: in blu i pixel classificati come appartenenti a glomeruli sani in azzurro chiaro quelli classificati come appartenenti agli sclerotici.

Postprocessing sull'output della rete

Il risultato di figura 2.16c. rappresenta l'uscita dello strato di classificazione dei pixel che mostra l'immagine di input sovrapposta ad una variabile di tipo *Categorical* delle stesse dimensioni dell'immagine, in cui ad ogni pixel è assegnata la classe di appartenenza (1 per i sani, 2 per gli sclerotici, 0 per gli altri). Lo strato di classificazione segue però lo strato della softmax, ovvero quello che fornisce una predizione dell'output di ogni pixel. La softmax pertanto è una matrice di dimensioni $512 \times 512 \times 3$, in cui il primo strato rappresenta la probabilità di appartenenza di un pixel alla classe 0, il secondo e il terzo rispettivamente la probabilità di appartenenza di un pixel alla classe 1 o alla classe 2. La somma dei tre strati della softmax risulterà quindi in una matrice unitaria di dimensioni 512×512 . La prima maschera dei glomeruli sani e di quelli sclerotici è ottenuta applicando una soglia di Otsu alle due softmax date in output dalla rete come si vede in figura 2.17 e togliendo tutte le piccole aree considerate missclassificazioni della CNN. La rete può infatti trovare nell'immagine delle strutture simili alla tessitura dei glomeruli sani e sclerotici e classificarle come tali in modo errato.

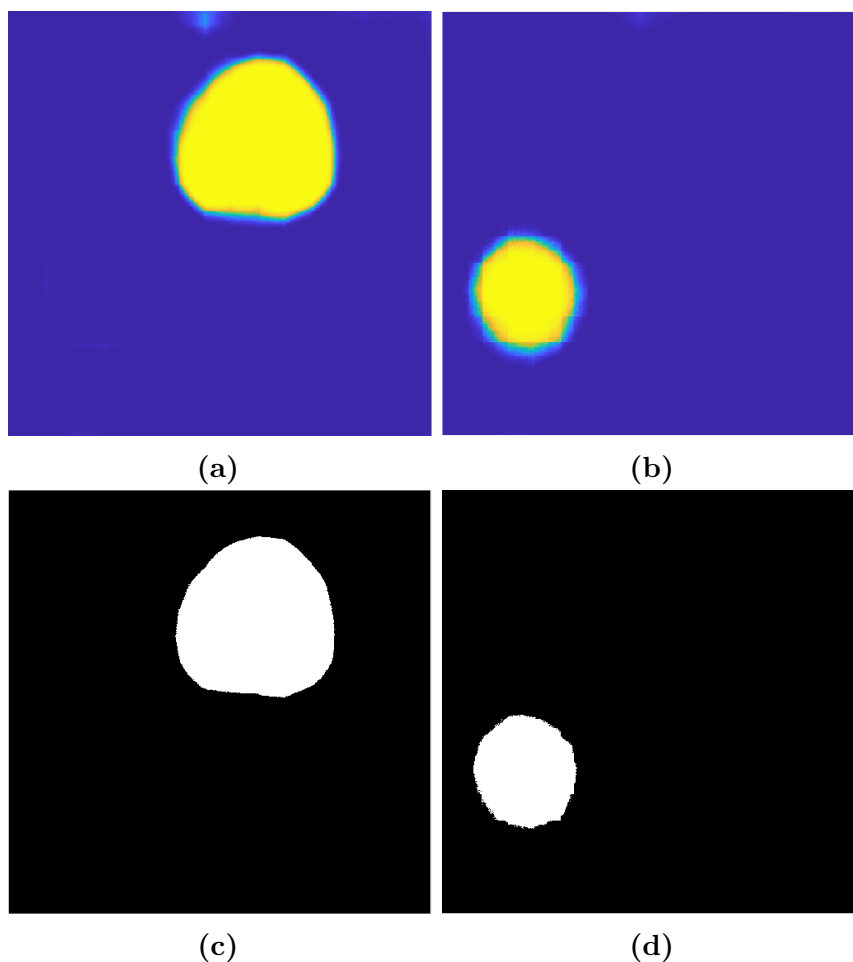


Figura 2.17: **a)** Softmax dei glomeruli sani (In giallo i valori più alti di probabilità che sfumano verso il blu che sono i valori più bassi della matrice). **b)** Softmax dei glomeruli sclerotici. **c)** Soglia di otsu sulla softmax dei glomeruli sani. **d)** Soglia di otsu sulla softmax dei glomeruli sclerotici.

Partendo dalle maschere ottenute (figura 2.17c. e 2.17d.) viene poi effettuato un ulteriore controllo sulla probabilità data dalle softmax. Infatti con un *Regionprops* sulle due maschere si vanno ad analizzare singolarmente le regioni. Se la media delle probabilità media attribuita dalla softmax ai pixel della regione (quindi assegnati rispettivamente alla classe 1 o alla classe 2) è inferiore al 75%, allora quella regione viene tolta dalla maschera poichè probabilmente indica un'area con caratteristiche simili ai glomeruli sani oppure ai glomeruli sclerotici ma che effettivamente non appartiene a nessuna delle due classi. Infatti quando vengono identificati dei glomeruli sani oppure sclerotici la rispettiva softmax

assume in quelle aree una probabilità media vicina all'unità. Se ciò non avviene significa che la rete ha riconosciuto in quell'area delle caratteristiche simili alle strutture che deve individuare ma con una probabilità molto minore che quella classificazione sia corretta.

Si effettuano infine delle piccole chiusure sulle regioni per poter ingrandire leggermente l'area individuata come glomerulo, che sia sano o sclerotico.

Bisogna ricordare che nel caso dello score glomerulare il patologo conta singolarmente i glomeruli presenti nella biopsia renale. Pertanto non è così importante essere molto precisi nella segmentazione quanto invece individuare in maniera corretta le strutture e poterne offrire una quantificazione attendibile. Nella sezione risultati verranno riportate le metriche di validazione valutate tanto sul Test Set quanto sul Training Set. In figura 2.18 si riporta invece il risultato ottenuto confrontato con la segmentazione manuale.

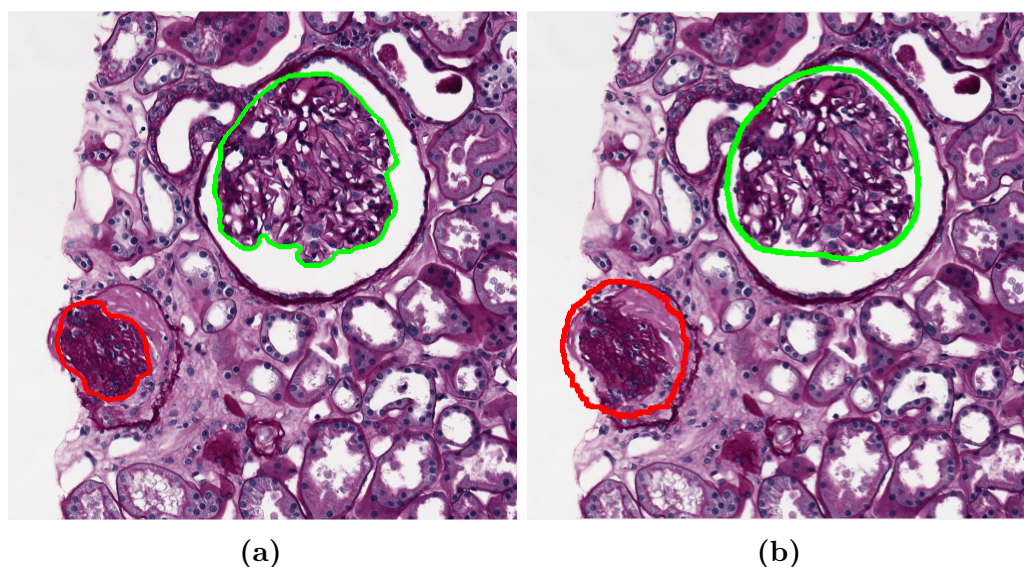


Figura 2.18: a) Individuazione manuale dei glomeruli. In rosso i glomeruli sclerotici, in verde quelli sani. b) Individuazione automatica dei glomeruli. In rosso i glomeruli sclerotici, in verde quelli sani.

2.6 Segmentazione e classificazione dei tubuli

Ora vengono descritte le modalità di individuazione dei tubuli atrofici e dei tubuli sani. Si segue un approccio diverso rispetto a quello utilizzato per i

glomeruli, infatti i tubuli atrofici vengono identificati con un metodo euristico mentre per l'individuazione dei sani viene utilizzata come base di partenza la classificazione di una CNN successivamente processata. Si descrivono ora tutti i passi seguiti, dall'identificazione dei tubuli altrofici, all'allenamento della rete e l'identificazione dei tubuli sani fino ad arrivare al risultato finale.

2.6.1 Allenamento della rete

La rete utilizzata ha la stessa struttura e la stessa scelta di parametri di quella utilizzata per i glomeruli. Si utilizzano due reti diverse perchè il dataset di annotazioni manuali per glomeruli e tubuli ha una diversa numerosità. Il dataset estratto per la classificazione dei tubuli comprende 209 immagini. Il 95% dell'intero dataset (quindi 200 immagini) va a comporre il *Trainig Set* e il *Validation Set* (90% training e 10% validation diviso in maniera random) mentre il restante 5% (9 immagini) va a comporre il *Test Set*. L'allenamento della rete anche in questo caso è supervisionato con la rispettiva classe a cui appartiene ogni pixel. Le classi sono le seguenti:

- *classe 0*: tutti i pixel che non sono tubuli.
- *classe 1*: lume dei tubuli.
- *classe 2*: contorno dei tubuli.

La figura 2.19 mostra l'esempio di un'immagine fornita per l'allenamento della rete.

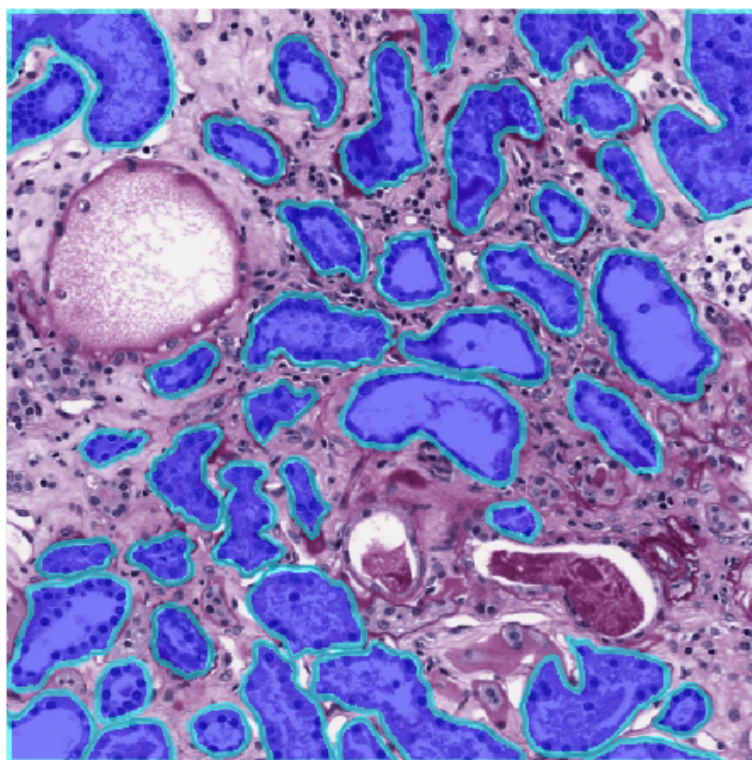


Figura 2.19: In blu vengono evidenziati i pixel appartenenti alla classe 1 (interno dei tubuli), in azzurro chiaro quelli appartenenti alla classe 2 (contorno dei tubuli).

Le immagini del dataset sono state divise in maniera casuale tra Training-Validation e Test poichè contengono tutte una notevole quantità di tubuli. Anche in questo caso i pesi dello *strato di classificazione* vengono moltiplicati per un fattore dipendente dal numero di pixel appartenenti ad ogni classe. Questo per equilibrare le classi dato che il numero di pixel della classe 2 dei contorni dei tubuli risulta essere molto minore rispetto a quelli delle altre due classi. I dati del Training sono stati aumentati con le stesse trasformazioni esposte nel caso dei glomeruli ma ripetute più volte per garantire una numerosità accettabile del dataset.

2.6.2 Individuazione di tubuli atrofici

In figura 2.20 viene riportato il workflow seguito per l'individuazione dei tubuli atrofici ottenuti applicando dei metodi euristici.

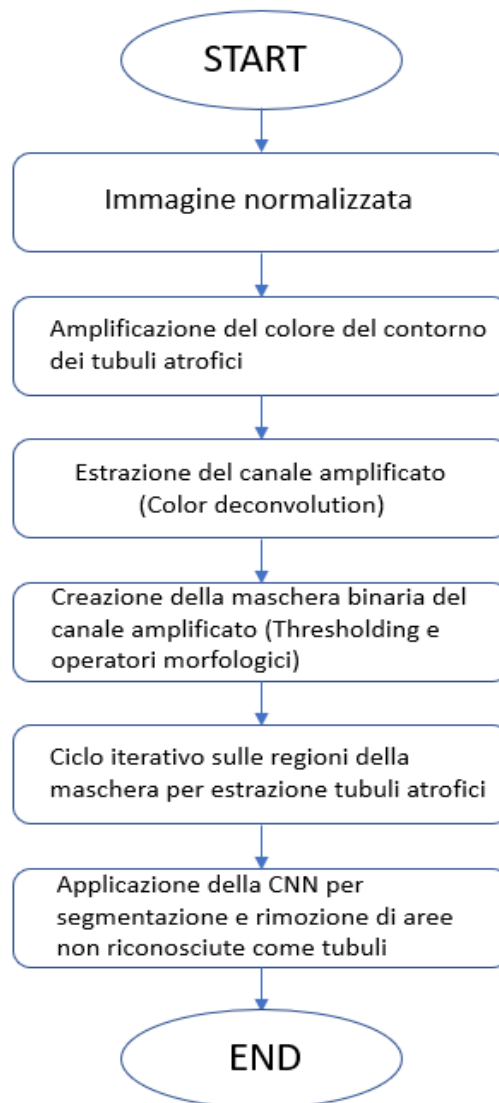


Figura 2.20: Workflow per l'individuazione dei tubuli atrofici.

Amplificazione del colore del contorno dei tubuli atrofici ed estrazione del canale amplificato

L'individuazione dei tubuli atrofici si basa sul fatto che, in un'immagine istologica, l'atrofia tubulare si manifesta morfologicamente con un ispessimento dei contorni dei tubuli patologici (come si vede in figura 1.8) che diventano inoltre marcatamente più scuri rispetto a quelli dei tubuli sani. Pertanto l'idea che sta

alla base è quella di discriminare queste strutture amplificando il canale del colore che contraddistingue il loro contorno. Come si è visto precedentemente nel paragrafo 2.4.1 un'immagine può essere scomposta evidenziando quelle che sono le sue colorazioni principali, le cui basi colore in RGB vanno a comporre la matrice dei vettori colorazione W . Inoltre nel paragrafo 2.4.1 abbiamo visto come un'immagine s può essere riportata nel colore di un target t semplicemente moltiplicando la sua matrice delle concentrazioni di ogni colorante H per la matrice W_t dei vettori colorazione del target.

Questo principio è stato applicato per l'amplificazione del colore dei contorni dei tubuli atrofici. E' stato estratto manualmente un certo numero di punti appartenenti ai contorni di tubuli atrofici in diverse immagini normalizzate, salvando i valori RGB di ogni punto. Facendo la mediana tra i valori di tutti questi punti per ogni canale si è ottenuto un vettore 3×1 che rappresenta *il vettore colorazione* in RGB dei contorni dei tubuli atrofici. Dal target è stata stimata, utilizzando il metodo di Machencko, la matrice dei vettori colorazione W sostituendo alla seconda riga (canale del rosso) il vettore colorazione dei contorni dei tubuli.

A questo punto può essere applicata la *Color deconvolution* proposta da Machencko per estrarre il canale amplificato. La matrice W infatti contiene sulla seconda riga i valori RGB ottenuti dalla mediana dei valori dei pixel sul contorno dei tubuli atrofici, e sulla prima invece i valori RGB della colorazione blu ottenuta con la reazione PAS. Nota la matrice W è dunque possibile ottenere la matrice H (equazione 2.6) della concentrazione di ogni colorante da sarà possibile estrarre i due canali. Valutando solo il primo canale si ottiene un'immagine in toni di grigio che metta in evidenza le strutture con una colorazione simile a quella dei tubuli che stiamo ricercando come si vede in figura 2.21.

Creazione maschera binaria del canale amplificato

Poichè il canale colore dei tubuli presenta i contorni dei tubuli atrofici più chiari rispetto alle altre strutture, in ogni immagine i pixel con valore (in double) inferiore a 0.75, soglia scelta empiricamente, vengono azzerati e dall'immagine

ottenuta si crea una maschera binaria.

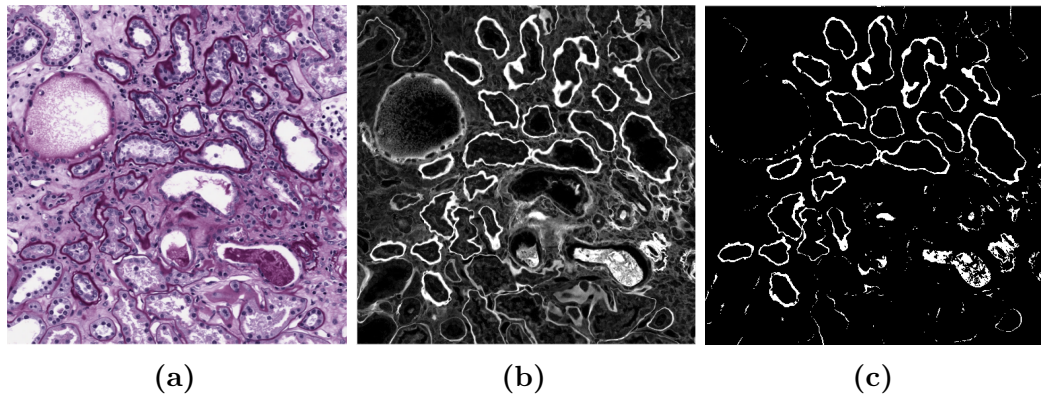


Figura 2.21: a)Immagine normalizzata contenente tubuli b)Immagine del canale colore del contorno dei tubuli amplificato.c)Maschera binaria ottenuta dopo il thresholding.

Estrazione tubuli atrofici : metodo iterativo

Si riporta in figura 2.22 il diagramma a blocchi per la prima estrazione dei tubuli atrofici.

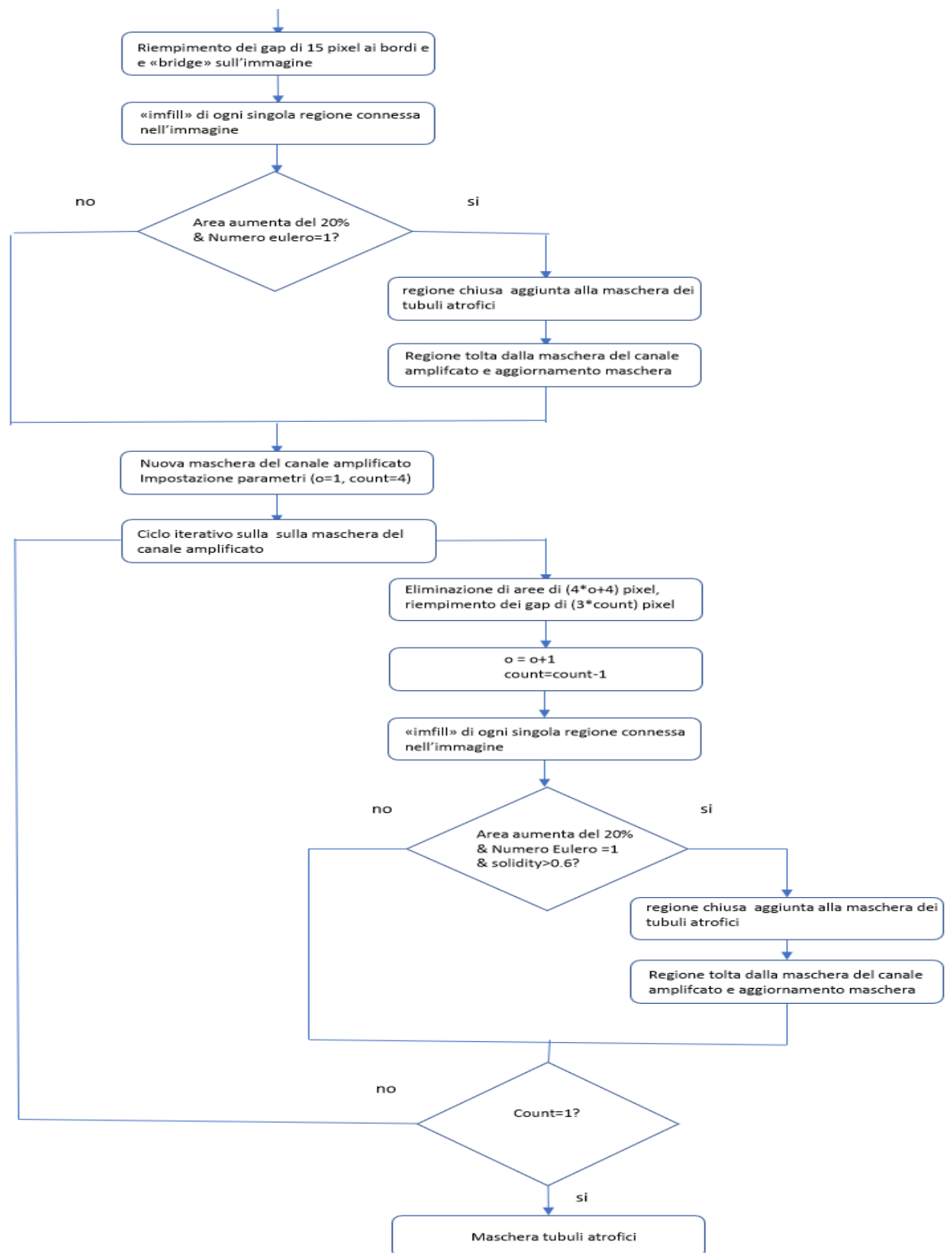


Figura 2.22: Diagramma a blocchi per l'individuazione dei tubuli atrofici.

L'immagine di figura 2.21.c è utilizzata come base di partenza per l'identificazione dei tubuli atrofici. Osservando l'immagine si può infatti facilmente notare come i contorni dei tubuli atrofici siano le strutture più evidenti ed intatte, ma presentino anch'esse numerosi pixel che sono stati abbattuti dalla soglia (la colorazione media è più scura rispetto alle altre strutture ma comunque non sempre omogenea). Bisogna dunque eseguire un postprocessing per giungere al risultato finale. Sulla maschera di figura 2.21c si vanno a riempire i gap tra le strutture molto piccoli (presumibilmente creatisi tra contorni dei tubuli atrofici) e i gap di 15 pixel sui bordi dell'immagine per chiudere le strutture agli estremi. A questo punto si analizzano le singole regioni connesse e si effettua un riempimento morfologico dei buchi. Se il tubulo è atrofico, infatti, i contorni formeranno una struttura quasi intatta intorno ad un buco che corrisponde al lume. Quindi le regioni che vengono aggiunte alla maschera che sarà poi quella finale hanno le seguenti caratteristiche:

- L'area aumenta dopo il riempimento dei buchi di almeno il 20% della sua estensione
- Il numero di Eulero cresce fino ad un valore unitario (la regione non presenta più buchi).

Se la regione analizzata presenta le caratteristiche elencate allora viene spostata sulla maschera dei tubuli atrofici e rimossa dalla maschera di partenza.

Effettuato questo primo controllo che inserisce nella maschera i tubuli atrofici i cui contorni erano regioni connesse quasi completamente, si va ad effettuare un nuovo controllo progressivo. Il procedimento è lo stesso del precedente aggiungendo una condizione sulla solidity superiore a 0.6 della regione che dopo il riempimento morfologico deve essere aggiunta alla maschera. Si effettuano 4 cicli iterativi e ad ogni ciclo si varia, diminuendola, la grandezza dei gap da riempire e si tolgono invece, con operatori morfologici, progressivamente regioni sempre leggermente più grandi. L'idea alla base è quella di non aggiungere errori alla classificazione dei tubuli. Si vanno a chiudere regioni poco disconnesse e non si vogliono chiudere quelle molto disconnesse. La maschera ottenuta alla fine di questo processo è mostrata in figura 2.23



Figura 2.23: Maschera ottenuta alla fine del percorso iterativo.

Rimozione degli errori

La maschera di figura 2.23 viene ulteriormente processata per rimuovere alcuni errori di segmentazione. Innanzitutto si applicano operatori morfologici per la rimozione delle regioni piccole che non corrispondono a tubuli.

Poi si va ad effettuare un controllo rispetto alle regioni riconosciute dalla CNN applicata all'immagine come zone prive di tubuli. Dall'output della CNN mostrato in figura 2.24a si ricava una maschera binaria delle regioni che non contengono tubuli (figura 2.24b).

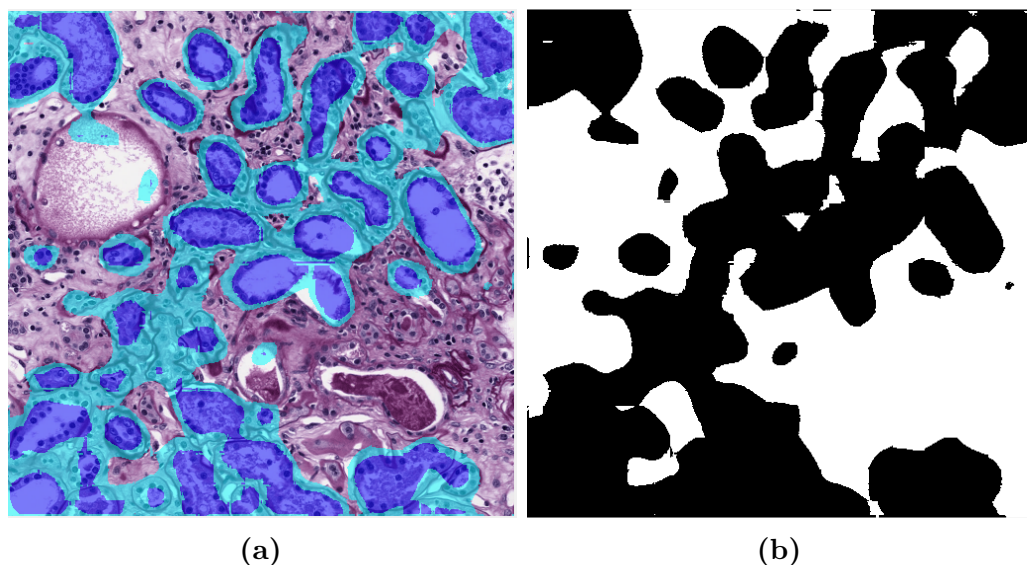


Figura 2.24: **a)**Classificazione effettuata dalla rete (in blu l'interno dei tubuli e in azzurro chiaro i contorni) **b)**Machera delle regioni non contenenti tubuli.

Se la regione identificata come tubulo atrofico ha un'area molto grande e ricade in una regione identificata come regione priva di tubuli allora probabilmente si è incorso in un errore di segmentazione identificando un glomerulo come tubulo atrofico. Per tanto quella regione viene rimossa dalla maschera. Inoltre sui singoli tubuli atrofici identificati che presentano un'area > 1200 pixels e una solidity < 0.85 si effettuano le operazioni morfologiche di erosione per aggiustarne la forma. Un esempio di identificazione finale di tubuli atrofici è mostrata in figura 2.25.

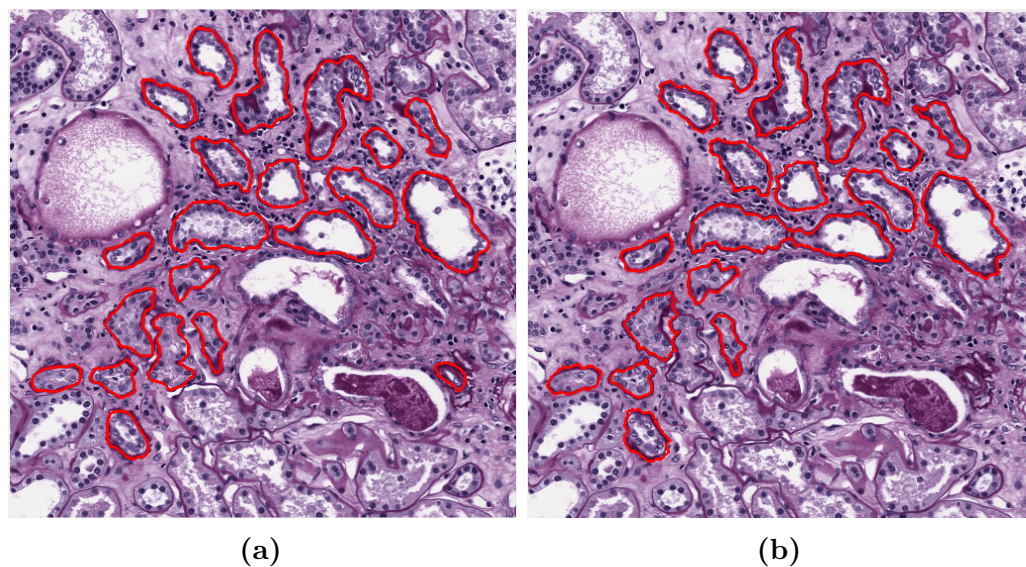


Figura 2.25: Confronto tra segmentazione manuale e automatica dei tubuli atrofici
a) In rosso sono evidenziati i contorni segmentati manualmente dei tubuli atrofici.
b) In rosso sono evidenziati i contorni automatici dei tubuli atrofici.

2.6.3 Individuazione dei tubuli sani

In figura 2.26 viene riportato il workflow seguito per l'individuazione dei tubuli sani.

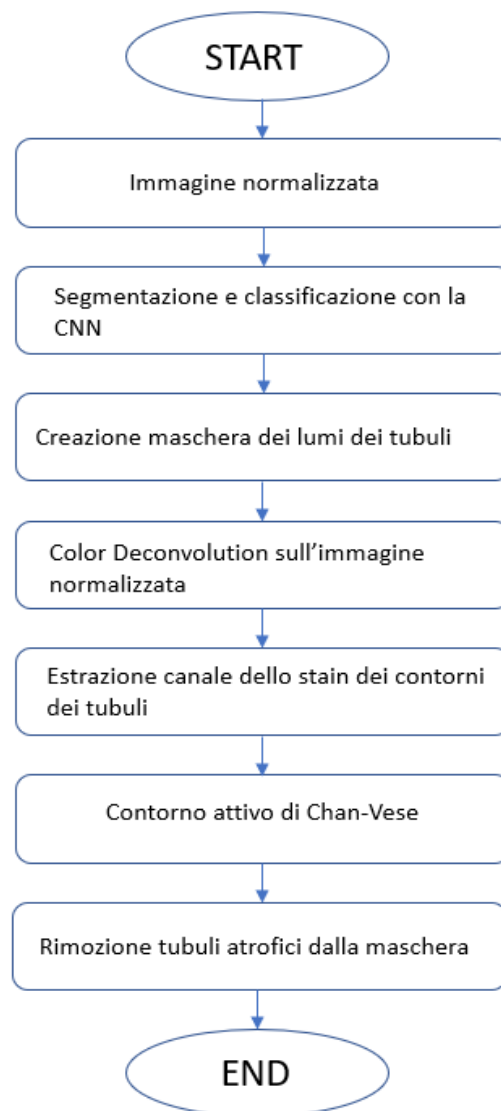


Figura 2.26: Workflow per l'individuazione dei tubuli sani.

Creazione maschera del lume dei tubuli

Per l'individuazione dei tubuli sani si parte dalla classificazione data in output dalla rete di figura 2.24a che identifica le classi 1 e 2 corrispondenti rispettivamente a pixel appartenenti al lume e al contorno dei tubuli. Possono essere dunque estratte le due softmax, ma la matrice presa in considerazione è quella che indica la possibilità che un determinato pixel faccia parte del lume dei

tubuli. A questa softmax viene applicato un aumento del contrasto utilizzando *imadjust* di MATLAB® 2018b che azzerava tutti i pixel con valori di probabilità < 0.3 (pixel che non sono classificati quindi come lume di tubuli) e riscalava i restanti in un range compreso tra 0 e 1. L'immagine risultante viene convoluta con un filtro gaussiano con *standard deviation* = 2.5, e vengono successivamente applicati degli operatori morfologici per effettuare una leggera apertura della maschera. I risultati ottenuti ad ogni passo sono riportati in figura 2.27.

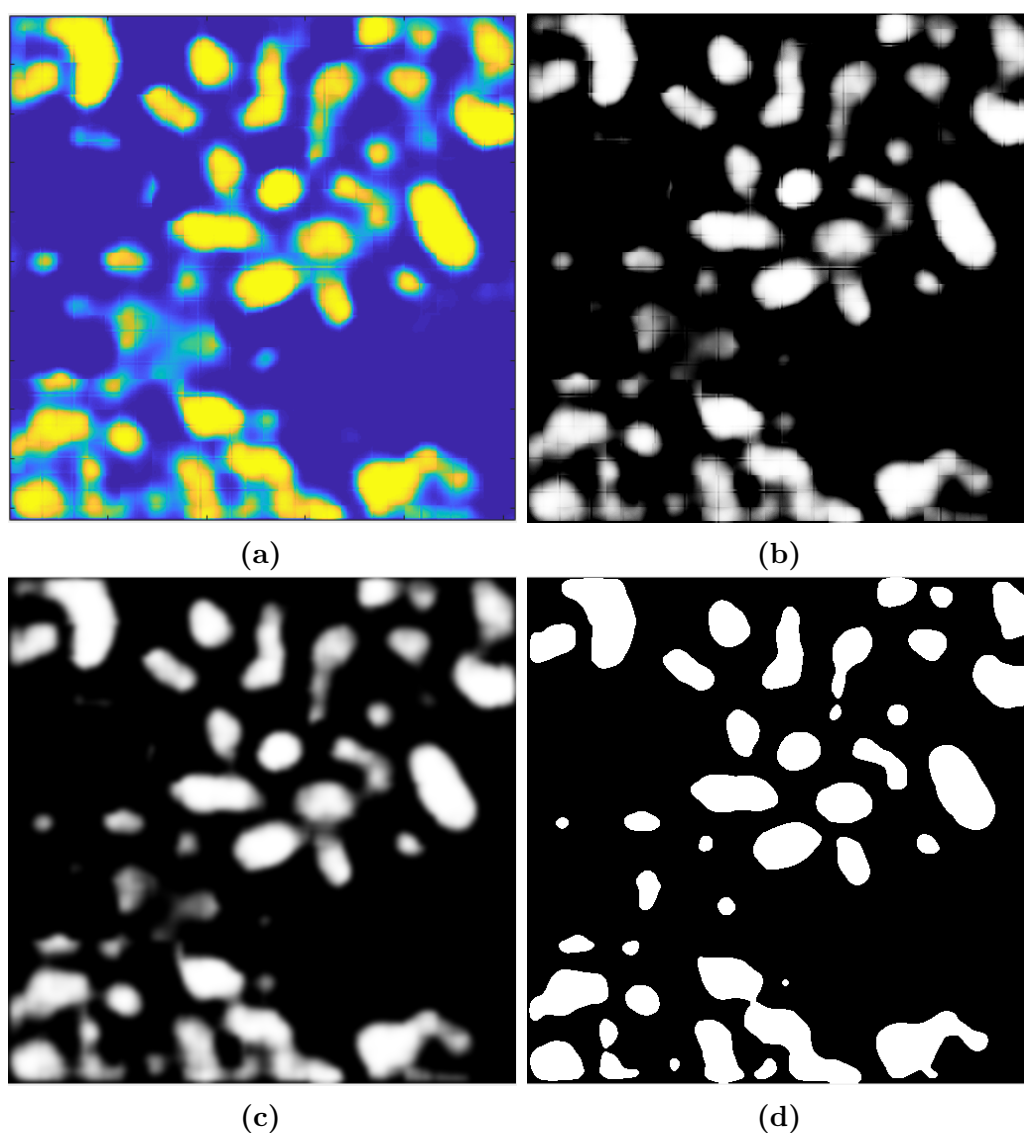


Figura 2.27: a) Softmax della classe 1 dei lumi dei tubuli. b) *Imadjust* sulla softmax. c) Lumi dopo il passaggio del filtro gaussiano. d) Maschera finale dei lumi.

Color devonvolution ed estrazione del secondo canale colorazione

Il passaggio seguente effettuato è stato quello della *color deconvolution* di Machencho applicata all'immagine normalizzata. Data la matrice dei vettori colorazione W si ottiene la matrice di concentrazione di ogni colorante H come mostrato in figura 2.28.

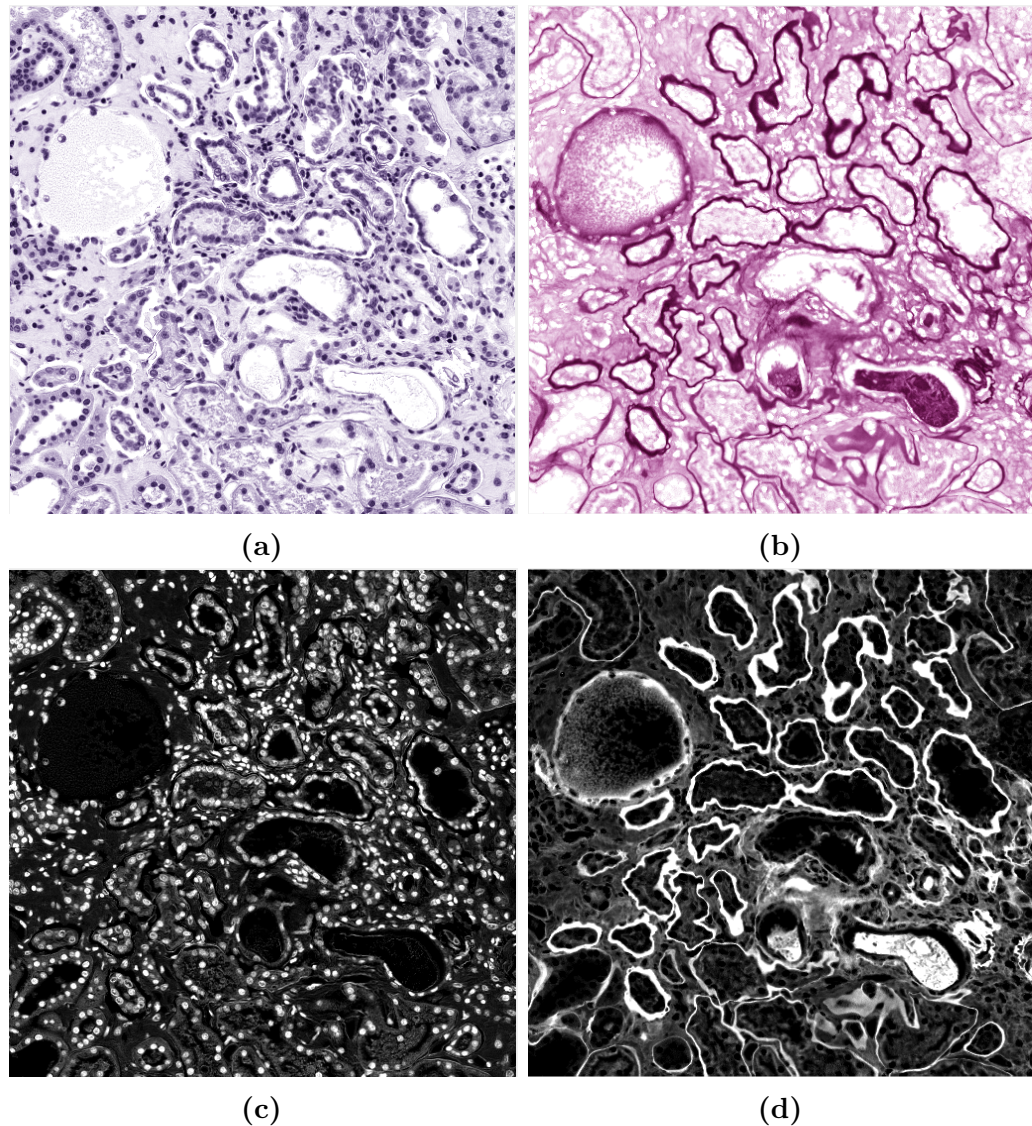


Figura 2.28: Immagini in uscita dalla color deconvolution di Macenko a) Primo canale. b) Secondo canale. c) Primo canale in greyscale. d) Secondo canale in grayscale

Contorno attivo : level set

Per contorno attivo si intende la modellizzazione di una curva planare deformabile che evolve alla ricerca di una forma finale sotto l'effetto di due forze:

- *forza interna*: una forza che è dovuta alla curva stessa.
- *forza esterna*: una forza dipendente dai dati sperimentali e quindi dalle caratteristiche dell'immagine.

L'adattamento del modello a forme, oggetti, contorni ed altre caratteristiche dell'immagine è dato dal bilanciamento tra queste due forze. L'algoritmo di contorno attivo si sviluppa quindi in maniera iterativa, partendo da una condizione iniziale per poi evolvere alla ricerca di una particolare forma che si sta ricercando. La fine delle iterazioni coinciderà con la minimizzazione del *funzionale energetico*, ovvero un'espressione matematica definita in relazione alle due forze.

Il Level-set è un modello di contorno attivo che varia in relazione a condizioni geometriche. Proposto da Osher e Seithian nel 1988, consiste nella rappresentazione di un contorno C in uno spazio dimensionale superiore in cui il contorno stesso non è altro che il livello zero dello spazio di ordine superiore. Data un'immagine I , si definisce un contorno planare $C = \{s | \theta(s) = k\}$ e la funzione 3D $\Theta(x, y)$ su cui è definito il contorno deriva da una modellizzazione geometrica dell'immagine e non da parametri energetici quali gradiente o intensità. Variando il livello k del contorno o variando la funzione di level-set nel tempo, il contorno diventa *dinamico* e riesce ad inseguire forme e profili nell'immagine. Ci concentriamo ora sull'algoritmo di Level-set proposto da Chan-Vese[47] che assume caratteristiche particolari.

Level set di Chan-Vese

I matematici Chan e Vese hanno proposto un metodo per rendere i modelli dei contorni attivi indipendenti dai bordi e dal gradiente dell'immagine su cui si sviluppano. Data l'immagine originale u_0 , si definisce la curva lineare parametrizzata $C(s) : [0, 1]$. L'immagine originale u_0 è approssimata secondo il modello di Mumford-Shah da un insieme di due fasi definite dalle costanti c_1

e c_2 in cui c_1 è la media dei pixel all'interno della curva C e c_2 la media dei pixel esterni alla curva. Il level-set di Chan-Vese senza gradiente è formulato come segue:

$$F_1(C) + F_2(C) = \int_{inside(C)} |u_0(x, y) - c_1|^2 dx dy + \int_{outside(C)} |u_0(x, y) - c_2|^2 dx dy \quad (2.13)$$

La definizione di forza interna ed esterna dipendono dunque non dal gradiente, ma dal valore dei pixel all'interno e all'esterno della regione. Essendoci anche un'operazione di media porta anche ad un abbassamento del rumore fastidioso nell'operazione di avvicinamento alla forma voluta. Il funzionale di energia che deve essere minimizzato nell'algoritmo di Chan-vee prevede anche l'introduzione di un termine di regolarizzazione

$$\begin{aligned} F = & \mu \cdot Length(C) + v \cdot Area(inside(C)) \\ & + \lambda_1 \int_{inside(C)} |u_0(x, y) - c_1|^2 dx dy \\ & + \lambda_2 \int_{outside(C)} |u_0(x, y) - c_2|^2 dx dy \end{aligned} \quad (2.14)$$

Dove i primi due termini indicano il termine di regolarizzazione che fa sì che la regione che si evolve non diventi troppo grande o sparisca, mentre i secondi due termini rappresentano i termini di omogeneità che fanno sì che la curva vada alla ricerca dell'oggetto e si fermi quando gli integrali danno come risultato 0. In questo modo il potenziale di energia che regola l'evoluzione del contorno dipende esclusivamente dalla funzione level set e dai valori dell'immagine ed è eliminata la dipendenza dai gradienti.

Il metodo del contorno attivo di Chan-Vese è utilizzato per l'individuazione e la segmentazione dei tubuli sani. Lo stato iniziale del contorno attivo è la maschera binaria di figura 2.27d i cui contorni delle singole regioni sono i contorni attivi che evolvono per la segmentazione dell'immagine. L'immagine su cui evolve il contorno attivo è quella di figura 2.28d ovvero il secondo canale della color deconvolution. In maniera più precisa si fanno evolvere i contorni attivi delle regioni prese singolarmente. I parametri dell'algoritmo di contorno

attivo sono i seguenti:

- *Massimo numero di iterazioni*=50. Il contorno ferma la sua evoluzione quando raggiunge il numero massimo di iterazioni oppure se la posizione del contorno all'iterazione i -sima è la stessa di una delle ultime 5 recenti iterazioni.
- *Bias di contrazione*=-0.5. Questo parametro indica la tendenza del contorno ad espandersi verso l'esterno o chiudersi verso l'interno e può variare nel range $[-1,1]$. Attribuendo un valore negativo a questo parametro il contorno attivo sarà forzato ad espandersi, che è ciò che si vuole ottenere poiché lo stato di partenza è il contorno del lume del tubulo e ci si vuole espandere verso i contorni esterni del tubulo.
- *Fattore di smoothing*=0.8. Questo parametro indica il grado di regolarità delle regioni segmentate dal contorno attivo. Scegliendo valori alti si producono contorni della regione smussati ma con la possibilità di perdere i dettagli più fini.

L'algoritmo di Chan-Vese per la ricerca dei contorni dei tubuli sani viene applicato come si vede in figura 2.29

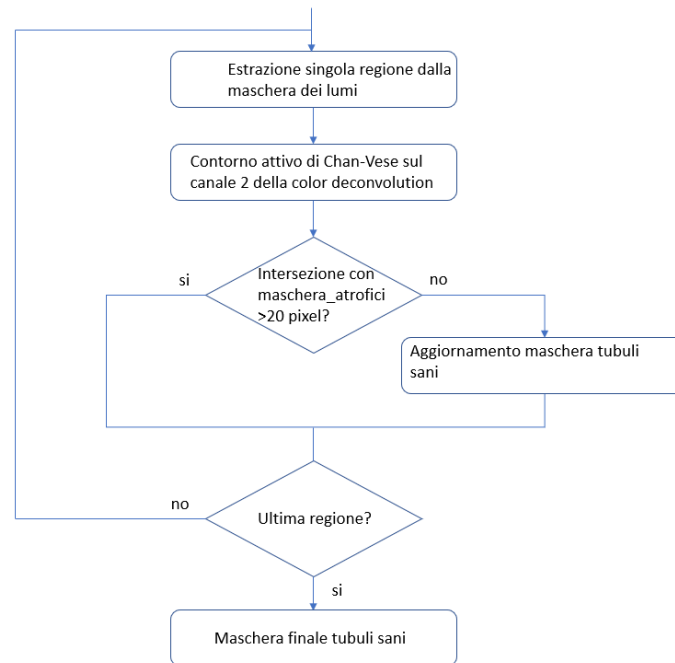


Figura 2.29: Diagramma a blocchi per l'applicazione del contorno attivo di Chan-Vese.

Ogni volta che ogni regione viene fatta evolvere alla ricerca del contorno si effettua un controllo tra lo stato finale e la maschera dei tubuli atrofici. Se una regione identificata come tubulo si sovrappone per più di 20 pixel con una regione già indicata come tubulo atrofico, allora quello individuato non sarà un tubulo sano e non viene aggiunto alla maschera finale dei tubuli sani.

Trasformata Watershed

Sulla maschera finale dei tubuli viene applicata una *trasformata watershed* col solo scopo di dividere alcuni tubuli fusi. Essendo infatti i tubuli molto numerosi è molto probabile che molti di essi vengano fusi nella segmentazione finale. La trasformata watershed si basa sull'identificazione di *creste* che corrispondono ai valori più alti dei pixel e *bacini d'utenza* che sono invece i valori più bassi. L'idea è quella di identificare i bacini d'utenza della regione in maniera tale da poterla dividere secondo le linee disegnate dalle creste. Si compie dunque la *Distance transform* sulla maschera finale dei tubuli sani, ovvero ad ogni pixel si sostituisce il valore della sua distanza dal pixel nero più vicino. Questa matrice

deve poi essere negata per poter identificare le due aree più chiare come bacini d'utenza, quindi aree più scure da dividere. Su questa maschera si va alla ricerca dei minimi regionali, ovvero componenti connesse di pixel con un valore costante d'intensità circondati da pixel con un valore più alto. Questi minimi regionali vengono poi estesi e imposti sulla maschera della distance trasform. Su questa maschera si applica la trasformata Watershed che dunque riesce ad identificare i bacini d'utenza più scuri e dividerli secondo le creste.

L'identificazione finale dei tubuli sani viene riportata in figura 2.30

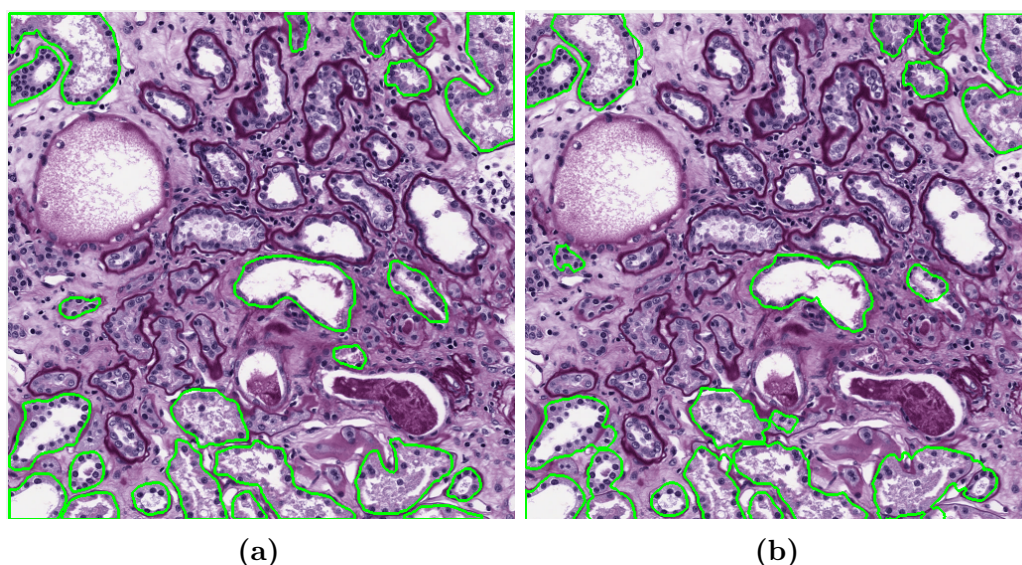


Figura 2.30: Confronto tra segmentazione manuale e automatica dei tubuli sani
a)In verde sono evidenziati i contorni segmentati manualmente dei tubuli sani. **b)**In rosso sono evidenziati i contorni automatici dei tubuli sani.

Alla fine di tutti gli step seguiti, la segmentazione finale dell'immagine è riportata in figura 2.31

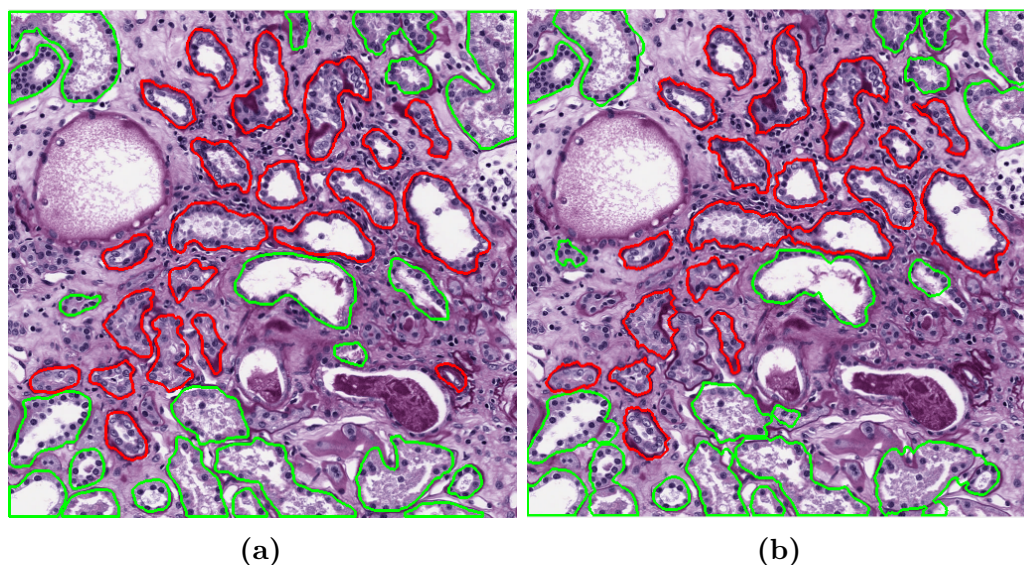


Figura 2.31: Confronto tra segmentazione manuale e automatica dei tubuli. **a)** Segmentazione manuale dei tubuli. **b)** Segmentazione automatica dei tubuli.

2.7 Metriche di validazione

Le metriche di validazione utilizzate per confrontare le prestazioni dell'algoritmo con il "ground truth" manuale derivante da una valutazione fatta dal patologo, sono diverse nel caso di glomeruli e tubuli. Infatti, nel momento in cui analizza un vetrino di un preparato istologico di tessuto renale, un patologo conta e classifica ogni singolo glomerulo del campione in maniera da poter fornire la quantità di sclerotici sul totale dei glomeruli individuati. Per fornire lo *score tubulare* invece, non si tratta di contare ogni singolo tubulo presente ma fornire una percentuale tra la quantità di "aree sclerotiche" individuate e la totalità delle "aree tubulari". Per ogni immagine sia del Training set che del Test set dei rispettivi dataset si hanno a disposizione le annotazioni manuali delle strutture. Quindi per ognuna delle 620 immagini estratte per la segmentazione dei glomeruli sono a disposizione due maschere binarie, una che evidenzia i glomeruli sani e l'altra che evidenzia gli sclerotici. Allo stesso modo per ognuna delle 209 immagini estratte per la segmentazione dei tubuli sono state create due maschere binarie, una per i tubuli sani e l'altra per gli atrofici. L'algoritmo

per ognuna delle strutture sull'immagine da in uscita una maschera binaria. Le prestazioni sono dunque valutate confrontando ciascuna maschera automatica con la corrispondente annotazione manuale secondo le diverse metriche di validazione che verranno ora esposte.

2.7.1 Metriche di validazione per i glomeruli

Le prestazioni dell'algoritmo nel caso dei glomeruli sono validate su tutte le immagini di training e test sia per glomeruli sani che sclerotici andando a confrontare le maschere binarie (come quelle riportate nelle figure 2.17c e 2.17d) con le maschere manuali corrispondenti. Viene effettuata una validazione *Object-based* ovvero sui singoli glomeruli interi riconosciuti, e una validazione *Pixel-based* per valutare l'accuratezza di segmentazione su tutte le immagini.

Validazione Object Based

Nei test medici molto spesso per valutare la presenza o assenza di patologie vengono utilizzate le *Confusion matrices* (tabella 2.2) ovvero delle tabelle che riportano il numero di veri positivi (TP), falsi positivi (FP), veri negativi (TN) e falsi negativi (FN) definiti in maniera diversa rispetto al problema che si deve affrontare..

		Classe predetta	
		Positivo	Negativo
Classe attuale	Positivo	Veri Positivi (TP)	Falsi Positivi (FP)
	Negativo	Falsi Negativi (FN)	Veri Negativi (TN)

Tabella 2.2: Esempio di *confusion matrix*

In questo tipo di validazione le metriche precedentemente esposte assumono i seguenti significati:

- *Veri Positivi*(TP). Glomeruli identificati dall'algoritmo e presenti anche nel ground truth.

- *Falsi Positivi*(FP), Glomeruli identificati dall'algoritmo ma non presenti nel ground truth.
- *Falsi Negativi*(FN), Glomeruli presenti nel ground truth e non identificati dall'algoritmo.

I *Veri Negativi* non assumono significato importante in una validazione basata sugli oggetti, poichè si riferirebbero a tutte le restanti aree classificate correttamente come non appartenenti a glomeruli.

Un glomerulo viene considerato Vero Positivo (TP) se esiste un glomerulo corrispondente nella maschera del ground truth e se l'area della loro intersezione supera il 50% dell'area del glomerulo trovato dall'algoritmo o dell'area di quello annotato manualmente. Se questa condizione non viene soddisfatta il glomerulo sarà considerato Falso Positivo (FP).

Dai valori appena spiegati si ricavano alcune metriche significative per validare le prestazioni dell'algoritmo:

- Valore Predittivo Positivo (*precision*): misura la percentuale di veri positivi sul numero totale di elementi identificati come positivi dall'algoritmo. Si calcola dunque in questo modo:

$$VPP = \frac{TP}{TP + FP} \quad (2.15)$$

- Sensibilità (*recall*): misura la percentuale di veri positivi sul numero totale di elementi effettivamente rilevanti del ground truth (quindi Veri Positivi e Falsi Negativi). Si calcola quindi in questo modo:

$$Sens = \frac{TP}{TP + FN} \quad (2.16)$$

- Coefficiente di Jaccard : misura la percentuale di veri positivi sul totale degli elementi rilevanti del ground truth più quelli erroneamente classificati come presenti. Si calcola quindi in questo modo:

$$J = \frac{TP}{TP + FN + FP} \quad (2.17)$$

- F1-score: è una combinazione di precision e recall. E' ottenuto facendo una media armonica tra le due metriche in questo modo:

$$F_1 = \left(\frac{recall^{-1} + precision^{-1}}{2} \right)^{-1} = 2 \cdot \frac{precision \cdot recall}{precision + recall} \quad (2.18)$$

Validazione Pixel Based

Su tutte le immagini viene anche sviluppata una metrica basata sulle classificazione di tutti i pixel. Le due maschere conterranno infatti pixel del valore di 1 laddove ci sia un glomerulo, 0 su tutto il resto dell'immagine. I valori di tabella 2.2 assumono in questo caso un significato non più basato sulla presenza o meno di glomeruli nell'immagine ma sulla classificazione dei pixel:

- *Veri Positivi*(TP), somma dei pixel dell'intersezione tra la maschera automatica e quella manuale (pixel classificati correttamente come appartenenti a glomeruli)
- *Falsi Positivi*(FP), somma dei pixel dell'intersezione tra la maschera automatica e la maschera manuale negata (pixel classificati erroneamente come appartenenti a glomeruli)
- *Falsi Negativi*(FN), somma dei pixel dell'intersezione tra la maschera automatica negata e la maschera manuale (pixel classificati erroneamente come non appartenenti a glomeruli).
- *Veri Negativi*(TN), somma dei pixel dell'intersezione tra la maschera automatica negata e la maschera manuale negata (pixel classificati correttamente come non appartenenti a glomeruli).

Da questi valori si calcola l'*accuratezza* di segmentazione dell'immagine definita come il rapporto tra i pixel classificati correttamente e tutti i pixel dell'immagine. Quindi:

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

In quelle immagini in cui sono stati individuati dei Veri Positivi si vanno a calcolare anche le diverse metriche già esposte: 1)Precision (equazione 2.15) 2)Recall (equazione 2.16) 3)Jaccard (equazione 2.17) 4)F1core (equazione 2.18)

2.7.2 Metriche di validazione per i tubuli

Il caso dei tubuli è differente da quello dei glomeruli. Non è infatti possibile contare singolarmente ogni singolo tubulo (che sia sano o atrofico) di un vetrino e nemmeno pratico per il patologo. Infatti i tubuli risultano essere molto aggrovigliati e spesso fusi in un'immagine istologica quindi molto difficili da quantificare in maniera precisa. Il patologo, analizzando un vetrino, fornisce la percentuale di area atrofica tubulare sull' area tubulare totale. Per tanto viene implementata una metrica pixel-based e una valutazione comparata tra segmentazioni automatiche e manuali del rapporto tra le aree ricoperte da tubuli atrofici e le aree ricoperte da tutti tubuli.

La validazione Pixel-based è implementata calcolando l'Accuratezza su ogni immagine come nell'equazione 2.19, riferendoci ai TP, TN, FP e FN ottenuti dal confronto tra le maschere automatiche dei tubuli (sani e atrofici) con le rispettive maschere manuali.

Validazione sulle aree

Per ogni immagine del dataset, sia per le maschere manuali che per quelle automatiche, si calcolano:

- *Area Tubuli Atrofici*: somma dei pixel bianchi nelle maschere dei tubuli atrofici.
- *Area Tubuli Sani*: somma dei pixel bianchi nelle maschere dei tubuli sani.

Si va poi a calcolare la percentuale di area atrofica in questo modo:

$$A = \frac{AreaTubuliAtrofici}{AreaTubuliAtrofici + AreaTubuliSani} \quad (2.20)$$

Nella la validazione si vanno a calcolare l'errore assoluto e l'errore relativo per ogni immagine i:

$$EA_i = abs(A_{manuale} - A_{automatica}) \quad (2.21)$$

$$ER_i = A_{manuale} - A_{automatica} \quad (2.22)$$

Come metrica finale si riportano i valori medi dell'errore assoluto e dell'errore relativo con le rispettive deviazioni standard.

Capitolo 3

Risultati

In questo capitolo vengono riportati i risultati ottenuti dall'algoritmo descritto nella seconda sezione di questo lavoro di tesi. Viene effettuata una valutazione quantitativa delle prestazioni della segmentazione automatica di glomeruli sani e sclerotici e tubuli sani e atrofici, in tutte le immagini dei rispettivi dataset. Vengono confrontati i risultati nel training set e nel test set, secondo le metriche descritte nel paragrafo 2.6, per poter capire se l'algoritmo è in grado di generalizzare anche su immagini su cui la rete neurale convoluzionale non è stata allenata. Si procede in ordine, discutendo inizialmente i risultati dei glomeruli: 1)prestazioni della rete 2)risultati sul training 3)risultati sul test. Si seguirà lo stesso procedimento logico per i tubuli e si chiuderà con una breve discussione dei risultati ottenuti.

3.1 Validazione dell'individuazione dei glomeruli

3.1.1 Risultato dell'allenamento della CNN

Durante l'allenamento è utile valutare le performance attraverso un grafico che permetta di capire ad esempio quanto l'accuratezza nella classificazione dei pixel stia incrementando e se si stia incorrendo in overfitting dei dati. Le metriche proposte dall' ambiente MATLAB[©] 2018b sono:

- Accuratezza di classificazione su ogni mini-batch del training set.

- Accuratezza di classificazione nell'intero validation set.
- Perdita su ogni mini-batch del training set.
- Perdita sull'intero validation set.

Come è possibile vedere in figura 3.1 la rete raggiunge una accuratezza di segmentazione globale sul validation set del 99,03%. Inoltre l'allenamento si ferma anticipatamente per il criterio imposto di terminazione. La perdita sul validation set decrementa durante l'allenamento fino a fermarsi ad un valore ≈ 0 .

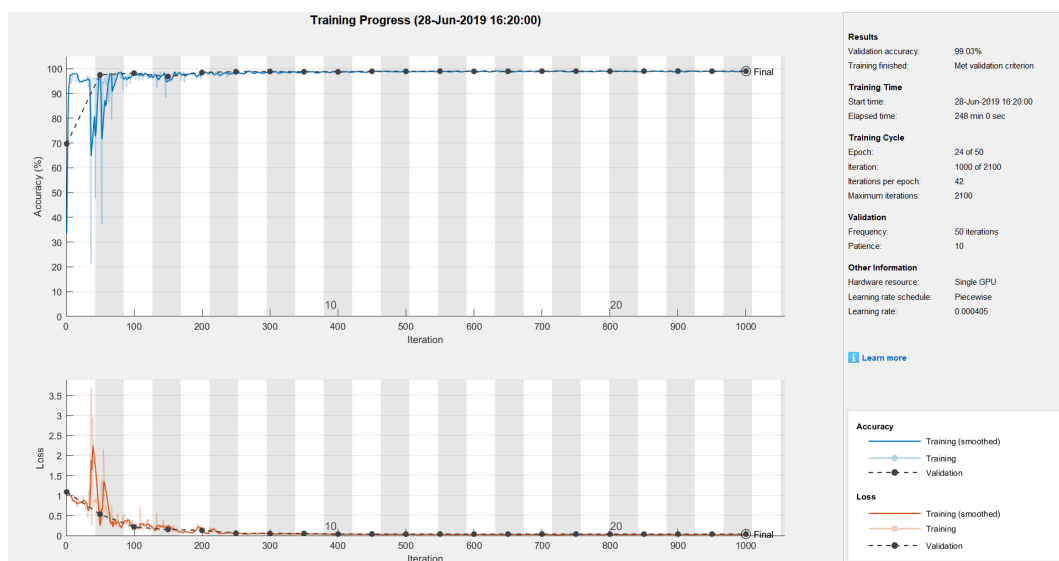


Figura 3.1: Allenamento della AlexNet per segmentazione sui glomeruli.

Nella confusion matrix 3.1 sono riportate le percentuali di accuratezza di segmentazione da parte della rete per ogni classe nelle immagini del validation set.

	altri	sani	sclerotici
altri	99.01%	0.88%	0.11%
sani	0.92%	99.08%	0
sclerotici	12.80%	0	87.20%

Tabella 3.1: Confusion matrix normalizzata che riporta le percentuali di accuratezza nella segmentazione di ogni classe da parte della AlexNet sul Validation set.

Un esempio di immagine di output della rete è riportato in figura 2.16c.

L'allenamento della rete neurale convoluzionale è il primo step per arrivare alla segmentazione e classificazione finale dei glomeruli. Pertanto i risultati ottenuti dall'algoritmo vengono validati quantitativamente sia su dati del training set che su quelli del test set per capire se la rete sia in grado di generalizzare bene il suo allenamento e quindi permetta all'algoritmo di produrre risultati simili in entrambi i dataset.

3.1.2 Risultati sul Training Set

Le metriche di validazione esposte nella sezione 2.7.1 per le 500 immagini di Training presentano i risultati che verranno ora esposti.

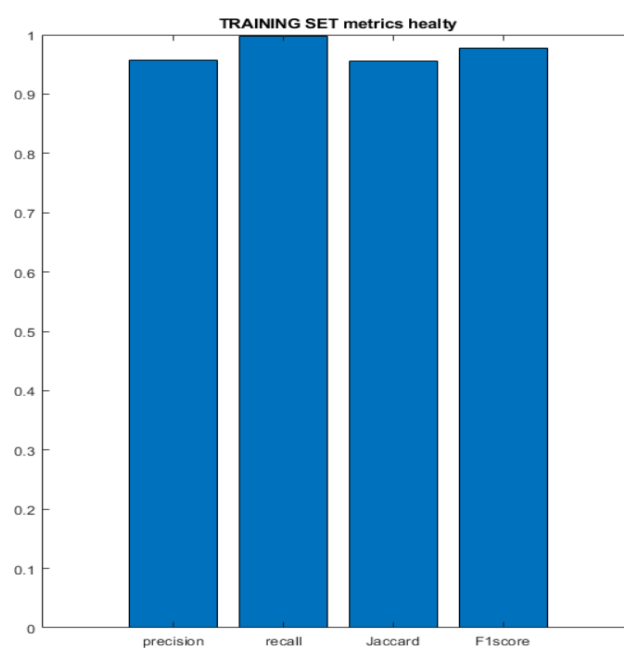
Validazione Object Based

Nelle 500 immagini sono stati individuati e annotati manualmente 401 glomeruli sani e 54 glomeruli sclerotici. La tabella 3.2 riporta il numero di Veri Positivi, Falsi Positivi e Falsi Negativi nel confronto tra le segmentazioni manuali e quelle ottenute dall'algoritmo.

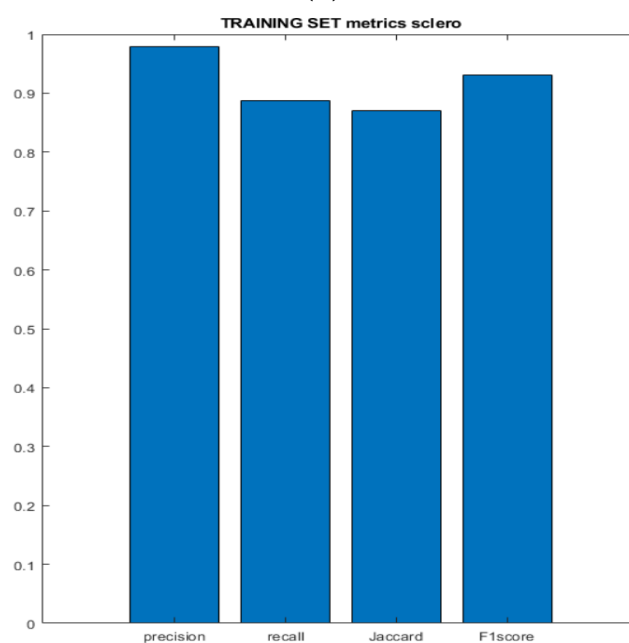
	TP	FP	FN
sani	383	17	1
sclerotici	47	1	6

Tabella 3.2: Numero di Veri Positivi (TP), Falsi Positivi (FP) e Falsi Negativi (FN) nell'individuazione di glomeruli sani e sclerotici nel Training Set.

Le diverse metriche "object based" calcolate sono visibili nel grafico in figura 3.2



(a)



(b)

Figura 3.2: Metriche di validazione Object-based per i glomeruli nel Training Set. In ordine si riportano precision, recall, Jaccard e F1score. **a)** Validazione per i glomeruli sani. **b)** Validazione per i glomeruli sclerotici.

Nell'intero Training set si raggiungono valori molto alti di Precision (95,75% per i sani e 97,92% per gli sclerotici), Recall(99,74% per i sani e 88,68% per gli sclerotici), Jaccard(95,51% per i sani e 87,04% per gli sclerotici) ed F1score(97,70% per i sani e 93,07% per gli sclerotici). Questo significa che l'algoritmo è molto accurato nell'identificazione di glomeruli sani e sclerotici realmente presenti nelle annotazioni manuali e molto preciso nella loro corretta classificazione.

Validazione Pixel Based

Il grafico in figura 3.3 evidenzia l'accuratezza di segmentazione Pixel-Based per ogni immagine di Training, ovvero il rapporto tra i pixel classificati correttamente (veri positivi e veri negativi) sul totale dei pixel dell'immagine.

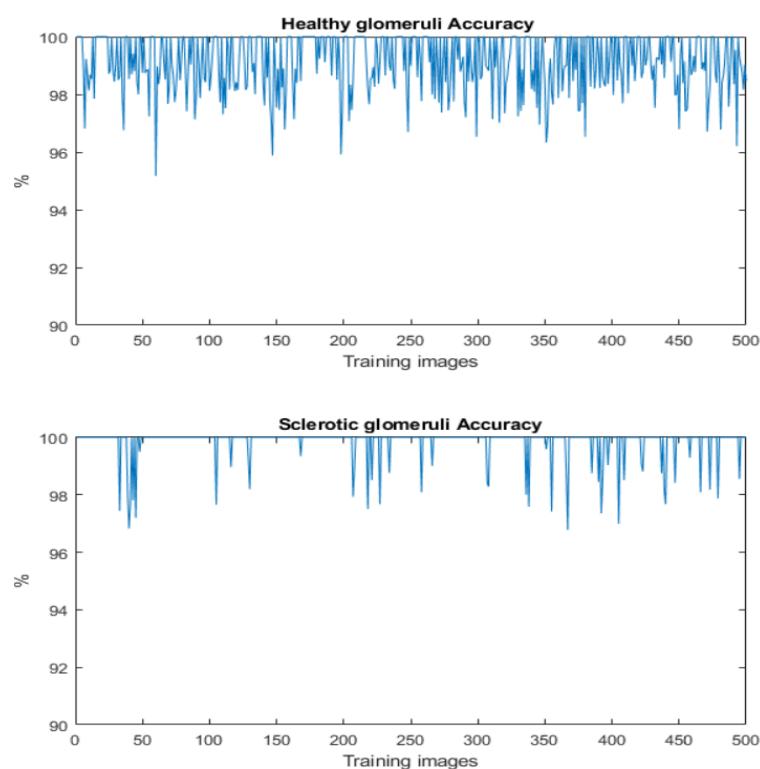


Figura 3.3: Accuratezza Pixel based per i glomeruli in ogni immagine del Training Set. In alto: Accuratezza Pixel based per i glomeruli sani. In basso: Accuratezza Pixel based per i glomeruli sclerotici.

L'accuratezza media di segmentazione dei glomeruli sani è di $99,12\% \pm 0,98\%$ mentre quella dei glomeruli sclerotici è di $99,84\% \pm 0,55\%$. Dunque le strutture vengono mediamente identificate in modo accurato in tutte le immagini di Training.

Sulle immagini in cui la validazione ad oggetti ha rilevato dei veri positivi, vengono calcolate anche tutte le altre metriche "pixel based" in modo da quantificarne in termini di Precision, Recall, Jaccard e F1score la segmentazione (figura 3.4).

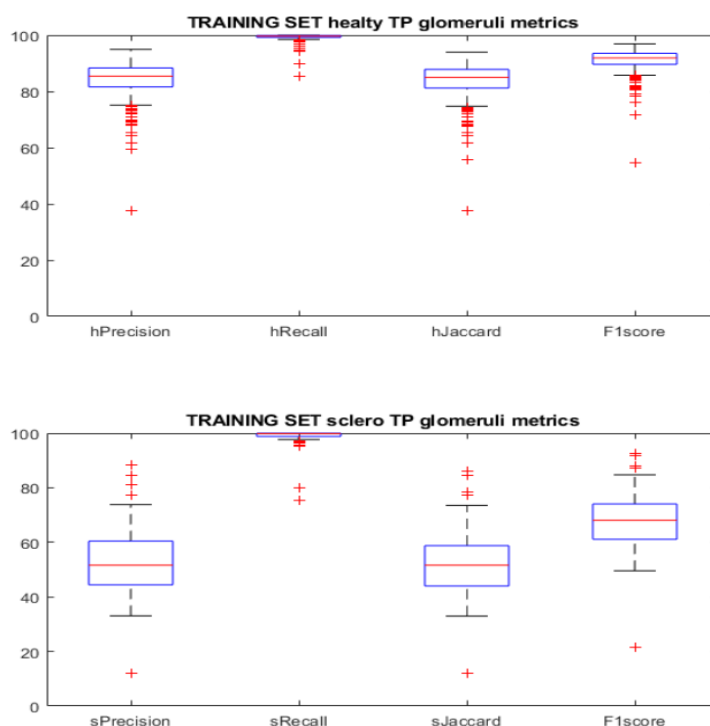


Figura 3.4: Metriche pixel-based sui veri positivi. In ordine: precision, recall, jaccard, F1score. In alto: metriche sui glomeruli sani. In basso: metriche sui glomeruli sclerotici.

	Precision	Recall	Jaccard	F1score
sani	84,94% \pm 6,05%	99,33% \pm 1,31%	83,57% \pm 6,54%	90,90% \pm 4,31%
sclerotici	53,24% \pm 15,26%	98,21% \pm 4,80%	52,52% \pm 14,71%	67,66% \pm 13,02%

Tabella 3.3: Metriche pixel based valutate sui TP.

3.1.3 Risultati sul Test Set

Le metriche di validazione esposte nella sezione 2.7.1 per le 120 immagini di Test presentano i risultati di seguito analizzati.

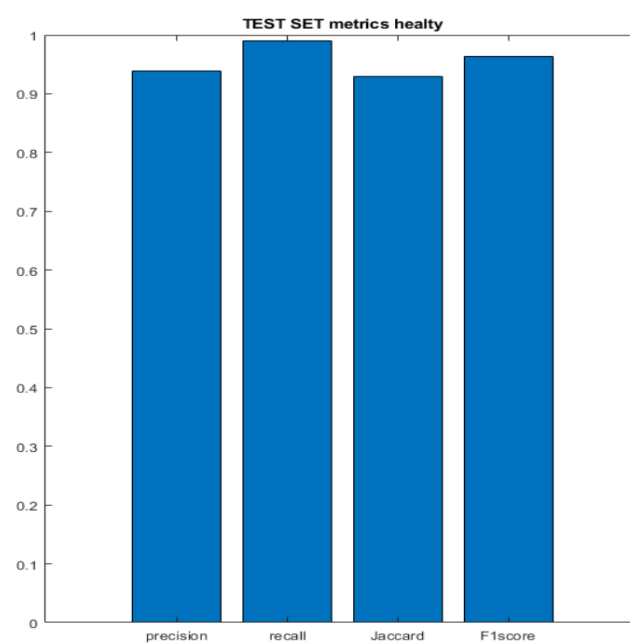
Validazione Object Based

Nelle 120 immagini sono stati individuati e annotati manualmente 99 glomeruli sani e 11 glomeruli sclerotici. La tabella 3.4 riporta il numero di Veri Positivi, Falsi Positivi e Falsi Negativi nel confronto tra le annotazioni manuali e le segmentazioni dell'algoritmo.

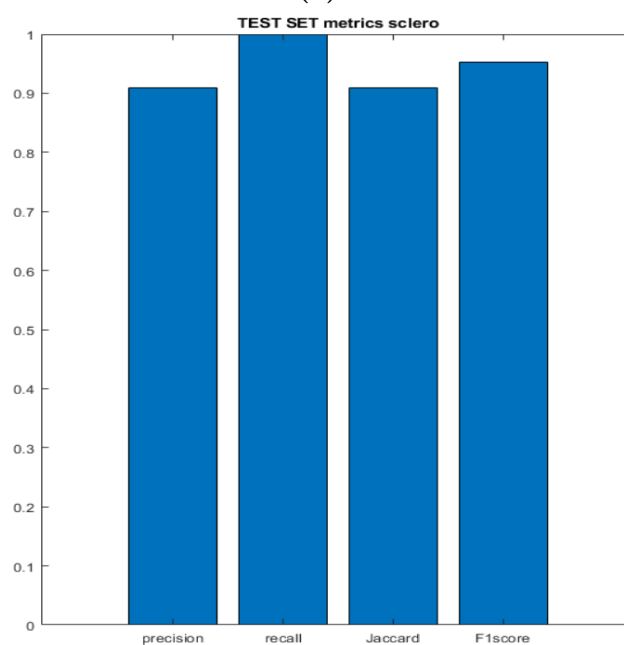
	TP	FP	FN
sani	92	6	1
sclerotici	10	1	0

Tabella 3.4: Numero di Veri Positivi (TP), Falsi Positivi(FP) e Falsi Negativi (FN) nell'individuazione di glomeruli sani e sclerotici nel Test Set.

Le diverse metriche "object-based" calcolate sono apprezzabili nel grafico in figura 3.5



(a)



(b)

Figura 3.5: Metriche di validazione object-based per i glomeruli nel test set. In ordine si riportano Precision, Recall, Jaccard e F1score. **a)** Validazione per i glomeruli sani. **b)** Validazione per i glomeruli sclerotici.

Nell'intero Test set si raggiungono valori molto alti di Precision (93,88% per i sani e 90,91% per gli sclerotici), Recall(98,92% per i sani e 100% per gli sclerotici), Jaccard(92,93% per i sani e 90,91% per gli sclerotici) ed F1score(96,34% per i sani e 95,24% per gli sclerotici). Anche nelle immagini di Test l'algoritmo è molto accurato nell'identificazione di glomeruli sani e sclerotici realmente presenti nelle annotazioni manuali e molto preciso nella loro corretta classificazione.

Validazione Pixel Based

L'accuratezza di classificazione dei singoli pixel sia per i glomeruli sani che per quelli sclerotici, in ogni immagine di Test, viene mostrata nel grafico in figura 3.6.

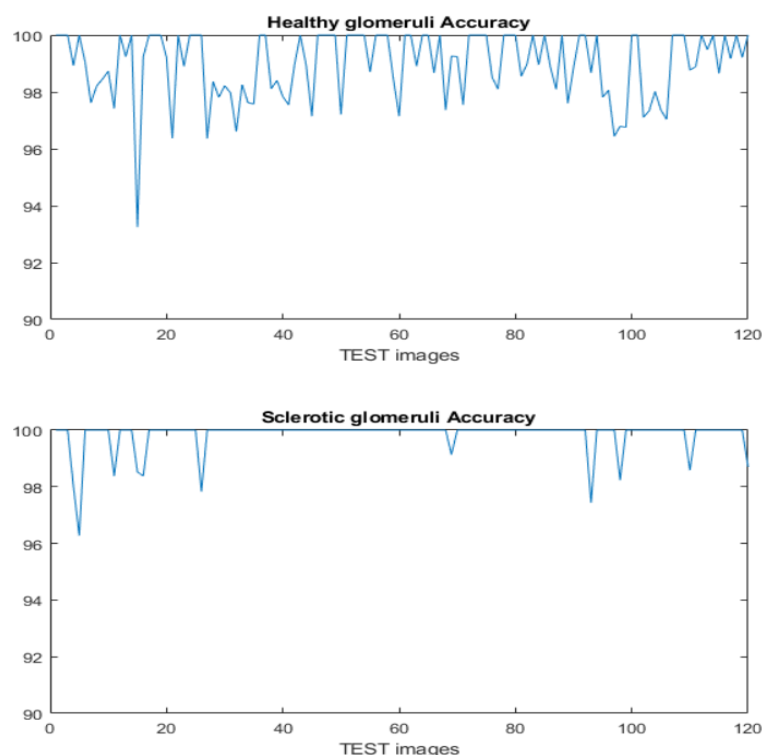


Figura 3.6: Accuratezza Pixel based per i glomeruli in ogni immagine del test set. In alto:Accuratezza Pixel based per i glomeruli sani. In basso:Accuratezza Pixel based per i glomeruli sclerotici.

L'accuratezza media di segmentazione dei glomeruli sani è nelle immagini di Test di $98,96\% \pm 1,22\%$ mentre quella dei glomeruli sclerotici è di $99,83\% \pm$

0.59%. Dunque le strutture anche in questo caso vengono identificate in modo accurato.

Di nuovo, sulle immagini contenenti almeno un vero positivo nella validazione ad oggetti, vengono calcolate tutte le varie metriche "pixel based" riportate in figur 3.7

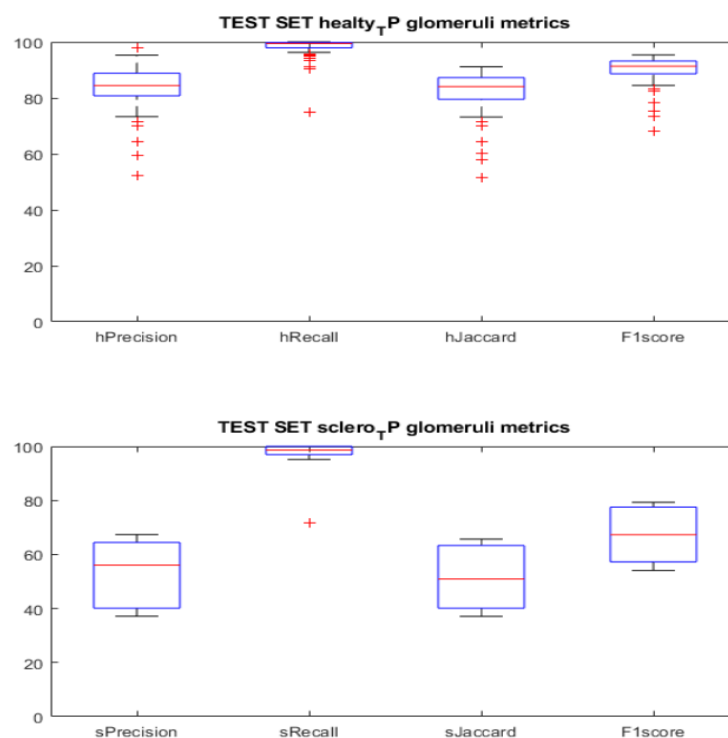


Figura 3.7: Metriche pixel-based sui veri positivi. In ordine: precision, recall, jaccard, F1score. In alto: metriche sui glomeruli sani. In basso: metriche sui glomeruli sclerotici.

	Precision	Recall	Jaccard	F1score
sani	83,63% \pm 7,92%	98,08% \pm 3,67%	82,24% \pm 7,95%	90,03% \pm 5,26%
sclerotici	53,24% \pm 12,64%	95,82% \pm 8,69%	51,65% \pm 12,15%	67,35% \pm 10,65%

Tabella 3.5: Metriche pixel based valutate sui TP.

Tempo computazionale

Per l'intero processing di un'immagine di dimensioni $512 \times 512 \times 3$ nell'individuazione di glomeruli sani e sclerotici il tempo medio impiegato è di $0.63s \pm 0.09s$. La macchina su cui sono state elaborate le immagini utilizza un processore Intel(R) Core(TM) i7-7700HQ CPU @ 2.80 GHz.

3.2 Validazione dell'individuazione dei tubuli

3.2.1 Risultato dell'allenamento della CNN

La CNN allenata sulle 200 immagini di training per riconoscere lumi e contorni dei tubuli, come si vede in figura 3.8, raggiunge un'accuratezza globale di corretta classificazione sul validation set del 85.17%. In questo caso l'allenamento si ferma al raggiungimento del numero massimo di iterazioni imposto e la perdita sul validation è più alta e arriva ad un valore $x \ 0.4 < x < 0.2$.

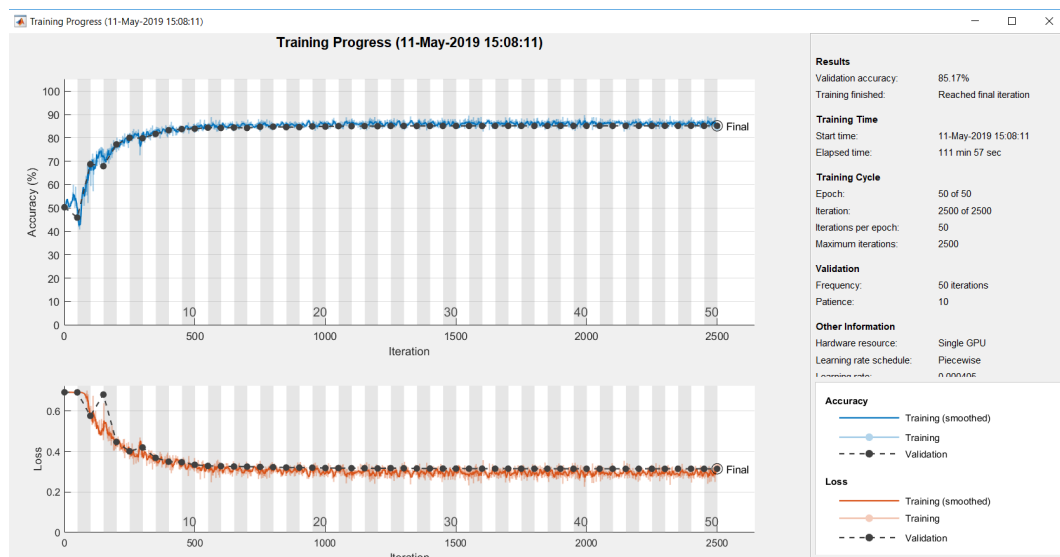


Figura 3.8: Allenamento della AlexNet per segmentazione dei tubuli.

La rete non raggiunge prestazioni simili a quelle dei glomeruli poichè c'è molta più variabilità nelle caratteristiche dell'interno dei tubuli e dei loro contorni. Nella confusion matrix 3.6 sono riportate le percentuali di accuratezza

di segmentazione da parte della rete per ogni classe (lume, contorni, altro) nelle immagini del validation set.

	altri	lume	contorni
altri	85.99%	1.45%	12.56%
lume	1.77%	80.44%	17.79%
contorni	8.84%	12.60%	78.56%

Tabella 3.6: Confusion matrix normalizzata che riporta le percentuali di accuratezza nella segmentazione di ogni classe da parte della AlexNet sul Validation set.

3.2.2 Risultati sul Training Set

Le metriche esposte nella sezione 2.7.1 vengono utilizzate sulle 200 immagini di Training.

Validazione Pixel Based

Poichè è importante stabilire quanta area è ricoperta dai tubuli atrofici sul totale dei tubuli presenti per valutare la condizione patologica del rene, per ogni immagine di Training si riporta il valore dell'accuratezza di classificazione dei singoli pixel tanto per i tubuli atrofici quanto per quelli sani (figura 3.9).

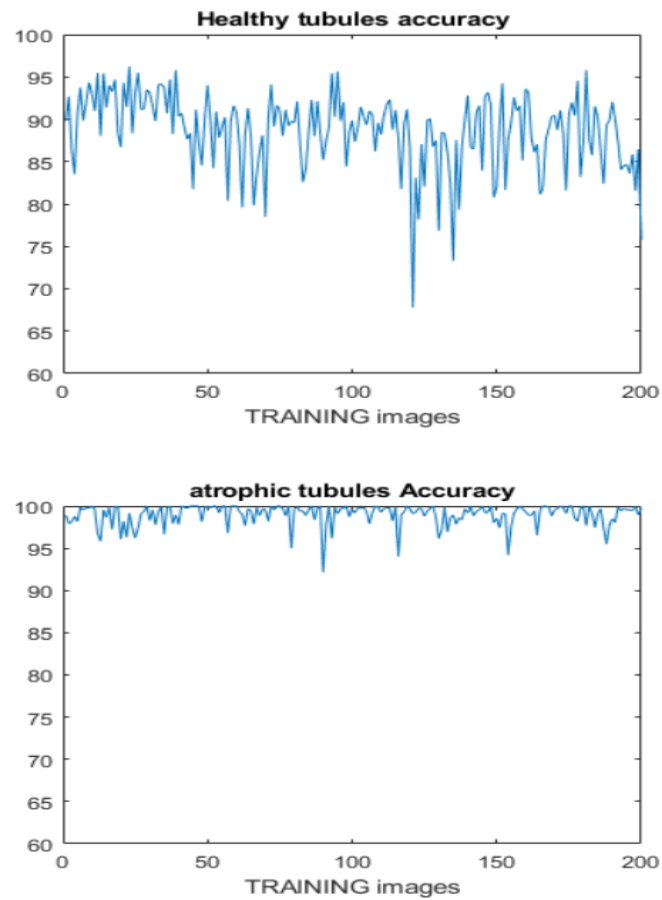


Figura 3.9: Accuratezza Pixel based per i tubuli in ogni immagine del Training Set. In alto: Accuratezza Pixel based per i tubuli sani. In basso: Accuratezza Pixel based per i tubuli atrofici.

L'accuratezza media nelle immagini di training nel caso dei tubuli atrofici è di $98,98\% \pm 1,26\%$ e $88,62\% \pm 4.44\%$ nel caso dei sani. Questo significa che mediamente in ogni immagine i pixel sono classificati nella maniera corretta.

Validazione sulle aree

Il grafico figura 3.10 evidenzia il confronto tra il rapporto dell'area dei tubuli atrofici sull'area di tutti i tubuli calcolato nella maschera manuale e in quella automatica per ogni immagine.

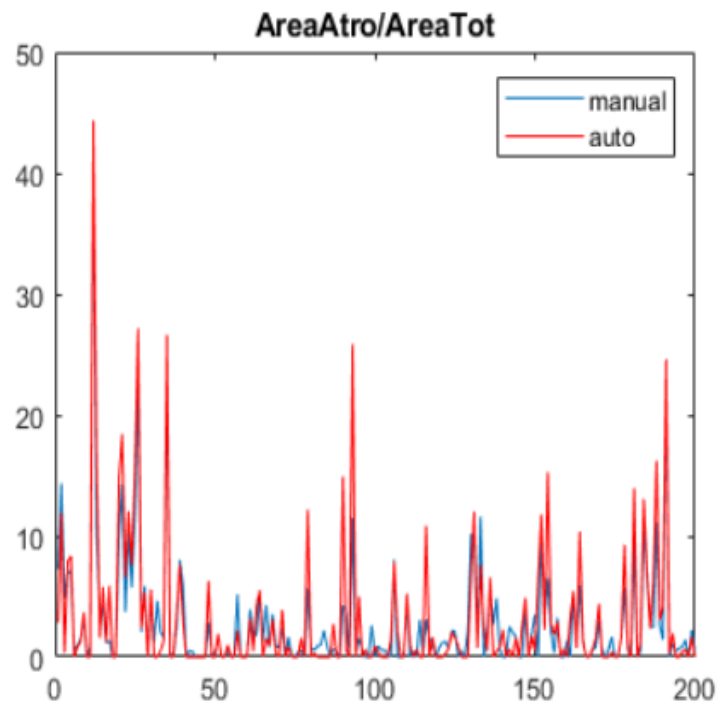


Figura 3.10: Rapporto tra area atrofica e area tubulare nel training set. In rosso i valori manuali, in azzurro quelli automatici.

Gli errori assoluti e quelli relativi nella stime di questi due valori in ogni immagine del Training, vengono mostrati nel grafico in figura 3.11.

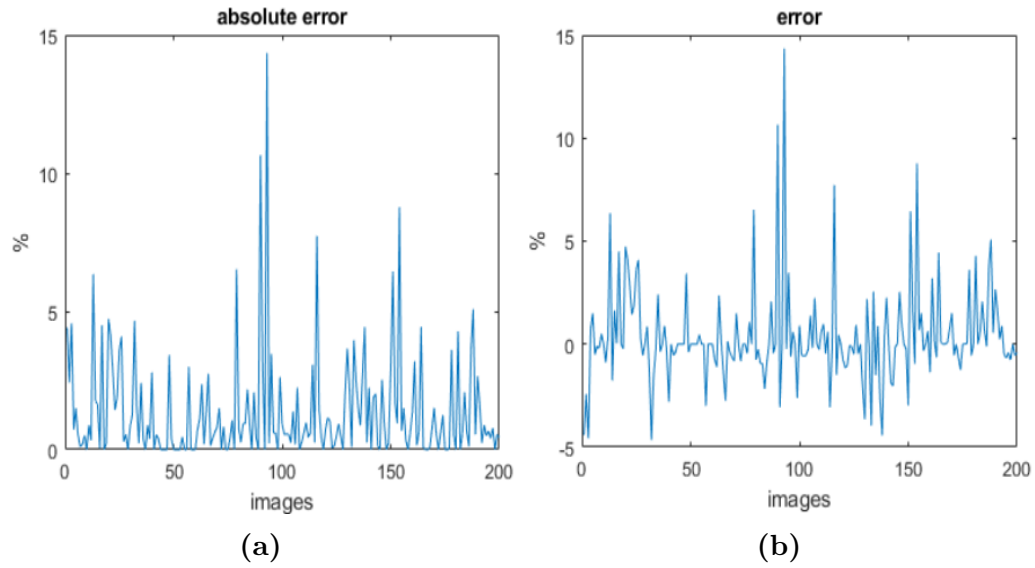


Figura 3.11: Errori assoluti e relativi sul rapporto tra aree atrofiche sulle aree tubulari nel training. **a)**Errori assoluti. **b)**Errori relativi.

Il valore medio dell' errore assoluto è $1.36\% \pm 1.95$ mentre il valore medio dell'errore relativo è $0.36\% \pm 2.35$ (figura 3.12). Il fatto che entrambi i valori siano molto vicini a 0 indica che mediamente il rapporto tra l'area atrofica e l'area totale ricoperta da tubuli viene correttamente stimato in ogni immagine. Il valore medio positivo dell'errore relativo indica che, nelle 200 immagini di Training, l'area atrofica è leggermente sottostimata.

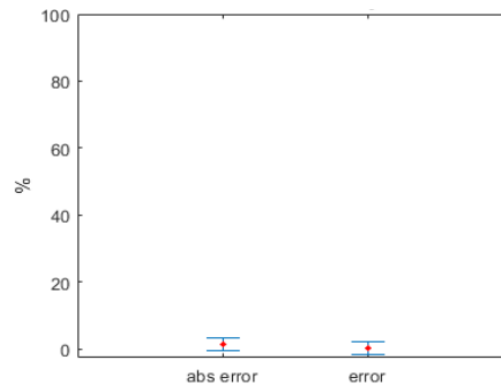


Figura 3.12: Valori medi e standard deviation dell'errore assoluto e di quello relativo nelle immagini di training.

3.2.3 Risultati sul Test Set

Le prestazioni dell'algoritmo vengono validate anche sulle 9 immagini di test selezionate per la classificazione e la segmentazione dei tubuli.

Validazione Pixel Based

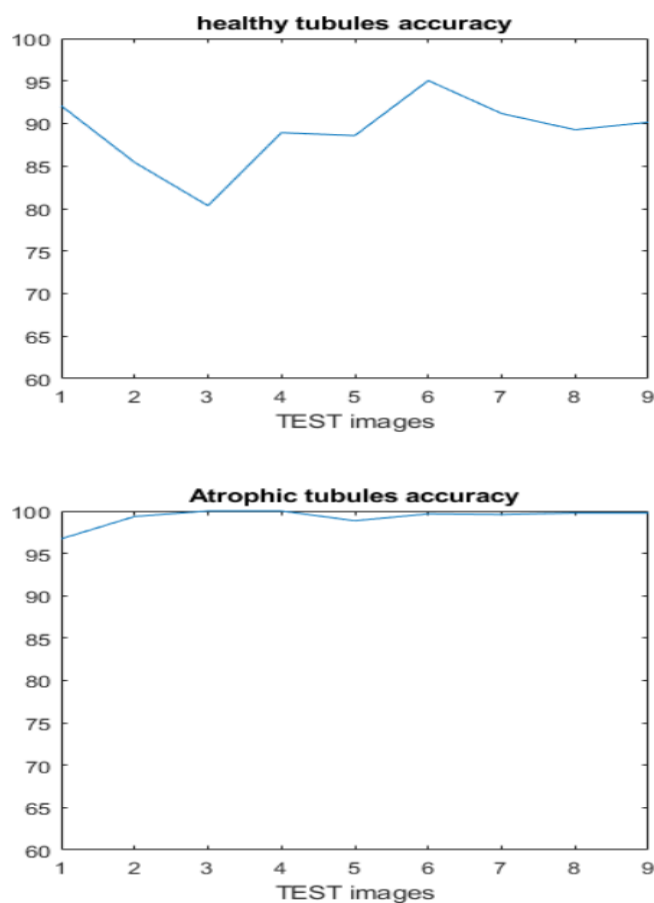


Figura 3.13: Accuratezza Pixel based per i tubuli in ogni immagine del test set. In alto: Accuratezza Pixel based per i tubuli sani. In basso: Accuratezza Pixel based per i tubuli atrofici.

L'accuratezza media nelle immagini di test nel caso dei tubuli atrofici è di $99.3\% \pm 1.02\%$ e $88.99\% \pm 4.18\%$ nel caso dei sani. Anche in questo caso in tutte le immagini le strutture vengono classificate in maniera accurata.

Validazione sulle aree

Per ogni immagine si riporta nel grafico di figura 3.14 il confronto tra il rapporto dell'area dei tubuli atrofici sull'area di tutti i tubuli calcolato nella maschera manuale e in quella automatica.

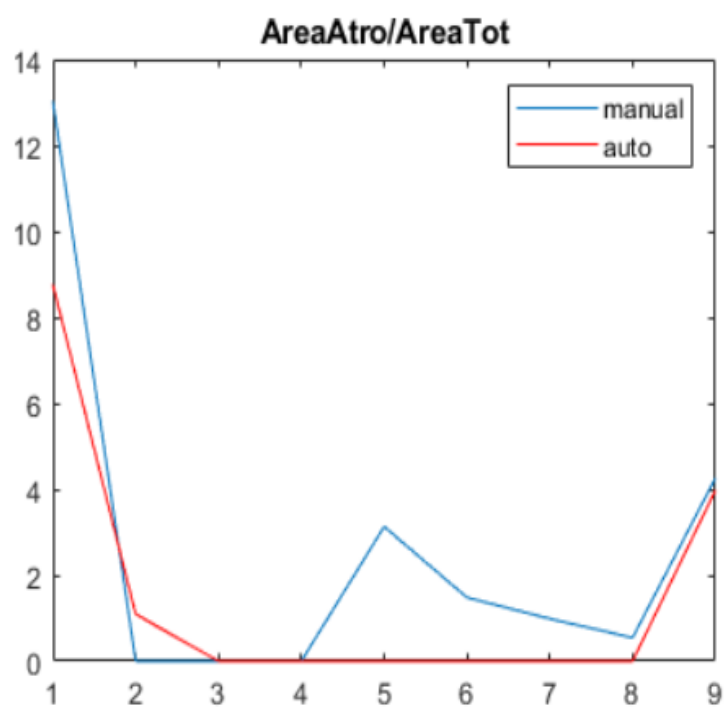


Figura 3.14: Rapporto tra area atrofica e area tubulare nel training set. In rosso i valori manuali, in azzurro quelli automatici.

Di seguito, nel grafico in figura 3.15, gli errori assoluti e relativi tra le annotazioni manuali e automatiche nel calcolo del rapporto tra area atrofica e quella tubulare.

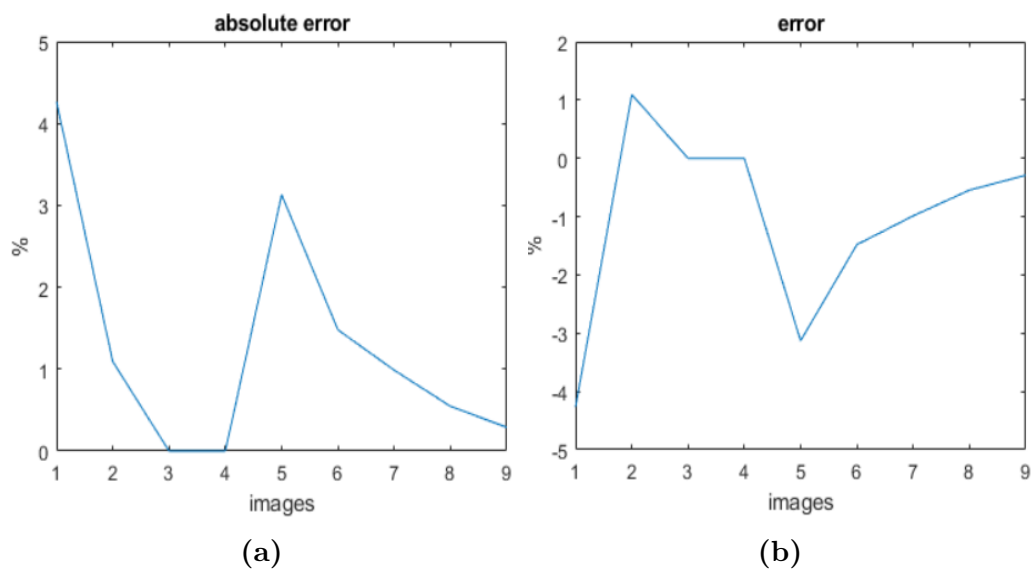


Figura 3.15: Errori assoluti e relativi sul rapporto tra aree atrofe sulle aree tubulari nel test. **a)**Errori assoluti. **b)**Errori relativi.

Il valore medio su tutte le immagini di test dell' errore assoluto è $1.31\% \pm 1.47$ mentre il valore medio dell'errore relativo è $-1.07\% \pm 1.68$ (figura 3.12). In questo caso l'area atrofica viene leggermente sovrastimata, come dimostrato dal valore negativo dell'errore relativo. Ma in ogni caso entrambi gli errori vicini allo zero dimostrano una buona corrispondenza tra segmentazione automatica ed il ground truth.

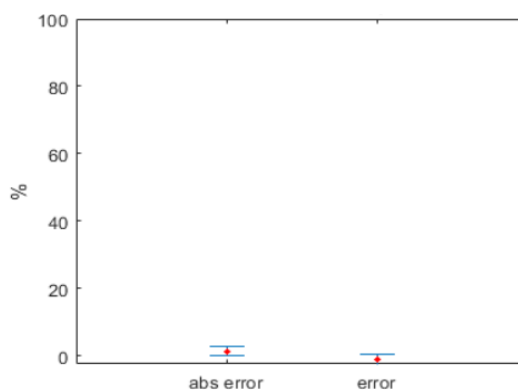


Figura 3.16: Valori medi e standard deviation dell'errore assoluto e di quello relativo nelle immagini di test.

3.2.4 Tempo computazionale

Per la segmentazione e la classificazione delle strutture tubulari in ogni immagine di dimensioni $512 \times 512 \times 3$ analizzata, l'algoritmo impiega un tempo medio di $13.77s \pm 4.23s$. La macchina su cui sono state elaborate le immagini utilizza un processore Intel(R) Core(TM) i7-7700HQ CPU @ 2.80 GHz.

3.3 Commento dei risultati

3.3.1 Individuazione dei glomeruli

I risultati mostrano come le prestazioni ottenute sul Training Set e sul Test Set siano assolutamente paragonabili. Questo significa che la CNN utilizzata è in grado di generalizzare il proprio apprendimento anche in immagini mai viste prima.

Nell'analisi di un vetrino di tessuto renale, per la valutazione dello score glomerulare, il patologo conta singolarmente ogni glomerulo per poter fornire la quantità precisa di sclerosi glomerulare. Pertanto è molto importante riuscire a quantificare tutte le strutture in maniera attendibile. Le prestazioni dell'algoritmo raggiungono un F1score del 96.34% per i glomeruli sani e del 95.24% per quelli sclerotici nelle immagini di test (quindi mai analizzate dalla rete neurale convoluzionale durante l'allenamento) che risulta essere un risultato assolutamente soddisfacente. Infatti questo significa che il numero di Veri Positivi individuati dall'algoritmo è molto maggiore sia dei Falsi Negativi che dei Falsi Positivi, quindi l'algoritmo individua le strutture in maniera accurata ed è molto preciso nella loro classificazione.

3.3.2 Individuazione dei tubuli

Nel caso dei tubuli l'approccio al problema è diverso. Un patologo, nell'analisi del campione istologico, non può riuscire a contare ogni singolo tubulo. Pertanto l'atrofia tubulare deve essere identificata come rapporto tra l'area occupata da tubuli atrofici e l'area complessiva ricoperta dai tubuli. Come evidenziato in tabella 1.1, per l'attribuzione dello score tubulare il patologo quantifica le aree atrofiche sulla totalità dei tubuli presenti con 3 percentuali di riferimento:

0%, 20% e 50%. L'algoritmo, in ogni immagine analizzata del test, raggiunge un errore assoluto medio tra la segmentazione manuale e quella automatica sul rapporto di aree atrofiche su aree tubulari dell' 1.31%, mentre l'errore relativo medio è del -1.07%. Questo significa che mediamente l'area tubulare è leggermente sovrastimata (preferibile rispetto ad una sottostima nelle analisi mediche) dall'algoritmo, ma comunque risulta essere decisamente paragonabile alla valutazione di operatore manuale esperto. Inoltre l'accuratezza media raggiunta di segmentazione nelle immagini di test è alta per entrambe le strutture ricercate: 99.3% nel caso dei tubuli atrofici, 88.99% nel caso di quelli sani.

Capitolo 4

Conclusioni e sviluppi futuri

4.1 Conclusioni

Questo lavoro di tesi propone un algoritmo automatico per l'identificazione e la quantificazione di strutture patologiche in immagini istologiche di rene, concentrandosi principalmente sulla sclerosi glomerulare e sull'atrofia tubulare. Il progetto si pone come strumento di supporto, aiuto o second opinion, per il patologo nell'analisi di un vetrino di tessuto renale, proveniente da donatore "marginale". Quantificare le percentuali di glomeruli sclerotici e tubuli atrofici presenti nel campione biotico è di fondamentale importanza per valutare le condizioni di trapiantabilità di un rene non ottimale, e per la scelta conseguente delle modalità di trapianto da seguire. Ed inoltre bisogna considerare la possibilità di agire in regime d'urgenza, condizione che richiede un'analisi non solo precisa ma anche molto rapida. Fornire dunque al patologo uno strumento che sia in grado di valutare velocemente e in maniera accurata le condizioni patologiche del tessuto renale potrebbe rivelarsi molto utile per la successiva analisi medica. Si è dimostrato che, su immagini estratte dalla digitalizzazione del vetrino, si raggiungono prestazioni molto soddisfacenti nell'individuazione di glomeruli sclerotici (F1score del valore di 95.24% nelle immagini di test) e di glomeruli sani (F1score del valore di 96.34% nelle immagini di test) che vengono individuati in maniera corretta se confrontati con un operatore manuale esperto. Anche le percentuali di area atrofica vengono individuate in maniera molto precisa, con un errore assoluto medio dell'1.31% rispetto alla valutazione di un

patologo su ogni immagine su cui è testato l'algoritmo.

Il tempo medio impiegato per il processing di un'immagine di dimensioni 512x512x3 ad alta risoluzione è di 14,77s, elaborate su un dispositivo con un processore Intel(R) Core(TM) i7-7700HQ CPU @ 2.80 GHz. Il tempo computazionale dovrebbe essere moltiplicato per ogni immagine del vetrino analizzata, ma possibilmente ridotto dall'utilizzo di macchine più potenti.

Il lavoro di tesi dunque propone un algoritmo rapido e sufficientemente preciso per l'identificazione automatica di strutture patologiche in immagini istologiche renali. La qualità dei risultati e le performance raggiunte potrebbero essere una solida base per una successiva fase di miglioramenti e sviluppi che potranno davvero accompagnare la valutazione patologica di biopsie di rene.

4.2 Sviluppi futuri

La prima estensione quasi naturale dell'algoritmo proposto è quella di riuscire ad identificare lo score glomerulare e quello tubulare su regioni del vetrino con il campione bioptico che il patologo vuole analizzare. Si tratterebbe di permettere al medico la scelta di un'area di uno o più frustini utili della biopsia estratta. Una volta identificati i campioni si dovrebbero estrarre da questi immagini delle dimensioni su cui l'algoritmo è in grado di fornire una risposta (512x512x3) riuscendo ad eliminare sfondo del vetrino e zone con errori di colorazione. L'analisi complessiva di tutte queste immagini permetterebbe di segmentare ed individuare le strutture patologiche su ognuna di esse, e sommando i risultati si otterrebbero lo score tubulare e lo score glomerulare dell'intera biopsia. Inoltre l'algoritmo è stato allenato su un dataset non troppo ampio. Si avevano a disposizione 620 annotazioni manuali di glomeruli e solamente 209 annotazioni manuali di tubuli. Poter aumentare il dataset a disposizione renderebbe possibile sicuramente un allenamento migliore della rete neurale convoluzionale, maggiormente generalizzato su un numero cospicuo di dati variabili e sicuramente le prestazioni potrebbero molto migliorare. In ultimo, l'approccio basato sul *Deep Learning* si è rivelato promettente nell'individuazioni di glomeruli e in parte anche in quella dei tubuli (i tubuli atrofici sono infatti stati individuati con metodi euristici). Lo stesso tipo di approccio potrebbe essere allora utilizzato anche per l'analisi delle strutture

vascolari, strutture importanti per la valutazione complessiva dello score di Karpinski. L'obiettivo finale dovrebbe essere quello di estendere il tool proposto all'analisi dell'intera biopsia per tutte le strutture che devono essere prese in esame dal patologo, in maniera tale da poter fornire un supporto o una seconda opinion in quelle circostanze in cui si deve scegliere se trapiantare, o meno, un rene proveniente da un donatore non ottimale.

Bibliografia

- [1] Cindy L. Stanfield. *Principles of Human Physiology. Fourth Edition*. Benjamin Cummings, 2007.
- [2] Asko Ristolainen. «Phantom organs and their applications in robotic surgery and radiology training». Tesi di dott. Lug. 2015.
- [3] *infoKID*. URL: <https://www.infokid.org.uk/about-urinary-system-and-kidneys>. (visitato il 19 Giugno 2019).
- [4] J E Gerich. «Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications». In: *Diabet Med*. 27.2 (feb. 2010), pp. 136–142. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4232006/>.
- [5] "Angela C Webster, Evi V Nagler Rachael e L Morton Philip Masson". «"Chronic kidney disease"». In: *Lancet* 389.52 (feb. 2017), pp. 1238–52. DOI: "http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5".
- [6] "AS Levey, C Becker e LA Inker". «"Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review"». In: *JAMA* 313.8 (feb. 2015), pp. 837–846. DOI: "10.1001/jama.2015.0602". URL: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2130322>.
- [7] "CKD Work Group". «"KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease"». In: *Kidney Int Suppl* 313.8 (feb. 2013), pp. 1–150.

- [8] Patricia M Kearney et al. «Global burden of hypertension: analysis of worldwide data». In: *The Lancet* 365.9455 (2005), pp. 217–223. ISSN: 0140-6736. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17741-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17741-1). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673605177411>.
- [9] Robert A. Wolfe et al. «Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant». In: *New England Journal of Medicine* 341.23 (1999). PMID: 10580071, pp. 1725–1730. DOI: 10.1056/NEJM199912023412303. eprint: <https://doi.org/10.1056/NEJM199912023412303>. URL: <https://doi.org/10.1056/NEJM199912023412303>.
- [10] Friedrich K. Port et al. «Comparison of Survival Probabilities for Dialysis Patients vs Cadaveric Renal Transplant Recipients». In: *JAMA* 270.11 (set. 1993), pp. 1339–1343. ISSN: 0098-7484. DOI: 10.1001/jama.1993.03510110079036. eprint: https://jamanetwork.com/journals/jama/articlepdf/408453/jama_270_11_036.pdf. URL: <https://doi.org/10.1001/jama.1993.03510110079036>.
- [11] P. Ruggenti, N. Perico e G. Remuzzi. «Ways to Boost Kidney Transplant Viability: A Real Need for the Best Use of Older Donors». In: *American Journal of Transplantation* 6.11 (2006), pp. 2543–2547. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01519.x. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1600-6143.2006.01519.x>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-6143.2006.01519.x>.
- [12] Robert A. Metzger et al. «Expanded criteria donors for kidney transplantation». In: *American Journal of Transplantation* 3.s4 (2003), pp. 114–125. DOI: 10.1034/j.1600-6143.3.s4.11.x. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1034/j.1600-6143.3.s4.11.x>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1600-6143.3.s4.11.x>.
- [13] Vincent Audard et al. «Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview». In: *Transplant International* 21.1 (2008), pp. 11–17. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2007.

- 00543.x. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1432-2277.2007.00543.x>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1432-2277.2007.00543.x>.
- [14] L. F. Ross, S. Zenios e J. R. Thistlethwaite. «Shared decision making in deceased-donor transplantation». In: *Lancet* 368.9532 (lug. 2007), pp. 333–337.
- [15] Muhammad Abdul Mabood Khalil. «Dual Kidney Transplantation: A Review of Past and Prospect for Future». In: *Int Sch Res Notices*. (Lug. 2017). DOI: 10.1155/2017/2693681. eprint: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5511653/>. URL: <https://doi.org/10.1001/jama.1993.03510110079036>.
- [16] F. K. Port et al. «Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors». In: *Transplantation* 74.9 (nov. 2002), pp. 1281–6.
- [17] J. Lloveras et al. «Long-term follow-up of recipients of cadaver kidney allografts from elderly donors». In: *Transplant. Proc.* 25.6 (dic. 1993), pp. 3175–6.
- [18] G. Remuzzi e N. Perico. «Protecting single-kidney allografts from long-term functional deterioration». In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 9.7 (lug. 1998), pp. 1321–32.
- [19] A. Hassan e A. Halaw. «“Dual kidney transplan». In: *Exp. Clin. Transplant.* 13.6 (lug. 2015), pp. 500–509.
- [20] V. D. D’Agati e D. J. Cohen. «reimplantation renal biopsy: structure does predict function». In: *Transplantation* 75.3 (feb. 2003), pp. 264–6.
- [21] M. N. Gurcan et al. «Histopathological image analysis: A review». In: *IEEE reviews in biomedicalengineering* 2 (2009), p. 147.
- [22] *Tecniche istologiche*. URL: [http://www.wesapiens.org/class/4933003/file/2/Histological+techniques%5C%3A+How+is+done+to+get+histological+sections%5C%2C+Embedding+and+sectioning+\(diagram+in+spanish\)](http://www.wesapiens.org/class/4933003/file/2/Histological+techniques%5C%3A+How+is+done+to+get+histological+sections%5C%2C+Embedding+and+sectioning+(diagram+in+spanish)). (visitato il 21 Giugno 2019).

- [23] *Hematoxylin and eosin stain*. URL: http://www.uniroma2.it/didattica/tecnistol/deposito/LEZ._2-_ISTOMORFOLOGICHE.pdf. (visitato il 21 Giugno 2019).
- [24] J. Karpinski et al. «Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function». In: *Transplantation* 67.8 (apr. 2009), pp. 1162–7.
- [25] GIUSEPPE REMUZZI et al. «Early Experience with Dual Kidney Transplantation in Adults using Expanded Donor Criteria». In: *Journal of the American Society of Nephrology* 10.12 (1999), pp. 2591–2598. ISSN: 1046-6673. eprint: <https://jasn.asnjournals.org/content/10/12/2591.full.pdf>. URL: <https://jasn.asnjournals.org/content/10/12/2591>.
- [26] G. Fuiano et al. «Glomerulosclerosi focale segmentaria». In: *Giornale Italiano di Nefrologia* 18.5 (2001), pp. 510–523. URL: https://www.asnit.org/download/Glomerulonefrosi_Focale_Segmentaria.pdf.
- [27] Cameron JS. «The enigma of focal segmental glomerulosclerosis». In: *Kidney Int* 50.57 (1996), pp. 119–31. URL: https://www.asnit.org/download/Glomerulonefrosi_Focale_Segmentaria.pdf.
- [28] *Nefrite tubulo-interstiziale*. URL: <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/disturbi-genitourinari/malattie-tubulointerstiziali/nefrite-tubulo-interstiziale>. (visitato il 21 Giugno 2019).
- [29] *Aperio scanscope slide scanner*. URL: Available: <https://med.virginia.edu/biomolecular-analysis-facility/services/shared-instrumentation/aperio-scanscope-slide-scanner/>. (visitato il 23 Giugno 2019).
- [30] *Convolutional Neural Networks (LeNet)*. URL: <http://deeplearning.net/tutorial/lenet.html>. (visitato il 23 Giugno 2019).
- [31] *Convolutional Neural Networks*. URL: <http://cs231n.github.io/convolutional-networks/>. (visitato il 23 Giugno 2019).
- [32] *Convolutional Neural Networks*. URL: <https://medium.com/@udemeudofia01/basic-overview-of-convolutional-neural-network-cnn-4fcc7dbb4f17>. (visitato il 23 Giugno 2019).

- [33] Krizhevsky Alex, Sutskever Ilya e E. Geoffrey. «TImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks». In: *Communications of the ACM* 60.6 (mag. 2012), pp. 84–90. DOI: doi:10.1145/3065386. ISSN0001-0782..
- [34] *Understanding AlexNet*. URL: <https://www.learnopencv.com/wp-content/uploads/2018/05/AlexNet-1.png>. (visitato il 23 Giugno 2019).
- [35] 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* (2007).
- [36] W. Rawat e Z. Wang. «deep convolutional neural networks for image classification: A comprehensive review». In: *Neural computation* 29.9, (2017), pp. 352–2449.
- [37] L. Torrey e J. Shavlik. «“Transfer learning,” in Handbook of Research on Machine Learning Applications and Trends: Algorithms, Methods, and Techniques.» In: *GIGlobal* (2010), pp. 242–264.
- [38] *Transfer learning from pre-trained models*. URL: <https://towardsdatascience.com/transfer-learning-from-pre-trained-models-f2393f124751>. (visitato il 23 Giugno 2019).
- [39] *Understanding Semantic Segmentation with UNET*. URL: <https://towardsdatascience.com/understanding-semantic-segmentation-with-unet-6be4f42d4b47>. (visitato il 27 Giugno 2019).
- [40] *Up-sampling with Transposed Convolution*. URL: <https://towardsdatascience.com/up-sampling-with-transposed-convolution-9ae4f2df52d0>. (visitato il 27 Giugno 2019).
- [41] *Machine Learning Algorithms for semantic segmentation*. URL: <https://codeallogic.org/2018/05/30/machine-learning-algorithms-for-semantic-segmentation/>. (visitato il 27 Giugno 2019).
- [42] Ruifrok Arnout C. e Johnston Dennis A. «Quantification of histochemical staining by color deconvolution». In: *Anal Quant Cytol Histol* 23.4 (2001), pp. 291–299.

- [43] Macenko M. et al. «A method for normalizing histology slides for quantitative analysis». In: *inBiomedical Imaging: From Nano to Macro, 2009. ISBI'09. IEEE International Symposium on* (2009), pp. 107–1110.
- [44] Abhishek Vahadane et al. «Structure-Preserving Color Normalization and Sparse Stain Separation for Histological Images». In: *IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING* 35.8 (ago. 2016), pp. 107–1110.
- [45] Long Jonathan, Shelhamer Eva e Darrell Trevor. «“Fully Convolutional Networks for Semantic Segmentation»». In: *Proceedings of the IEEE* (2015).
- [46] R. Pascanu, T. Mikolov e Y. Bengio. «On the difficulty of training recurrent neural networks». In: *Proceedings of the 30th International Conference on Machine Learning* 28.3 (2013), pp. 1310–1318.
- [47] Tony F. Chan, B. Yezrielev Sandberg e Luminita A. Vese. «Active Contours without Edges for Vector-Valued Images». In: *Journal of Visual Communication and Image Representation* 11.2 (2000), pp. 130–141. ISSN: 1047-3203. DOI: <https://doi.org/10.1006/jvci.1999.0442>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104732039990442X>.