

## POLITECNICO DI TORINO

## FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Sviluppo di un algoritmo automatico per la caratterizzazione architetturale di immagini istologiche prostatiche

Relatori:

Prof. Filippo Molinari

Ing. Massimo Salvi

Candidato:

Roberto Orlando



Dicembre 2018

# Indice

	Som	mario		7					
1	Intr	oduzio	one	9					
	1.1	Anatomia della prostata							
		1.1.1	Struttura	11					
		1.1.2	Zone e lobi anatomici	11					
		1.1.3	Funzioni della prostata	13					
		1.1.4	Patologie della ghiandola prostatica	14					
	1.2	Analisi istologica							
		1.2.1	Tecniche istologiche	17					
		1.2.2	Principali colorazioni delle immagini istologiche	19					
		1.2.3	Artefatti nelle immagini istologiche	21					
		1.2.4	Score di Gleason	22					
<b>2</b>	Met	todi		<b>25</b>					
	2.1	Datas	et	26					
	2.2	Archit	ettura dell'algoritmo	28					
	2.3	Estraz	zione dei nuclei cellulari	30					
		2.3.1	Color Deconvolution di Macenko	31					
	2.4	Segme	entazione del lume prostatico	35					
		2.4.1	Filtro di Gabor	36					
		2.4.2	Contorno Attivo	39					
		2.4.3	Level Set e algoritmo di Chan-Vese	40					
	2.5	Indivi	duazione delle ghiandole prostatiche	45					
		2.5.1	Approccio euristico	45					

	2.6	Metriche di validazione						
	2.7	Rete N	Neurale Convoluzionale (CNN)	55				
		2.7.1	AlexNet e metodo del transfer learning	56				
	2.8	Metod	lo di estrazione delle immagini per addestramento rete CNN $\ldots$	58				
		2.8.1	Estrazione delle patch mirata sulle ghiandole	58				
3	Ris	ulati		62				
J	1015	ulati		02				
	3.1	Valida	zione numerica	63				
		3.1.1	Validazione sull'intero dataset	64				
		3.1.2	Validazione dataset sane	67				
		3.1.3	Validazione dataset tumorali	71				
	3.2 Validazione della Rete Neurale Convoluzionale							
4	Cor	clusio	ni e sviluppi futuri	79				
	4.1	Conclu	usioni	79				
		4.1.1	Sviluppi futuri	80				

# Elenco delle figure

1.1	Struttura anatomica della prostata $[1]$	10
1.2	Zone della prostata in diverse sezioni $[2]$	12
1.3	Differenza tra prostata sana ed ipertrofica $[3]$	14
1.4	Rappresentazione grafica degli stadi del tumore [4]	16
1.5	Tecniche istologiche per la preparazione del vetrino $[5]$	18
1.6	Immagine istologica prostatica con colorazione Ematos silina-Eosina $\ .$ .	20
1.7	Principali artefatti nelle immagini istologiche	21
1.8	Evoluzione del sistema di classificazione di Gleason $[6]$	22
1.9	Esempi di ghiandole benigne e tumorali	24
2.1	Panoramica dell'ambiente ImageScope	26
2.2	Informazioni sul formato svs	27
2.3	Flowchart complessivo dell'algoritmo	28
2.4	Relazione tra intensità e densità ottica [7]	31
2.5	Componenti in uscita dalla Color Deconvolution di Macenko in scala di	
	grigi	32
2.6	Componenti in uscita dalla Color Deconvolution di Macenko in RGB $$ .	33
2.7	Estrazione nuclei cellulari primo step	33
2.8	Estrazione nuclei cellulari finale	34
2.9	Flowchart per l'applicazione del filtro di Gabor	35
2.10	Superficie della funzione 2D di Gabor $[8]$	36
2.11	Segmentazione lume prostatico	37
2.12	Segmentazione lume prostatico dopo Gabor	38
2.13	Flowchart per l'applicazione del level set di Chan-Vese	41

2.14	Segmentazione lume prostatico dopo l'applicazione del level set di Chan-Vese	42
2.15	Segmentazione lume prostatico	43
2.16	Esempio di funzionamento del level set	44
2.17	Flowchart primo step di estrazione delle ghiandole	46
2.18	Primo step per l'estrazione delle ghiandole	47
2.19	Flowchart per l'estrazione finale delle ghiandole	48
2.20	Definizione dei contorni delle ghiandole	49
2.21	Estrazione finale delle ghiandole	50
2.22	Rappresentazione visiva del coefficiente F1 score (DSC) [9] $\ldots \ldots$	54
2.23	Differenza tra Rete Neurale e ConvNet [10]	55
2.24	Configurazione della Rete Neurale Convoluzionale Alex Net (2012) $\left[11\right]$ .	56
2.25	Metodi di transfer learning [12]	57
2.26	Flowchart per l'estrazione delle patch mirata sulle ghiandole $\ldots$	59
2.27	Estrazione delle patch mirata sulle ghiandole individuate	61
31	Confronto segmentazione manuale ed automatica (intero dataset)	63
3.2	Box plot per i quattro indici sull'intero dataset	65
3.3	Confronto segmentazione manuale ed automatica (dataset sane)	67
3.4	Andamento F1 score (dataset sane)	68
3.5	Andamento recall (dataset sane)	68
3.6	Andamento precision (dataset sane)	69
3.7	Andamento jaccard index (dataset sane)	69
3.8	Confronto segmentazione manuale ed automatica (dataset tumorali) .	71
3.9	Andamento medio F1 score (dataset tumorali)	72
3.10	Andamento medio recall (dataset tumorali)	72
3.11	Andamento medio precision (dataset tumorali)	73
3.12	Andamento medio jaccard index (dataset tumorali)	73
3.13	Esempi di patch estratte	75
3.14	Progressi dell'allenamento	76
3.15	Confusion Matrix sul test set	77
3 16	Validazione della rete su sei immagini del test set	78
5.10		.0

## Elenco delle tabelle

1.1	Stadi del tumore alla prostata	15
2.1	Esempio di <i>confusion matrix</i> 2 x 2	51
3.1	Media più deviazione standard dei quattro indici per l'intero dataset . $\ .$	66
3.2	Media più deviazione standard dei quattro indici per il dataset (ghiandole	
	sane)	70
3.3	Media più deviazione standard dei quattro indici per il dataset (tumorali)	74

## Sommario

Il cancro alla prostata è il tumore più diffuso nella popolazione occidentale di sesso maschile e rappresenta circa il 20% tra tutte le neoplasie diagnosticate. Il carcinoma prostatico raramente si presenta sotto i 40 anni, ma a partire dai 50 anni le probabilità di sviluppare un tumore aumentano considerevolmente, e circa due tumori su tre sono diagnosticati in età maggiore di 65 anni [13]. L'incidenza della patologia negli ultimi anni è in continua crescita. Quasi la totalità dei tumori diagnosticati ha origine nelle cellule presenti all'interno della ghiandola e vengono rappresentati dalla classe degli adenocarcinomi. L'esame migliore per valutare la presenza del tumore alla prostata è quello di effettuare una biopsia del tessuto prostatico. La diagnosi della biopsia è affidata all'esperto patologo e si basa su ispezioni visive al microscopio dei preparati istologici colorati con ematossilina-eosina. Tali ispezioni richiedono molto tempo e per questo risultano essere lunghe e soggettive. L'esperto patologo osservando il vetrino della biopsia attribuisce un punteggio al tumore secondo la scala di Gleason. L'attribuzione corretta dello score di Gleason e l'individuazione della patologia spesso risultano una criticità per il patologo. Nei test medici, non rivelare una malattia esistente può rappresentare un pericolo maggiore rispetto a diagnosticare una malattia che non esiste. Per questo motivo l'esperto patologo deve prestare molta attenzione nella diagnosi del carcinoma prostatico.

In questo lavoro di tesi viene presentato un sistema automatizzato per l'individuazione di ghiandole prostatiche in immagini istopatologiche. Tale sistema permette inoltre l'individuazione del tessuto tumorale tramite la classificazione di ogni ghiandola prostatica. L'algoritmo sviluppato consiste in: 1) Estrazione dei nuclei cellulari, 2) Segmentazione del lume prostatico, 3) Individuazione delle ghiandole combinando i risultati dei due punti precedenti (nuclei e lume), 4) Addestramento di una Rete Neurale Convoluzionale per la rivelazione del tumore nel tessuto analizzato. Per l'addestramento della rete è stato scelto di estrarre delle immagini mirate sulle regioni ghiandolari individuate dall'algoritmo.

L'algoritmo è stato testato su 150 immagini istologiche. La segmentazione automatica delle ghiandole, confrontata con quella di un operatore manuale, mostra dei risultati soddisfacenti con un  $F_1$  score medio del 92,75%. La Rete Neurale Convoluzionale, addestrata nelle zone ghiandolari, riesce ad identificare il tumore con una percentuale del 97,11%.

Il sistema implementato pone come obiettivo l'individuazione delle ghiandole prostatiche e la loro classificazione. Questo strumento può essere utile nella diagnosi del tumore alla prostata e può essere utilizzato dal medico come *second opinion* o come analisi preliminare per l'individuazione dei punti critici su cui concentrare l'attenzione. Il sistema può essere integrato, in futuro, anche nella classificazione dei diversi pattern tumorali, aumentando così le classi in uscita dalla rete.

Dunque, la possibilità di disporre di un sistema automatizzato per l'individuazione delle ghiandole prostatiche e la rivelazione del tumore in immagini istopatologiche, potrebbe essere utile al fine di ottimizzare il flusso di lavoro in patologia.

## Capitolo 1

## Introduzione

Nel primo capitolo vengono presentate le principali caratteristiche fisiologiche e anatomiche della prostata. In particolare si sofferma l'attenzione sulla struttura generale della ghiandola prostatica e sulla divisione clinica in macro zone e lobi. Segue una breve esposizione sulle principali funzionalità della prostata, esaminando le patologie collegate all'alterazione delle diverse funzioni organiche.

Vengono poi introdotte le analisi istologiche, descrivendo brevemente la procedura per ottenere il preparato istologico, e in seguito vengono descritte le principali colorazioni utilizzate per ottenere le immagini. Vengono inoltre esposti anche alcuni principali artefatti che possono avvenire durante la preparazioni dei vetrini.

Di seguito è presentato il sistema di classificazione di Gleason, usato in ambito medico per stabilire la gravità e l'aggressività del carcinoma prostatico, con un breve sommario sull'evoluzione del sistema a partire dagli anni 60'-70' fino ad oggi.

## 1.1 Anatomia della prostata

La prostata (letteralmente "colui che sta davanti", "guardiano" o "protettore" [14]) è un organo fibromuscolare e ghiandolare maschile presente nella maggior parte dei mammiferi. La ghiandola prostatica esocrina differisce considerevolmente tra le specie anatomicamente, chimicamente e fisiologicamente.

La prostata è definita come la più grande ghiandola sessuale maschile, le cui dimensioni e forma la rendono simile ad una noce. Approssimativamente una ghiandola adulta sana ha dimensioni 4 cm (trasversale) x 3 cm (verticale) x 2 cm (anteroposteriore) e pesa circa 20 grammi [15].

La prostata circonda la parte prossimale dell'uretra ed è collocata anteriormente al retto, al di sotto della vescica e al di sopra dei muscoli del pavimento pelvico (Fig.1.1). Essa contiene al suo interno elementi stromali e ghiandolari, racchiusi all'interno di una capsula [16].



Figura 1.1: Struttura anatomica della prostata [1]

#### 1.1.1 Struttura

La prostata, in un soggetto normale, possiede una forma piramidale con base in alto, apice in basso, una superficie anteriore, una posteriore e due infero laterali.

La base, collocata in alto, è appiattita ed in contatto con il collo della vescica, mentre l'apice è la parte situata tra la zona prostatica e la zona membranosa dell'uretra. L'uretra, dunque, perfora la prostata vicino alla metà della base ed esce sulla superficie anteriore sopra e di fronte la sua porzione apicale.

La superficie anteriore, collocata sotto l'arco pubico, è ricca di tessuto fibromuscolare ma povera in tessuto ghiandolare. Essa è ricoperta su entrambi i lati dalla fascia endopelvica, mentre la superficie infero laterale dalla fascia prostatica. Posteriormente troviamo la fascia rettale che riveste le zone laterali del retto. La superficie infero laterale è correlata al muscolo elevatore dell'ano e ai muscoli laterali delle pelvi, separati da una porzione di tessuto connettivo.

La superficie posteriore della prostata e le vescicole seminali sono separate dal retto da uno spessore piccolo di tessuto connettivo chiamato fascia di Denonvillier. Questa forma il piano chirurgico dell'incisione per il tumore rettale. I dotti eiaculatori trasversi sono sulla superficie posteriore e terminano adiacentemente al collicolo seminale, conosciuto anche come Veru Montanum [15].

#### 1.1.2 Zone e lobi anatomici

I lobi anatomici fondamentali sono quello anteriore, mediano e posteriore. Il lobo anteriore giace di fronte alla zona prostatica dell'uretra e continua con i lobi laterali sull'altro lato, quello mediano invece è situato dietro l'uretra e di fronte ai dotti eiaculatori e infine quello posteriore dietro il mediano e al di sotto dei dotti eiaculatori. La divisione della ghiandola prostatica in lobi anatomici non è l'unica esistente, infatti esiste un modo clinicamente molto utile e notevolmente semplificato per descrivere la morfologia. Tale metodo consiste nella divisione dell'organo in quattro zone prostatiche: zona centrale (CZ), zona transizionale (TZ), zona periferica (PZ), stroma fibromuscolare anteriore (AFMS) (Fig.1.2).



Figura 1.2: Zone della prostata in diverse sezioni [2]

La zona centrale (CZ), che richiama la forma di un cono, occupa circa il 25% del volume della ghiandola prostatica. La CZ comprende sia il lobo mediano che quello posteriore. Questa circonda i dotti eiaculatori e si estende fino al collo della vescica ed è adibita alla produzione della maggior parte degli enzimi proteolitici del liquido seminale.

La zona transizionale (TZ) invece occupa solo il 5% del volume totale della ghiandola ed è la zona che occupa parte dei lobi anteriori e mediani. La TZ circonda la parte distale dell'uretra preprostatica vicino l'apice della zona centrale e dei dotti eiaculatori. È il sito principale di due patologie approfondite nel par.1.1.4, ossia l'Ipertrofia Prostatica Benigna (IPB) e l'adenocarcinoma prostatico.

La zona periferica (PZ) costituisce il restante 70% della ghiandola prostatica e racchiude il lobo laterale e la restante parte del lobo posteriore. La PZ si estende distalmente per avvolgere la parte bassa dell'uretra prostatica al di sotto del Veru Montanum. È una zona in cui le patologie come carcinoma, prostatite cronica e atrofia post-infiammatoria sono molto comuni. Con l'età la CZ è sottoposta a cambiamenti atrofici mentre la TZ ad allargamenti, dovuti a IPB, che tendono a comprimere la PZ. Infine l'ultima zona è lo Stroma Fibromuscolare Anteriore (AFMS) che costituisce meno del 1% del volume totale. Questo riempie lo spazio dalla PZ anteriore fino all'uretra preprostatica e incorpora la maggior parte del lobo anteriore. La AFMS è prevalentemente fibromuscolare con strutture ghiandolari scarse o addirittura assenti [15].

#### 1.1.3 Funzioni della prostata

Le tre principali funzioni fisiologiche della ghiandola prostatica sono:

- *Escretoria*: la prostata secerne un fluido alcalino costituito da 20-30% del volume di fluido seminale. Infatti è considerata un organo sessuale secondario poiché secerne il liquido prostatico che si mescolerà poi con lo sperma durante l'eiaculazione, in modo da dare i nutrienti necessari al mantenimento della vitalità degli spermatozoi. Chiaramente un'alterazione di questa funzionalità può provocare seri problemi negli spermatozoi, compromettendo la loro vitalità e dunque la fertilità maschile [17];
- *Eiaculatoria*: consente di avere una corretta funzione erettile grazie all'azione dei vasi sanguigni e fasci nervosi che ne permettono la contrazione o il rilassamento [17];
- Urinaria: grazie all'azione congiunta di due valvole muscolari (sfinteri) che circondano l'uretra, consente di controllare il flusso urinario. Infatti le due valvole possono contrarsi o rilassarsi intorno all'uretra, arrestando o consentendo il flusso urinario. Di conseguenza un malfunzionamento può provocare incontinenza urinaria determinando seri problemi nella qualità di vita del soggetto [17].

#### 1.1.4 Patologie della ghiandola prostatica

Esistono diverse patologie o alterazioni a carico della prostata. Alcune di queste si presentano generalmente con l'avanzare dell'età, a partire dai 30 anni circa. Infatti con gli anni la prostata può subire delle modifiche nel volume e nella consistenza, portando ad un indurimento e ingrossamento dell'organo (Fig.1.3). Tali alterazioni vanno sotto il nome di Ipertrofia Prostatica Benigna (IPB), ossia un ingrandimento non maligno della ghiandola prostatica che avviene nella zona transizionale della prostata, riferita ad un'iperplasia epiteliale stromale o ghiandolare [18].



Figura 1.3: Differenza tra prostata sana ed ipertrofica [3]

Una patologia molto comune invece in età giovanile è la prostatite, ovvero un processo infiammatorio. Essa può presentarsi in forma acuta o cronica ed interessa non solo la prostata ma anche i tessuti circostanti ad essa. I fattori principali che causano la prostatite sono sicuramente di origine infettiva (germi comuni) o comportamentale (fattori di rischio come fumo, alcool, stress, alimentazione non adeguata o vita sedentaria). Inoltre la prostatite può essere batterica, con presenza di batteri nello sperma, o non batterica [19].

Infine, la patologia più grave è il tumore maligno della prostata. È rappresentato quasi nella totalità dalla classe degli adenocarcinomi prostatici e nasce in seguito ad una crescita incontrollata e autonoma di cellule anomale che portano alla formazione di neoplasie maligne [18]. Per stabilire la dimensione, localizzazione ed estensione di un tumore alla prostata attualmente viene utilizzata la stadiazione. La stadiazione è un metodo utile per stabilire la possibile presenza di metastasi diffusa ad altre strutture anatomiche. Si basa, come per diverse tipologie di tumore, sul sistema TNM. La lettera T indica l'estensione del carcinoma, N la possibilità di interesse dei linfonodi ed M la presenza di metastasi. Per quanto riguarda gli stadi T del tumore sono suddivisi in quattro categorie e vengono di seguito elencati in tabella 1.1:

Stadio	Caratteristiche	Diagnosi			
tumore	tumore				
		Non è facilmente identificabile e visualizzabile in ecografia o in esplorazione rettale. Si può diagnosticare			
<b>T</b> 1	Il tumore è circoscritto				
11	alla prostata.	tramite resezione transuretrale oppure			
		biopsia effettuata in seguito ad elevati			
		valori di PSA.			
Т9	Il tumore è circoscritto	A differenza di quello T1 è visibile			
12	alla prostata.	sia in ecografia sia in esplorazione rettale.			
	Il tumore è diffuso e	Visibile sia in ecografia sia in			
T3	non più circoscritto				
	alla prostata.	esplorazione rettale.			
	Il tumore ha invaso				
$T_{4}$	anche parte dei	Visibile sia in ecografia sia in			
тт	tessuti adiacenti	esplorazione rettale.			
	alla prostata.				

Tabella 1.1: Stadi del tumore alla prostata

I tumori di grado T1 (Fig.1.4a) e T2 (Fig.1.4b) si definiscono localizzati perché circoscritti alla prostata, quelli di grado T3 (Fig.1.4c) si definiscono localmente avanzati perché hanno invaso parte dei tessuti circostanti, invece quelli di grado T4 (Fig.1.4d) si definiscono metastatici oppure avanzati perché hanno invaso organi adiacenti alla prostata, tessuto osseo oppure linfonodi.



Figura 1.4: Rappresentazione grafica degli stadi del tumore [4]. (a) stadio T1 (b) stadio T2 (c) stadio T3 (d) stadio T4

### 1.2 Analisi istologica

"L'istologia è la disciplina scientifica che studia i tessuti vegetali e animali. È un'importante branca della biologia e della medicina, dove riveste un ruolo importante nell'anatomia patologica e nella descrizione dei fenomeni morbosi, essenziale anche per le analisi pre e post operatorie in ambito medico e chirurgico [20]."

L'istologia studia l'architettura, la composizione e la morfologia di tessuti e cellule. In particolar modo l'istopatologia è lo studio dei segni della malattia attraverso un esame microscopico, prelevando dei campioni chirurgici o biopsie e fissandoli su dei vetrini. In citologia e istologia è essenziale dunque ottenere un preparato istologico, ossia una porzione di tessuto dallo spessore di pochi  $\mu$ m. Infatti, i tessuti freschi, così come vengono prelevati, non posso essere utilizzati perché non consentono di ottenere sezioni sottili da osservare al microscopio ottico. Il preparato istologico finale invece consente di mantenere le caratteristiche fisiologiche e strutturali delle componenti, arrestando però le funzioni biologiche [21].

#### 1.2.1 Tecniche istologiche

La preparazione del preparato istologico è un iter complesso e lungo. Sebbene esistono una notevole quantità di passaggi (Fig.1.5), è possibile riassumere le operazioni in:

- Prelievo
- Fissazione
- Inclusione
- Colorazione

Questi tessuti o biopsie, prelevati a fresco, devono essere rapidamente trattati nella fase di fissazione con procedimenti chimici e fisici, per disattivare gli enzimi autolitici, consentendo di stabilizzare e preservare i tessuti. Le miscele chimiche utilizzate sono chiamate fissativi e consentono al tessuto di avere la giusta consistenza per la successiva fase di inclusione. Un errore nella fase di fissazione può compromettere la buona riuscita del preparato. Il fissativo più utilizzato è la formalina, una soluzione di formaldeide acquosa.

La fase di inclusione è la procedura che consente di tagliare il tessuto in strisce sottili (spessore di circa 2-5  $\mu$ m). Lo spessore sottile è una condizione necessaria per consentire al campione di essere attraversato facilmente dalla luce. In questa fase, la paraffina conferisce durezza e compattezza al tessuto, consentendone il sezionamento. La paraffina, utilizzata per la preparazione dei blocchetti di materiale incluso, è una miscela di idrocarburi saturi ad elevato peso molecolare, non idrosolubili. Il sezionamento del tessuto viene effettuato con un'apparecchiatura che prende il nome di microtomo a rotazione.

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]. Attraverso queste quattro operazioni, intervallate da alcune secondarie (Fig.1.5), è possibile ottenere il preparato istologico.



Figura 1.5: Tecniche istologiche per la preparazione del vetrino [5]

#### 1.2.2 Principali colorazioni delle immagini istologiche

La colorazione dei preparati istologici è una delle quattro fasi che deve subire il campione prima di ottenere il composto finale e le relative immagini da visualizzare ed analizzare al microscopio ottico. La fase di colorazione è probabilmente la procedura più importante per ottenere delle immagini chiare e poter distinguere e risaltare i singoli componenti strutturali del tessuto in esame. La fase di colorazione assume notevole importanza, in quanto in mancanza di essa non è possibile in alcun modo visualizzare ed analizzare le strutture dei tessuti biologici, a causa del basso contrasto tipico di questi [22].

Esistono attualmente una varietà di tecniche di colorazione utilizzate sia in campo patologico sia in quello istologico:

- Ematossilina Eosina (E-E)
- Tricromica di Mallory
- Tricromica di Heidenhain (Mallory-Azan)
- Ignesti
- Ematossilina Ferrica (Ematossilina di Heidenhain)
- Tricromica di Masson

Tra le tecniche di colorazione esposte precedentemente, l'Ematossilina ed eosina (dall'inglese *Hematoxylin and Eosin, H&E*), può essere definito il gold standard per le immagini istopatologiche da oltre cent'anni [23].

Essa è una colorazione bicromica e sequenziale che sfrutta un colorante basico ed uno acido. L'ematossilina è il componente basico e tende a legarsi a strutture acide come nuclei, conferendo loro un colore blu violaceo. Erroneamente si considera l'ematossilina un colorante, ma in realtà le proprietà tintoriali dell'ematossilina non sono intrinseche ma dovute a particolari reazioni chimiche che provocano l'ossidazione in emateina una volta avvenuto il legame. Insieme all'ematossilina viene utilizzata l'eosina, componente acido che tende a legare con le strutture basiche come citoplasma e vari tessuti (connettivo



ad esempio) conferendo loro un caratterístico colore rosa [23] (Fig.1.6).

Figura 1.6: Immagine istologica prostatica con colorazione Ematossilina-Eosina

### 1.2.3 Artefatti nelle immagini istologiche

La produzione delle immagini istologiche richiede molti passaggi e notevole maestria. Poiché l'iter risulta essere complicato, la percentuale di errore cresce ad ogni step. Gli errori possono portare alla presenza di artefatti all'interno dell'immagine. Questi sono spesso una fonte di errore nell'elaborazione delle immagini mediche e per questo viene richiesta molta cura al medico nella preparazione ed estrazione delle immagini. Esistono una varietà di artefatti ma fra i più importanti e ricorrenti si citano:

- *Inclusioni*: piccoli elementi come fibre, peli o polveri possono aggiungersi al preparato ed essere visibili e catturati dal microscopio [24] (Fig.1.7a);
- *Pieghe*: rappresentano delle strisce di color biancastro lungo tutta la fetta della prostata. Queste costituiscono delle pieghe nelle immagini, avvenute nella fase di taglio, dovute principalmente al ripiegamento su stesso del tessuto (Fig.1.7b). Questo può accadere quando viene portato il preparato istologico a temperature inferiori a 38-40°C, le quali non consentono una corretta distensione del tessuto [24];
- Bolle: si possono formare delle bolle d'aria tra i due vetrini [24] (Fig.1.7c).



Figura 1.7: Principali artefatti nelle immagini istologiche. (a) inclusioni di piccoli elementi (b) pieghe (c) bolle di aria

#### 1.2.4 Score di Gleason

Ottenuto il preparato istologico, come descritto nel par.1.2.1, l'esperto patologo, osservando il vetrino a diversi ingrandimenti (in genere da 4x fino a 40x), attribuisce un punteggio in base all'aggressività del tumore. Il punteggio assegnato è definito Score di Gleason e rappresenta il sistema più utilizzato dai patologi per stabilire il grado di malignità del tumore alla prostata [25].

Il sistema di Gleason originale si basa sull'analisi dei modelli architettonici del carcinoma prostatico, piuttosto che sulle caratteristiche cellulari. Il punteggio viene assegnato come somma dei due pattern più presenti all'interno del campione in analisi. Nei casi in cui esiste un solo pattern viene assegnato lo stesso valore sia al pattern primario che a quello secondario e i valori dei singoli pattern vengono classificati su una scala di 5 punti. I pattern 1,2 e 3 rappresentano ghiandole molto simili a quelle sane, mentre i pattern 4 e 5 tumori con un'architettura ghiandolare anomala [26](Fig.1.8a). Nel sistema di classificazione originale di Gleason la somma del punteggio dei due pattern può assumere valori compresi tra 2 e 10. Per valori compresi tra 2 e 6 il tumore è generalmente a crescita lenta con scarsa capacità di diffusione a distanza, 7 rappresenta un tipo di carcinoma di grado intermedio, invece per valori compresi tra 8 e 10 il tumore risulta più aggressivo.



Figura 1.8: Evoluzione del sistema di classificazione di Gleason [6]. (a) sistema originale (b) sistema modificato 2005 (c) modifiche al sistema del 2005

Nella conferenza del 2005, organizzata dalla Società Internazionale di Patologia Urologica (ISUP) sono state introdotte alcune modifiche al sistema originale, migliorando la suddivisione delle ghiandole tumorali nei vari pattern. È stato definito così il sistema di classificazione di Gleason del 2005 (Fig.1.8b), successivamente soggetto ad ulteriori modifiche (Fig.1.8c).

In seguito all'ultimo convengo condotto dalla ISUP nel 2014 è stato definito un nuovo sistema di classificazione a cinque gradi, chiamato Grade Group (GG), accettato dalla OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) nel 2016. Questo sistema è stato sviluppato per fornire una classificazione più semplificata e immediata rispetto al sistema di Gleason originale. Attualmente, nella fase di transizione tra un sistema e l'altro, nei referti medici si possono trovare entrambe le classificazioni. Il nuovo sistema suddivide il cancro alla prostata in cinque gradi. Nel seguito viene indicato a quale grado del nuovo sistema di classificazione vengono assegnate le varie combinazioni di pattern principale e secondario del sistema originale:

- Gruppo Grado 1 (Gleason Score  $\leq 6$ ): pattern principale e secondario costituiti da singole ghiandole discrete ben formate (3+3).
- Gruppo Grado 2 (Gleason Score = 7): il pattern principale è rappresentato da ghiandole ben formate, mentre il secondario da ghiandole scarsamente formate/fuse/cribriformi (3+4) (Fig.1.9b esempio di GG 2 (3+4));
- Gruppo Grado 3 (Gleason Score = 7): il pattern principale è costituito da ghiandole scarsamente formate/fuse/cribriformi, mentre quello secondario da ghiandole ben formate (4+3).
- Gruppo Grado 4 (Gleason Score = 8): pattern principale e secondario costituiti da ghiandole scarsamente formate/fuse/cribriformi (4+4) (Fig.1.9c esempio di GG 4 (4+4)); pattern principale costituito da ghiandole ben formate e quello secondario da componenti prive di ghiandole (3+5); pattern principale costituito da componenti prive di ghiandole e quello secondario da ghiandole ben formate (5+3).

Gruppo Grado 5 (Gleason Score = 9-10): il pattern principale e secondario sono caratterizzati dall'assenza di formazione di ghiandole (oppure è presente necrosi 5+5); pattern principale costituito dall'assenza di formazione di ghiandole e quello secondario costituito da ghiandole scarsamente formate/fuse/cribriformi (5+4) o viceversa (4+5) [27] (Fig.1.9d esempio di GG 5 (5+5)).



Figura 1.9: Esempi di ghiandole benigne e tumorali. (a) Benigne (b) GG 2 (3+4) (c) GG 4  $(4\!+\!4)$  (d) GG 5 (5+5)

## Capitolo 2

## Metodi

I metodi applicati ad un'immagine si rivelano essenziali e necessari per l'estrazione delle caratteristiche più importanti e maggiormente significative.

Elaborazione di immagini significa dare in input un'immagine, elaborarla con qualche metodo, e ottenere in output un'immagine o delle caratteristiche di essa.

Nel seguente capitolo viene descritto il dataset utilizzato per il test e la validazione dell'algoritmo sviluppato, i macroblocchi di cui è costituito quest'ultimo, analizzando in dettaglio l'estrazione dei nuclei cellulari, la segmentazione del lume prostatico e l'individuazione delle ghiandole combinando i due risultati precedenti (lume e nuclei). Estratte le caratteristiche delle immagini istologiche prostatiche, segue una fase di validazione per quantificare la corretta individuazione delle ghiandole tramite opportune metriche quantitative esposte in questo capitolo.

### 2.1 Dataset

I dati elaborati sono stati ricavati da pazienti ricoverati presso l'ospedale di Alba nell'anno 2017 ed affetti da carcinoma prostatico. Tutti i pazienti hanno accettato e firmato un consenso a fornire le immagini istologiche per scopi didattici. Sono state fornite le immagini delle singole fette prostatiche, oggetto di elaborazione per il progetto di tesi.

I campioni sono stati colorati con ematossilina ed eosina e digitalizzati tramite Aperio Scanscope XT. Il file contenente l'immagine della singola fetta prostatica è in formato svs. Tale codifica rappresenta lo standard di molti microscopi digitali, tra i più importanti ritroviamo Aperio ScanScope XT Slide Scanner [28].

I file in formato svs possono essere visualizzati e manipolati utilizzando un software gratuito chiamato ImageScope (Fig.2.1).



Figura 2.1: Panoramica dell'ambiente ImageScope

Un esperto patologo ha identificato ed evidenziato, attraverso una codifica colore, le zone tumorali presenti, assegnando loro un punteggio nella scala di Gleason. Nella sezione *Annotations* di ImageScope è possibile poi risalire al significato della codifica colore imposta dal medico. Il medico, per tracciare ed identificare le zone affette da carcinoma, ha diversi ingrandimenti a disposizione, partendo da una visione meno dettagliata (1x) fino alla massima risoluzione consentita (20x). All'apertura del file in ambiente MATLAB<sup>©</sup> 2017b è possibile osservare come il file svs compatta al suo interno diverse risoluzioni della fetta stessa su cui poter lavorare (Fig.2.2). La risoluzione che è stata scelta per il progetto di tesi è quella massima consentita.

📑 Format	HormatVersion	H Width	Η Height	Η BitDepth	🚹 ColorType	FormatSignature	둼 ByteOrder	HewSubFileType	🗗 BitsPerSample	Compression
'tif'	[	65736	55422	24	'truecolor'	[73 73 42 0]	'little-endian'	0	[8 8 8]	'JPEG'
'tif'	[	910	768	24	'truecolor'	[73 73 42 0]	'little-endian'	0	[8 8 8]	'JPEG'
'tif'	[	16434	13855	24	'truecolor'	[73 73 42 0]	'little-endian'	0	[8 8 8]	'JPEG'
'tif'	[	4108	3463	24	'truecolor'	[73 73 42 0]	'little-endian'	0	[8 8 8]	'JPEG'
'tif'	[	2054	1731	24	'truecolor'	[73 73 42 0]	'little-endian'	0	[8 8 8]	'JPEG'
'tif'	[	281	. 1147	24	'truecolor'	[73 73 42 0]	'little-endian'	1	[8 8 8]	'LZW'
'tif'	[	1600	1025	24	'truecolor'	[73 73 42 0]	'little-endian'	9	[8 8 8]	'JPEG'

Figura 2.2: Informazioni sul formato svs

Sono state processate ed elaborate scansioni della prostata di 5 pazienti, chiamati per privacy P1, P2, P3, P4 e P5.

Dal momento in cui una fetta prostatica, alla risoluzione scelta, risulta ingombrante da elaborare, ma volendo allo stesso tempo non perdere di risoluzione e mantenere quella massima consentita, si è scelto di dividere l'immagine in una sorta di scacchiera 20x20. Vengono così ottenute da una singola fetta prostatica 400 immagini da poter elaborare. In genere, seppur variando, le dimensioni di una singola immagine estratta mediamente non risultano mai inferiori a 2500x2500x3. Da questo dataset complessivo sono state scelte 150 immagini che contenessero al loro interno zone ghiandolari sane e malate, al fine di avere un dataset comunque soddisfacente, seppur meno ampio rispetto alla totalità delle immagini a disposizione. È stata posta attenzione nella scelta del dataset per diverse ragioni: la prima sicuramente è la mancanza di informazioni di alcune immagini in quanto rappresentano sfondo oppure immagini con totale assenza di ghiandole, dunque non utili e poco informative per il progetto; la seconda è l'importanza di avere un dataset misto e con una buona proporzione tra ghiandole sane e tumorali; infine in ultimo, il voler analizzare una variabilità di casi in termini di colorazione e differenze architetturali ghiandolari, tra pazienti oppure tra fette prostatiche del medesimo paziente.

## 2.2 Architettura dell'algoritmo

All'interno di questo paragrafo viene spiegata l'architettura generale dell'algoritmo, suddividendo le operazioni principali in macroblocchi (Fig.2.3). Nel seguito del capitolo vengono esplicitati i metodi utilizzati per la realizzazione dell'algoritmo sviluppato in questo lavoro di tesi.



Figura 2.3: Flowchart complessivo dell'algoritmo

Nel flowchart di sinistra in Fig.2.3 vengono esposte le operazioni effettuate, mentre nel flowchart di destra viene raffigurata un'immagine indicativa per ogni step implementato. Presa in input ogni singola immagine del dataset, l'algoritmo inizialmente effettua l'estrazione dei nuclei cellulari, applicando la Color Deconvolution di Macenko.

Successivamente la stessa immagine di input viene processata per la segmentazione e l'individuazione del lume prostatico, applicando prima un filtraggio di Gabor. Visti alcuni limiti nella sola applicazione del filtro, è stato scelto di applicare conseguentemente un metodo di Contorno Attivo (dall'inglese "Active Contour") per cercare di ottenere una segmentazione del lume prostatico più precisa nei contorni.

Il lume prostatico e i nuclei cellulari sono la base di partenza per l'individuazione delle ghiandole prostatiche. Si è implementato per tale obiettivo un approccio euristico, che sminuisse il carico complessivo del codice e allo stesso tempo fornisse buoni risultati dal punto di vista computazionale.

Ai risultati qualitativi sono stati associati i risultati quantitativi dell'estrazione e individuazione delle ghiandole prostatiche. Per questo motivo viene effettuata una validazione della segmentazione delle ghiandole sane e malate tramite una serie di metriche, utili a stabilire la qualità e l'affidabilità del metodo di estrazione ghiandolare. Individuata l'architettura prostatica, lo step successivo è stato quello di estrarre delle patch, ossia immagini di dimensioni ridotte, dall'immagine originale. Queste patch sono state estratte mirate sulle ghiandole prostatiche individuate. Le immagini estratte hanno consentito l'addestramento di una Rete Neurale Convoluzionale per rivelare la presenza di tumore nel tessuto analizzato.

### 2.3 Estrazione dei nuclei cellulari

In molti campi biologici, i campioni di tessuto vengono prelevati da un soggetto per le analisi. Un modo comune per analizzare il campione di tessuto è trattarlo con colorazioni che hanno affinità selettive per diverse sostanze biologiche. La maggior parte delle colorazioni assorbono la luce, quindi i vetrini colorati vengono visualizzati utilizzando un microscopio con una luce che illumina il campione dal basso [29]. Se non è presente alcuna colorazione, tutta la luce passerà attraverso il vetrino, apparendo bianco brillante. Le aree in cui il colorante ha aderito ad una sostanza nel tessuto assorbiranno parte della luce. La proporzione di ciascuna lunghezza d'onda assorbita forma il vettore colorazione [30].

La quantità totale di luce assorbita varia anche tra i vetrini preparati in modo diverso. I due fattori più importanti che influiscono sull'intensità della colorazione in un'immagine sono le quantità relative di colorante aggiunto nel trattamento originale e la successiva conservazione e manipolazione del vetrino, poiché le colorazioni possono sbiadire se esposte per troppo tempo alla luce [24]. Nel metodo più diffuso per la diagnosi medica, ossia l'ematossilina - eosina, la prima colora selettivamente i nuclei mentre la seconda colora il citoplasma e lo stroma [23].

La legge di Lambert-Beer mette in relazione la quantità di luce assorbita alle proprietà del materiale attraverso il quale viaggia la luce. Sia  $I \in \mathbb{R}^{m \cdot n}$  la matrice di intensità RGB, dove m = 3 per i tre canali RGB e n = numero dei pixel,  $I_0$  rappresenta l'intensità della luce incidente che entra all'interno del campione. Sia  $W \in \mathbb{R}^{m \cdot r}$  la matrice dei vettori di colorazione, le cui colonne rappresentano la base del colore di ciascuna colorazione ed r il numero di colorazioni ed  $H \in \mathbb{R}^{r \cdot n}$  è la matrice di concentrazione di ogni colorante [31]. I può essere scritta come:

$$I = I_0 exp(-WH) \tag{2.1}$$

È possibile definire la Densità Ottica (V) come segue:

$$V = \log \frac{I_0}{I} \tag{2.2}$$

Ed ottenere dunque:

$$V = WH \tag{2.3}$$

Data la matrice V l'obiettivo è quello di trovare la matrice dei vettori di colorazione W e la matrice di colorazione di ogni colorante H [31].

In sintesi, secondo la legge di Lambert-Beer, la densità ottica alla lunghezza d'onda specifica del colorante è proporzionale alla concentrazione del colorante [30].

I contributi relativi di ciascuno dei coloranti devono essere separati, quindi il primo stadio dell'elaborazione delle immagini istologiche prostatiche riguarda l'estrazione di un contributo per ciascun colorante utilizzato. Per questo approccio viene utilizzata la Color Deconvolution di Macenko.

#### 2.3.1 Color Deconvolution di Macenko

La Color Deconvolution di Macenko è uno strumento che si basa sul calcolo dei vettori di colorazione corrispondenti all'intensità della singola colorazione in un'immagine. L'immagine totale in RGB viene convertita in densità ottica (OD), tramite l'eq.2.2. Lavorando nello spazio OD si possono calcolare le concentrazioni dei coloranti all'interno dell'immagine. Con tale trasformazione si ottiene una combinazione lineare di valori di densità ottica. La relazione tra intensità e densità ottica è dimostrata dalla Fig.2.4.



Figura 2.4: Relazione tra intensità e densità ottica [7]

I pixel di intensità blu e rosa sembrano essere separabili nello spazio RGB ma in modo curvo (Fig.2.4a). Mentre gli stessi pixel, trasformati nello spazio OD, sono separabili tramite una linea retta che parte dall'origine (Fig.2.4b) [7]. Per avere una maggiore robustezza e stabilità nel metodo, i pixel con densità ottica bassa sono sottoposti a soglie. Come valore di soglia viene imposto una fattore  $\beta$  pari a 0.15, ricavato empiricamente [7]. In questo modo vengono rimossi tutti gli elementi aventi soglia di intensità inferiore a tale valore.

La Color Deconvolution utilizza una SVD (Decomposizione ai valori singolari) dei pixel, ossia una particolare fattorizzazione di una matrice molto utile in applicazione di image processing. Il primo passo è calcolare il piano che formano i vettori. Questo viene fatto formando un piano dai due vettori corrispondenti ai due maggiori valori singolari della decomposizione SVD. Quindi, tutti i pixel trasformati nello spazio OD vengono proiettati su quel piano e normalizzati alla lunghezza unitaria. Si determinano i 2 valori estremi come il  $\alpha^{th}$  e  $(100 - \alpha)^{th}$  percentili dell'angolo (angolo di ogni punto rispetto alla prima direzione SVD). Empiricamente,  $\alpha = 1$  fornisce risultati robusti [7]. I vettori di colorazione vengono quindi calcolati convertendo questi valori estremi nello spazio OD. La matrice contiene come prima riga i valori RGB del colorante ematossilina mentre la seconda riga contiene i valori RGB del colorante eosina. Nota la matrice dei vettori di colorazione è possibile ricavare la matrice delle concentrazioni di ogni colorante (Fig.2.5 e Fig.2.6).



Figura 2.5: Componenti in uscita dalla Color Deconvolution di Macenko in scala di grigi. (a) nuclei (b) stroma



Figura 2.6: Componenti in uscita dalla Color Deconvolution di Macenko in RGB. (a) nuclei (b) stroma

La Fig.2.7a mostra l'immagine originale presa come riferimento. In Fig.2.7b viene mostrata la stessa immagine di riferimento con la sovrapposizione dei nuclei in uscita dalla Color Deconvolution di Macenko.



Figura 2.7: Estrazione nuclei cellulari primo step. (a) immagine originale (b) in verde nuclei cellulari

Alla maschera dei nuclei di Fig.2.7b viene prima effettuato un *thresholding* e successivamente vengono eliminate le strutture sotto un certo valore di area imposto pari a 5 pixel. La Fig.2.8a mostra la componente dei nuclei in uscita dalla Color

Deconvolution di Macenko, mentre in Fig.2.8b si può osservare l'estrazione dei nuclei cellulari definitiva dopo l'applicazione degli operatori morfologici descritti precedentemente.

Figura 2.8: Estrazione nuclei cellulari finale. (a) in verde componente dei nuclei in uscita dalla Color Deconvolution di Macenko (b) in verde componente dei nuclei dopo l'applicazione degli operatori morfologici

Tramite queste operazioni vengono eliminate le strutture molto piccole, scarsamente definite, che non posso rappresentare un nucleo all'interno dell'immagine istologica. In Fig.2.8b non è chiaramente visibile l'operazione di pulizia effettuata per via della risoluzione dell'immagine e per la dimensione eccessivamente piccola della componente eliminata.

### 2.4 Segmentazione del lume prostatico

Processata l'immagine in RGB e ottenuta l'estrazione dei nuclei cellulari, successivamente è stata effettuata la segmentazione del lume prostatico.

L'applicazione di un semplice *thresholding* è inefficiente per la segmentazione del lume all'interno delle ghiandole prostatiche. Il lume prostatico presenta intensità e uniformità diverse a seconda della loro dimensione, forma e dalla possibile presenza di artefatti nell'immagine. Inoltre, all'interno del lume ghiandolare delle volte sono presenti piccole masse di color rosa associabili ai corpi amilacei, corpi sferici calcificati, che non permettono una corretta segmentazione del lume prostatico.

Come primo step è stato scelto di applicare un filtro di Gabor per l'individuazione e la segmentazione del lume prostatico. Conseguentemente al filtro sono stati applicati degli operatori morfologici per ripulire la maschera.

Nel flowchart in Fig.2.9 vengono spiegate in dettaglio le operazioni effettuate per l'applicazione del filtro di Gabor.



Figura 2.9: Flowchart per l'applicazione del filtro di Gabor
#### 2.4.1 Filtro di Gabor

Per la segmentazione del lume prostatico, come primo step, è stato scelto di applicare un filtro di Gabor. Il filtro di Gabor generalmente è un filtro lineare e passa-banda, utilizzato nell'*image processing* per l'estrazione di *features* o l'analisi di tessitura. I filtri di Gabor consentono di rivelare bordi di varie forme e dimensioni, molto spesso irregolari, come possono essere quelli del lume [8]. Quindi una fase di preprocessing, tramite l'applicazione del filtro di Gabor, è utile per la caratterizzazione e la segmentazione del lume prostatico in immagini istologiche.

Sono stati applicati una serie di kernel di Gabor all'immagine originale in scala di grigi. I vari kernel sono definiti dalla relazione:

$$g(x, y, \lambda, \Theta, \psi, \sigma, \gamma) = exp(-\frac{x^{\prime 2} + \gamma^2 y^{\prime 2}}{2\sigma^2})cos(\frac{2\pi x^{\prime}}{\lambda} + \psi)$$
(2.4)

dove x' = x·cos( $\Theta$ ) + y·sin( $\Theta$ ), y' = -x·sin( $\Theta$ ) + y·cos( $\Theta$ ),  $\lambda$  è la lunghezza d'onda del fattore coseno del filtro di Gabor ed è rappresentata da numeri reali pari o superiori a 2,  $\Theta$  è l'orientazione del filtro e il suo valore, compreso tra 0° e 360°, è calcolato in gradi,  $\psi$  è la fase del fattore coseno della funzione di Gabor, misurata anch'essa in gradi con numeri reali tra -180° e +180°,  $\sigma$  è la deviazione standard dell'inviluppo gaussiano e  $\gamma$  rappresenta l'ellitticità del supporto della funzione di Gabor, dove per  $\gamma$  pari a 1 il supporto è circolare mentre per valori minori di 1 risulta allungato [8].



Figura 2.10: Superficie della funzione 2D di Gabor [8]

Per il progetto di tesi è stato imposto un valore di  $\sigma = 1$ ,  $\gamma = 1$ ,  $\psi = 0$ ,  $\lambda = 10$  e sono state considerate otto direzioni di  $\Theta$  per ridurre i tempi computazionali. Le otto immagini sono state filtrate, sommate e infine normalizzate. È stata imposta una soglia di *thresholding* pari al 90% dell'immagine massima.

In Fig.2.11a viene presa come riferimento la stessa immagine utilizzata per l'individuazione della componente nucleica. In Fig.2.11b si può vedere in giallo la segmentazione del lume prostatico dopo l'applicazione del solo filtro di Gabor.



Figura 2.11: Segmentazione lume prostatico. (a) immagine originale (b) in giallo lume dopo filtro di Gabor

La Fig.2.11b evidenzia ancora delle limitazioni nella sola applicazione del filtro. Per questo motivo all'immagine in output dal filtro di Gabor vengono effettuate delle operazioni di pulizia della maschera per conferire maggior omogeneità alla segmentazione del lume prostatico. Vengono eliminate le piccole componenti inferiori ad una soglia imposta pari a 500 pixel, riempiti i buchi all'interno dell'immagine e successivamente viene effettuata un'operazione di chiusura (dilatazione seguita da erosione con lo stesso elemento strutturale) per chiudere eventuali buchi interni rimasti all'interno della maschera.



Figura 2.12: Segmentazione lume prostatico dopo Gabor. (a) lume in giallo dopo l'uscita del filtro di Gabor (b) lume in giallo dopo l'applicazione degli operatori morfologici

In Fig.2.12b viene evidenziato come con la sola applicazione del filtro di Gabor non si riesce ad ottenere una precisa segmentazione del lume prostatico. La figura è stata scelta per evidenziare qualitativamente come il filtraggio di Gabor e la conseguente operazione di pulizia, riescano ad individuare buona parte del lume con un'ottima percentuale di correttezza. Tuttavia, esistono dei limiti che con il semplice filtraggio non vengono superati. Il filtro di Gabor risulta essere efficace nel momento in cui il lume è ben definito e uniforme nella colorazione. Spesso nelle immagini istologiche prostatiche, all'interno di una ghiandola, il lume non presenta una colorazione uniforme biancastra, ma può contenere disomogeneità rappresentate da pixel di color rosa all'interno del bianco, oppure può contenere un lume costituito completamente o in buona parte da una componente rosa/violaceo.

Questo giustifica l'utilizzo di un altro metodo per la corretta segmentazione dei contorni del lume prostatico. Per superare queste limitazioni la scelta è ricaduta sull'applicazione di un metodo di contorno attivo (dall'inglese "Active Contour"), descritto nel par.2.4.2, come secondo step dopo il filtraggio di Gabor. La scelta del level set può portare dei peggioramenti nei tempi computazionali, ma allo stesso tempo migliora le prestazioni per la segmentazione del lume e la successiva individuazione delle ghiandole prostatiche.

### 2.4.2 Contorno Attivo

Il contorno attivo, chiamato comunemente anche contorno deformabile, sono delle approssimazioni planari della teoria N-dimensionale dei modelli. L'obiettivo di questo metodo è comunicare all'algoritmo l'esistenza di una forma che può essere ricercata all'interno dell'immagine, in quello che può essere definito un processo di adattamento, ossia un processo in cui l'algoritmo deve essere iterativo [32].

Quindi il contorno attivo è un algoritmo che parte da una condizione iniziale ed evolve alla ricerca della forma che si vuole ottenere per la segmentazione finale dell'immagine. L'adattamento per questi tipi di modelli si esprime tramite una formulazione matematica. La curva si ferma (e dunque finisce di iterare) quando si raggiunge la condizione di minimo energetico. Il funzionale di energia viene definito nel momento in cui viene formulata la regola matematica che fa muovere la curva all'interno dell'immagine.

Le forze che consentono alla curva di muoversi ed evolvere nel tempo sono di due tipi: interne ed esterne. La forza interna è definita dalla curva stessa mentre la forza esterna indica l'esistenza di qualcosa all'interno dell'immagine. Quando la curva evolve ed arriva in prossimità dell'oggetto da rivelare, la forza interna eguaglia quella esterna e a questo punto si raggiunge il minimo energetico e si riesce ad ottenere la segmentazione finale dell'immagine.

Snakes e level set sono i due metodi utili per il raggiungimento del bilancio di forza. I primi vengono definiti contorni attivi parametrici, in cui vengono settati due parametri per raggiungere il bilancio delle forze:  $\alpha$  per la forza interna e  $\beta$  per la forza esterna. Il bilanciamento delle forze per i secondi viene dato da considerazioni geometriche [32]. Per il progetto di tesi è stato scelto di applicare un level set di Chan-Vese, già implementato all'interno di Matlab<sup>©</sup>, successivamente all'applicazione del filtro di Gabor.

### 2.4.3 Level Set e algoritmo di Chan-Vese

Il level set è uno dei due metodi che fa capo ai modelli deformabili geometrici. Il modello di Chan-Vese è un metodo che rende i modelli geometrici indipendenti dai bordi e dal gradiente. Sia  $\Omega$  un sottoinsieme aperto limitato di  $\mathbb{R}^2$ , con  $\partial\Omega$  il suo contorno. Sia u<sub>0</sub>:  $\overline{\Omega} \to \mathbb{R}^2$  una data immagine e C(s):[0,1]  $\to \mathbb{R}^2$  sia una curva parametrizzata. La regione dentro alla curva C è  $\omega$  e quella esterna a C è  $\overline{\Omega}/\omega$ . Con  $c_1$  viene rappresentata l'intensità dei pixel all'interno di C mentre con  $c_2$  l'intensità al di fuori di C [32]. La formulazione del level set senza gradiente è la seguente:

$$F_1(C) + F_2(C) = \int_{inside(C)} |u_0(x,y) - c_1|^2 dx dy + \int_{outside(C)} |u_0(x,y) - c_2|^2 dx dy \quad (2.5)$$

Non si parla di gradiente, ma l'idea di avere una differenza di colori tra due regioni vicine rimane allo stesso modo un gradiente. Il valore però risulta mediato e quindi anche se ci fosse del rumore questo viene abbattuto e dunque il comportamento risulta simile ad un filtro passa basso locale. L'obiettivo dell'algoritmo di Chan-Vese è minimizzare il funzionale di energia  $F(c_1, c_2, C)$  definito come segue:

$$F = \mu \cdot Length(C) + \nu \cdot Area(inside(C)) + + \lambda_1 \int_{inside(C)} |u_0(x, y) - c_1|^2 dx dy + + \lambda_2 \int_{outside(C)} |u_0(x, y) - c_2|^2 dx dy$$

$$(2.6)$$

dove i primi due termini dell'eq.2.6 rappresentano insieme il termine di regolarizzazione che impedisce alla curva di diventare troppo grande o piccola tra un'iterazione e l'altra, mentre gli ultimi due rappresentano insieme il termine di omogeneità per cui la curva deve fare in modo che il contorno sia posizionato sull'oggetto ed avviene quando quei due integrali sono nulli. I parametri  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  devono essere settati tutti maggiori di 0 [32].



Nel progetto di tesi si è scelto di effettuare le seguenti operazioni descritte nel flowchart in Fig.2.13

Figura 2.13: Flowchart per l'applicazione del level set di Chan-Vese

Per la segmentazione del lume prostatico nelle immagini istologiche i parametri da impostare per il Level Set di Chan-Vese in ambiente Matlab<sup>©</sup> sono lo *SmoothFactor*, che rappresenta la morbidezza o regolarità dei contorni, ed il *ContractionBias* che rappresenta la tendenza all'espansione o alla contrazione a seconda del segno. Se quest'ultimo risulta positivo viene forzato a restringersi, mentre se negativo tende ad espandersi.

Nel primo step dell'applicazione del level set di Chan-Vese vengono settati i seguenti parametri: *ContractionBias* pari -0.5, *SmoothFactor* pari a 0.5, numero di iterazioni del level set pari a 5 e iterazioni esterne pari a 50. Per la guida da fornire al level set di Chan-Vese viene dapprima estratto il canale verde della componente dei nuclei perché fornisce maggior contrasto rispetto alle altre componenti e rappresenta la guida del contorno da segmentare. Prima dell'applicazione del metodo viene aumentato il contrasto della maschera guida e viene filtrata l'immagine con un filtro gaussiano per conferire maggiore omogeneità. In ognuna delle 50 iterazioni esterne del level set vengono applicate delle operazioni di chiusura (dilatazione seguita da erosione con medesimo elemento strutturale) per rendere la maschera più omogenea ad ogni step. In Fig.2.14a è possibile visualizzare l'uscita dopo il filtraggio di Gabor e l'applicazione degli operatori morfologici, mentre in Fig.2.14b viene mostrato l'output in seguito all'applicazione del level set di Chan-Vese.



Figura 2.14: Segmentazione lume prostatico dopo l'applicazione del level set di Chan-Vese.(a) lume in giallo dopo l'uscita del filtro di Gabor e l'applicazione di operatori morfologici (b) lume in giallo dopo l'applicazione del level set di Chan-Vese

Può accadere che nell'applicazione del primo level set alcune aree si siano espanse oltre il limite definito dai nuclei e abbiano inglobato altre strutture di lume vicine. Per ovviare a questo problema si è deciso di valutare tutte le aree espanse dopo l'applicazione del level set e confrontarle con quelle in uscita dal filtro di Gabor. Se l'applicazione del level set ha aumentato l'i-esima regione di lume per 4 volte (in termini di area) rispetto all'i-esima regione corrispondente al filtro di Gabor e contemporaneamente l'area del lume in uscita dal level set è aumentata oltre una soglia imposta pari a 3000 (ricavata empiricamente da misure sul dataset) viene valutata la *Solidity* della regione di lume in esame. La *Solidity* rappresenta l'area della regione diviso per l'area convessa. Se questa ha raggiunto un valore inferiore a 0.85 non viene tenuto conto di quell'espansione, dovuta a level set, per l'i-esima regione di lume perché probabilmente fusa con altre regioni di lume vicine. La regione di lume viene cancellata e mantenuta quella in uscita dal filtro di Gabor. Una volta valutate tutte le regioni dilatate dall'applicazione del level set di Chan-Vese e cancellate quelle che non hanno rispetto i criteri sopra citati, si applica un secondo step del level set di Chan-Vese più contenuto rispetto al primo. I parametri impostati in ambiente Matlab<sup>©</sup> per questo secondo step sono i seguenti: ContractionBias pari a -0.3, SmoothFactor pari a 2.0 e numero di iterazioni del level set pari a 10 e iterazioni esterne pari a 20. La segmentazione del lume prostatico finale risulta data dalla somma dell'applicazione del primo step più performante dell'algoritmo di Chan-Vese e dal secondo step più contenuto.



Figura 2.15: Segmentazione lume prostatico finale. (a) immagine originale (b) segmentazione del lume finale in giallo

In Fig.2.15a viene mostrata l'immagine di riferimento colorata con ematossilina ed eosina, mentre la Fig.2.15b invece rappresenta la segmentazione finale del lume prostatico dopo la doppia applicazione dell'algoritmo di level set, in cui viene posto in evidenza come l'implementazione di tale algoritmo porti risultati soddisfacenti, individuando e uniformando il lume prostatico di ogni singola ghiandola, non agglomerando i lumi prostatici di due o più ghiandole vicine.

La Fig.2.16 mostra uno dei motivi per cui si è ritenuto fondamentale implementare un level set. Le zone tendenti al rosa, associabili ai corpi amilacei (Fig.2.16a), con la sola applicazione del filtro di Gabor non vengono inglobate all'interno del lume prostatico. In Fig.2.16b invece i corpi sferici calcificati sono accorpati al lume ed i contorni chiusi e ben definiti nell'intorno dello strato nucleico della ghiandola (Fig.2.16b). La doppia applicazione dell'algoritmo e i controlli sull'area tra uno step e l'altro, hanno consentito di non agglomerare i lumi prostatici delle due ghiandole vicine.



Figura 2.16: Esempio di funzionamento del level set. (a) lume in giallo dopo l'uscita del filtro di Gabor (b) lume in giallo dopo l'applicazione del level set

Tuttavia ci sono alcuni limiti nell'applicazione dell'algoritmo che non posso essere superati con questi criteri. L'algoritmo parte dalla prima estrazione del lume dal filtro di Gabor e successivamente quelle regioni vengono dilatate alla ricerca dei contorni e delle forme tramite l'applicazione del level set. Se la regione di lume non viene individuata dopo l'applicazione del filtro di Gabor, il level set non produce miglioramenti, in quanto quest'ultimo necessita di una base di partenza per la sua espansione.

### 2.5 Individuazione delle ghiandole prostatiche

Tutti i metodi appena descritti sono finalizzati all'individuazione di ghiandole prostatiche all'interno delle immagini istologiche. Una ghiandola, per quanto descritto e visto nel par.1.2.4, non presenta quasi mai una forma univoca e ben delineata. Spesso parametri architetturali come la dimensione, l'area ed i contorni delle ghiandole risultano essere variabili e poco precisi. Oltretutto, la morfologia e l'architettura di una ghiandola cambia radicalmente all'aumentare dell'aggressività del tumore. La componente del lume tende a scomparire, le ghiandole tendono a fondere fino ad arrivare al tumore di pattern cinque in cui non si riesce ad individuare distintamente una vera e propria ghiandola. Molto spesso anche la presenza di artefatti, come descritto nel par.1.2.3, può compromettere la buona rivelazione. Non solo, anche la scarsa adesione del colorante o la cattiva conservazione del vetrino, possono portare ad avere una bassa risoluzione dell'immagine e dunque a non riuscire ad individuare correttamente le ghiandole prostatiche all'interno delle immagini istologiche.

#### 2.5.1 Approccio euristico

Per la rivelazione automatica di ghiandole all'interno di immagini istologiche prostatiche, la scelta progettuale è ricaduta sull'implementazione di un criterio euristico che consente di individuare con ottimi risultati ghiandole benigne e tumorali. Le ghiandole benigne e tumorali con basso score di Gleason, per quanto visto nel par.1.2.4, risultano essere ben definite e circoscritte. Per i pattern tumorali di grado 4 e 5, poiché le ghiandole tendono a fondere e ramificare e dunque il modello ghiandolare a scomparire, è decisamente più difficile definire correttamente una ghiandola. Per questo tipo di architettura sono stati scelti criteri aggiuntivi come la rivelazione di agglomerati nucleici associabili spesso a pattern tumorali di pattern 1-3 si sono scelti criteri di identificazione che partono dall'esplorazione delle zone attorno al lume. Le ghiandole benigne e tumorali con basso Score di Gleason hanno sempre una certa quantità di nuclei attorno al lume e per questo motivo si è scelto di procedere come nel flowchart in Fig.2.17.



Figura 2.17: Flowchart primo step di estrazione delle ghiandole

La segmentazione del lume prostatico visto nel par.2.4 e l'estrazione dei nuclei cellulari vista nel par.2.3 sono la base da cui partire per l'individuazione delle ghiandole prostatiche all'interno delle immagini istologiche. Il metodo, infatti, per l'estrazione delle ghiandole partiva dai risultati ottenuti dall'estrazione dei nuclei cellulari e del lume prostatico (Fig.2.18a). Calcolate tutte le aree connesse in quella maschera, si è presa in esame l'i-esima regione di lume, dilatata la regione attorno ed estratta una corona di nuclei. Si è rapporta l'area dei nuclei all'interno della corona estratta con l'area della corona stessa. Come percentuale è stata scelta una soglia pari al 15%, ricavata da misure sperimentali sull'intero dataset. Quando quella regione rispetta quei criteri si salvano quei nuclei in una maschera temporanea, così come si mantengono quelle regioni di lume che sono indiziate ad essere ghiandole. I nuclei vengono assegnati alla regione di lume più vicina secondo un criterio di distanza euclidea.

Le aree di lume che non rispettano quel criterio sono state riprocessate e sottoposte ad un secondo criterio di dilatazione della regione del lume. Questo step iterativo è stato scelto per quelle ghiandole che presentano uno strato più o meno spesso di citoplasma prima di quello nucleico, oppure per quelle ghiandole, come ad esempio nei pattern 3 e 4, in cui lo strato di nuclei non è direttamente a contatto con il lume. Una volta ottenuta la maschera dei nuclei, nuovamente questi vengono assegnati alla regione di lume più vicina secondo un criterio di distanza euclidea.



Figura 2.18: Primo step per l'estrazione delle ghiandole. (a) in verde nuclei e in giallo lume prostatico (b) prima estrazione ghiandolare

Il primo criterio garantisce risultati soddisfacenti per le ghiandole benigne e tumorali fino al pattern 3 (Fig.2.18b). Tuttavia esistono dei limiti non ancora superabili con questo primo step. Per superare alcuni di queste limitazioni vengono aggiunti dei criteri per le ghiandole tumorali di pattern 4 e 5, dove le regioni di lume nella ghiandola tendono a fondere o addirittura a scomparire. Prima di procedere all'estrazione delle ghiandole per quei tipi di pattern sono state effettuate alcune operazione descritte in Fig.2.19.



Figura 2.19: Flowchart per l'estrazione finale delle ghiandole

Dopo aver effettuato una pulizia sulla maschera grezza delle ghiandole, queste ulti-

me vengono processate dalla più piccola alla più grande, in termini di area. È stato scelto questo criterio di elaborazione in modo da non agglomerare le ghiandole più piccole all'interno di quelle più grandi, determinando prima i contorni delle prime e successivamente quelli delle seconde, non esaminando però i contorni delle ghiandole già processate (Fig.2.20b).

In Fig.2.20b è possibile notare come tutte le ghiandole benigne sono state individuate



Figura 2.20: Definizione dei contorni delle ghiandole. (a) prima estrazione delle ghiandole (b) definizione dei contorni delle ghiandole

correttamente e, altrettanto importante, viene mantenuta la distinzione di ogni singola ghiandola prostatica (ogni colore rappresenta una ghiandola diversa), senza fondere o agglomerare due o più ghiandole vicine.

Successivamente sono stati posti dei criteri per analizzare quelle strutture ghiandolari che non contengono lume e che spesso sono associabili ad ammassi tumorali di nuclei. Per questo step sono stati processati i nuclei non assegnati a nessun ghiandola in precedenza. Per cercare di uniformare gli agglomerati e renderli omogenei viene filtrata l'immagine, vengono eliminate le piccole componenti che non rappresentano ghiandole fuse e infine eseguita un'operazione di chiusura (dilatazione seguita da erosione) per la definitiva chiusura degli ammassi nucleici. La maschera per le ghiandole tumorali con pattern più alto (ammassi di nuclei) in uscita da questo step viene sommata alla maschera delle ghiandole, ricavata precedentemente, completando l'individuazione delle ghiandole prostatiche.

Il risultato è rappresentato in Fig.2.21b dove con colore giallo sono evidenziati gli agglomerati nucleici che sono stati individuati all'interno dell'immagine istologica.



Figura 2.21: Estrazione finale delle ghiandole. (a) immagine originale (b) estrazione finale delle ghiandole

Nel caso di ghiandole benigne, spesso il lume ha una colorazione rosa/violaceo, dunque non identificabile con il primo step di segmentazione implementato, ma tramite l'aggiunta di criteri aggiuntivi, mentre nel caso di ghiandole tumorali di grado 4-5, spesso il lume scompare e la ghiandola risulta costituita da un ammasso di nuclei. Questo criterio risulta performante ed essenziale per la corretta individuazione delle ghiandole sopra descritte. Il doppio step di dilatazione del lume prostatico e l'aggiunta dei criteri sugli agglomerati, invece, sono risultati utile anche nel cercare di identificare quelle ghiandole benigne che possiedono un doppio strato nucleico attorno al lume (Fig.2.21b) o con uno strato citoplasmatico prima di quello nucleico.

### 2.6 Metriche di validazione

La classificazione binomiale o binaria ha il compito di classificare gli elementi in un determinato insieme e consente, in base ad una qualche regola di classificazione, di prevedere a quale dei due insieme appartiene l'elemento esaminato. La classificazione binaria è applicata in moltissimi scopi. In medicina, il test di classificazione binaria risulta essere molto utile per determinare se un paziente sia affetto o meno da una patologia.

Esistono diverse metriche di validazione che possono essere utilizzate per misurare le prestazioni di un classificatore o predittore; campi diversi prediligono metriche diverse. Ad esempio, in medicina vengono spesso utilizzate sensibilità e specificità.

Nei test medici per rivelare la presenza o l'assenza di una patologia si utilizza spesso una *confusion matrix* 2x2 come visibile in tabella 2.1. Nel campo dell'apprendimento automatico e in particolare del problema della classificazione statistica, una confusion matrix, nota anche come tabella di errata classificazione, è una tabella specifica che consente la visualizzazione delle prestazioni di un algoritmo, in genere in apprendimento supervisionato (in apprendimento non supervisionato è chiamata matrice di corrispondenza). Il nome deriva dal fatto che rende facile vedere se il sistema confonde due classi. Ogni riga della confusion matrix rappresenta i valori reali, mentre le colonne rappresentano i valori predetti [33].

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

Tabella 2.1: Esempio di confusion matrix 2 x 2

La condizione positiva (P) sono tutti i casi realmente positivi mentre la condizione negativa (N) sono tutti i casi realmente negativi. Veri Positivi (TP), Veri Negativi (TN), Falsi Positivi (FP) e Falsi Negativi (FN) sono i risultati del test che vengono forniti direttamente dalla confusion matrix. Nel nostro caso rappresentano:

- TP (Veri Positivi): rappresenta il numero di elementi che sia il ground truth che l'algoritmo hanno identificato come appartenenti alla regione ghiandolare;
- TN (Veri Negativi): rappresenta il numero di elementi classificati come non appartenenti alle regione ghiandolare sia dal ground truth che dall'algoritmo;
- FP (Falsi Positivi): rappresenta il numero di elementi che il ground truth identifica come regione non ghiandolare ma che l'algoritmo classifica come regione ghiandolare;
- FN (Falsi Negativi): rappresenta il numero di elementi che il ground truth identifica come regione ghiandolare ma che l'algoritmo classifica come regione non ghiandolare.

Ad esempio, nei test medici, un falso positivo (la malattia non esiste ma viene rilevata) è considerato meno grave rispetto ad un falso negativo (la malattia esiste ma non viene rilevata).

Ancora più informative invece risultano essere queste quattro metriche direttamente ricavate dai valori della tabella 2.1 tramite le seguenti formulazioni matematiche:

Sensibilità (noto anche come recall o TPR True Positive Rate): misura la percentuale di elementi identificati come positivi sia dal ground truth che dall'algoritmo, rispetto alla totalità degli elementi positivi. È calcolata come il rapporto tra Veri Positivi e la totalità delle osservazioni positive (Veri Positivi più Falsi Negativi):

$$Sens = \frac{TP}{TP + FN} \tag{2.7}$$

• Specificità (noto anche *TNR True Negative Rate*): misura la percentuale di elementi identificati come negativi sia dal ground truth che dall'algoritmo, rispetto

al numero totale di elementi negativi. È calcolata come il rapporto tra Veri Negativi e la totalità delle osservazioni negative (Veri Negativi più Falsi Positivi):

$$Spec = \frac{TN}{TN + FP} \tag{2.8}$$

 Valore Predittivo Positivo (o precision): misura la percentuale di elementi identificati correttamente come positivi diviso il numero totale di elementi etichettati come appartenenti a quella classe. È definita come il rapporto tra i Veri Positivi e la somma dei Veri Positivi più Falsi Positivi:

$$VPP = \frac{TP}{TP + FP} \tag{2.9}$$

 Valore Predittivo Negativo: misura la percentuale di elementi identificati correttamente come negativi diviso il numero totale di elementi etichettati come appartenenti a quella classe. È definito come il rapporto tra i Veri Negativi e la somma dei Veri Negativi e Falsi Negativi.

$$VPN = \frac{TN}{TN + FN} \tag{2.10}$$

Ci sono un certo numero di altre metriche, tra le quali individuiamo il punteggio  $F_1$ score, nota anche come la *misura* F, la quale combina precision e recall. Tale indice è una misura dell'accuratezza del test e per calcolarla viene effettuata la media armonica tra precision e recall come segue:

$$F_1 = \left(\frac{recall^{-1} + precision^{-1}}{2}\right)^{-1} = 2 * \frac{precision * recall}{precision + recall}$$
(2.11)

il punteggio  $F_1$  è pari a 1 quando sia precision che recall sono pari a 1, mentre risulta nullo quando uno tra i due coefficienti che costituiscono il punteggio sono pari a 0. L'indice  $F_1$  score è anche noto come *Dice Similarity Coefficient o overlap index*. L' $F_1$  score (o DSC) è uno degli indici maggiormente utilizzati nella validazione della segmentazione di immagini mediche ed è utilizzato per misurare quantitativamente quanto le maschere ottenute dall'algoritmo siano sovrapposte al ground truth. In particolare, risulta particolarmente utile nella misura della riproducibilità e accuratezza dell'algoritmo [9]. Quando è applicato a dati booleani si può scrivere come:

$$DSC = \frac{2TP}{2TP + FP + FN} \tag{2.12}$$

Tale relazione indica, in termini insiemistici, il rapporto tra l'area di intersezione tra le maschere e l'area media. La Fig.2.22 mostra in maniera più intuitiva il significato del DSC, per operazioni di segmentazione.



Figura 2.22: Rappresentazione visiva del coefficiente F1 score (DSC) [9]

 $L'F_1$ , come detto in precedenza, rappresenta la media armonica tra recall e precision, mentre la *G-measure* rappresenta invece la media geometrica tra i due indici ed è calcolata come segue:

$$G = \sqrt{precision * recall} = \sqrt{VPP * sensibilità}$$
(2.13)

Infine il *Jaccard Index*, noto anche come *Intersection Over Union* o coefficiente di similarità Jaccard, è una statistica utilizzata per confrontare la similarità e la diversità degli insiemi di campioni. Il coefficiente di Jaccard misura la similarità tra gli insiemi di campioni ed è definito come la dimensione dell'intersezione diviso per la dimensione dell'unione degli insiemi dei campioni:

$$J(A,B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} = \frac{|A \cap B|}{|A| + |B| - |A \cap B|}$$
(2.14)

## 2.7 Rete Neurale Convoluzionale (CNN)

Nell'apprendimento automatico (dall'inglese *Machine Learning*), una rete neurale convoluzionale (dall'inglese *Convolutional Neural Network*, acronimo CNN o ConvNet) è un tipo di rete neurale artificiale profonda, feed-forward, molto utilizzata nell'analisi delle immagini visive. A causa dello sviluppo dei nuovi sistemi computazionali e della presenza delle GPU (Unità di elaborazione grafica) su qualsiasi computer moderno, le CNN hanno avuto negli ultimi anni un rapido successo [34]. Le reti neurali convoluzionali si adattano bene alle immagini perché a differenza di una rete neurale classica, gli strati di una CNN hanno i neuroni che sono disposti in 3 dimensioni: larghezza, altezza e profondità (riferita alla terza dimensione, da non confondere con la profondità di una rete neurale che si riferisce al numero di strati in una rete). In Fig.2.23a è visibile una Rete Neurale classica a 3 strati mentre in Fig.2.23b una Rete Neurale Convoluzionale che dispone i neuroni in 3 dimensioni [10].



Figura 2.23: Differenza tra Rete Neurale e ConvNet [10]

Una Rete Neurale Convoluzionale è composta tipicamente da due parti:

- Base convoluzionale, che è composta da una pila di strati convoluzionali e di raggruppamento (dall'inglese *convolutional and pooling layers*). L'obiettivo principale della base convoluzionale è generare caratteristiche dall'immagine [12].
- Classificatore, che di solito è composto da livelli completamente connessi (dall'inglese *fully connected layers*). L'obiettivo principale del classificatore è classificare l'immagine in base alle caratteristiche rilevate. Un livello completamente connesso è un livello i cui neuroni hanno connessioni complete a tutte le attivazioni nel livello precedente [12].

### 2.7.1 AlexNet e metodo del transfer learning

Il primo lavoro che ha popolarizzato le Reti Neurali Convoluzionali nel mondo della *Computer Vision* è AlexNet, sviluppata da Alex Krizhevsky, Ilya Sutskever and Geoff Hinton. La rete ha un'architettura molto simile alla rete LeNet, ma più profonda e grande (Fig.2.24). La rete neurale convoluzionale AlexNet è stata utilizzata per classificare 1,2 milioni di immagini ad alta risoluzione nel concorso ImageNet LSVRC-2010 nelle 1000 diverse classi. La rete neurale, che ha 60 milioni di parametri e 650.000 neuroni, è costituita da cinque strati convoluzionali (*convolutional layers*), alcuni dei quali sono seguiti da strati di pooling (*max pooling*) e tre strati completamente connessi (*fully connected*) con una funzione *softmax* finale [11].



Figura 2.24: Configurazione della Rete Neurale Convoluzionale AlexNet (2012) [11]

Per l'applicazione della rete neurale convoluzionale nel nostro scopo è stato utilizzato il metodo del *transfer learning*. Questo è un metodo di apprendimento automatico in cui un modello sviluppato per un'attività viene riutilizzato come punto di partenza per un modello in una seconda attività. Il metodo del transfer learning è un metodo diffuso in *Computer Vision* perché ci consente di costruire modelli accurati risparmiando del tempo [35]. Con il transfer learning, invece di avviare il processo di apprendimento da zero, si inizia da schemi appresi quando si risolve un problema diverso. In Fig.2.25 si possono osservare le tre possibili strategie per realizzare una rete neurale convoluzionale. Per il nostro scopo è stato riadatto il modello della rete neurale convoluzionale AlexNet scegliendo come metodo di transfer learning il modello pre-allenato (*Pretrained models*). Lo scopo è quello di classificare ogni ghiandola in input nelle due classi possibili benigna e maligna. Per questo approccio viene utilizzata la strategia tre in Fig.2.25, congelando la base convoluzionale e modificando il classificatore per classificare in due classi anzichè mille di partenza.



Figura 2.25: Metodi di transfer learning [12]

In *Computer Vision* e nel *deep learning*, il transfer learning viene solitamente espresso attraverso l'uso dei modelli pre-allenati. Il modello di approccio pre-allenato è un modello che è stato addestrato su un set di dati di riferimento di grandi dimensioni per risolvere un problema simile a quello che si vuole risolvere [36]. Di conseguenza, a causa del costo computazionale della formazione di tali modelli, è prassi comune importare e utilizzare modelli dalla letteratura. In generale, non è ovvio che ci sarà un vantaggio nell'uso del transfer learning ma possono esserci diversi possibili benefici e ragioni per cui si utilizza questo modello tra cui l'abilità a raggiungere rapidamente la convergenza del modello addestrato e la mancanza di un set di dati di dimensioni sufficienti per costruire una rete da zero [36].

## 2.8 Metodo di estrazione delle immagini per addestramento rete CNN

Come già detto la rete neurale convoluzionale Alex Net è un tipo di rete utilizzata per applicazioni di image processing. Nel suo scopo originale, la rete AlexNet è stata utilizzata nel concorso ImageNet LVSRC-2010 per classificare in 1000 classi 1,2 milioni di immagini ad alta risoluzione. Le immagini fornite in input avevano dimensioni fisse di [227x227x3]. Sebbene questa dimensione è notevolmente ridotta rispetto alle immagini utilizzate come dataset per l'individuazione delle ghiandole prostatiche, si è scelto di mantenere questa dimensione di input perché sufficiente a prendere dettagli architetturali delle ghiandole malate e sane. Sono state estratte le patch ed etichettate come tumorali (1) o sane (0). L'etichettatura di ogni patch è stata definita accuratamente grazie alle segmentazioni delle zone tumorali fornite da un esperto patologo. Il layer di output responsabile della classificazione finale, come già detto in precedenza, è stato modificato per consentire la classificazione di ogni ghiandola prostatica nelle due classi benigne o tumorali.

### 2.8.1 Estrazione delle patch mirata sulle ghiandole

Per l'addestramento della rete neurale convoluzionale è stato scelto di estrarre le immagini dalle zone ghiandolari individuate dall'algoritmo come descritto in precedenza nel par.2.5. Questo criterio di estrazione è stato scelto perché nella maggioranza dei casi il tumore alla prostata ha origine nell'epitelio ghiandolare. Infatti quasi la totalità dei carcinomi prostatici è definita dalla classe degli adenocarcinomi, ossia tumori maligni del tessuto epiteliale.



Nel flowchart in Fig.2.26 viene esposto il metodo adottato per l'estrazione delle immagini.

Figura 2.26: Flowchart per l'estrazione delle patch mirata sulle ghiandole

Per la corretta estrazione delle immagini vengono imposte delle soglie per togliere delle patch meno informative oppure non chiaramente identificabili come tumorali o sane. Successivamente queste immagini estratte sono utilizzate nell'addestramento della rete neurale convoluzionale per la rivelazione del tumore. L'algoritmo, come descritto nei paragrafi precedenti, prende in input l'immagine da processare, effettua i vari step visti in precedenza ed individua automaticamente le zone ghiandolari prostatiche.

Come scelta progettuale si è deciso di addestrare la rete con delle immagini sottocampionate rispetto alle immagini originali. Per questo motivo tutti gli output ricavati durante l'algoritmo vengono ricampionati a 10x. A questo punto sulla maschera contenente le ghiandole individuate viene creato un bounding box per ogni singola regione ghiandolare connessa. Viene analizzata la prima regione ghiandolare identificata all'interno dell'immagine. Qualora le dimensioni del bounding box che racchiude la regione ghiandolare da processare siano maggiori di quelle imposte per la patch da estrarre, questa viene processata, altrimenti il bounding box di quella regione ghiandolare non viene considerato poiché non riesce a contenere al suo interno neppure una patch per via delle sue ridotte dimensioni.

Viene estratta la prima patch valida e valutata la sua area. Se questa contiene almeno il 50% di zona ghiandolare (ricavata dalla maschera delle ghiandole calcolata nel par.2.5) al suo interno viene processata, altrimenti viene scartata perché presenta maggiori quantità di stroma o altre componenti rispetto a tessuto ghiandolare. Un altro parametro da valutare è la percentuale di lume all'interno della patch. Una ghiandola contenente solo lume non risulta informativa per discriminare il pattern benigno o tumorale della ghiandola e per questo viene eliminata e non considerata come patch valida. Tutte le patch estratte vengono dunque etichettate in tumorali e sane, al fine di addestrare la rete neurale convoluzionale a riconoscere i pattern benigni e maligni. Le segmentazioni del carcinoma fornite dal medico sono utili per stabilire quando una ghiandola è tumorale o sana. Per definire una ghiandola tumorale o sana viene effettuato un controllo sulla percentuale di area tumorale all'interno della ghiandola. Se più del 70% dell'area della patch è composta da area tumorale viene etichettata come tumorale, se meno del 30%dell'area della patch è composta da area tumorale viene etichettata come benigna, se altrimenti l'area tumorale all'interno della patch estratta è compresa tra il 30% e il 70%viene scartata perché non si riesce a definire con certezza la natura della ghiandola. Una volta processata la patch ed etichetta come tumorale o sana, questa viene salvata in formato png. Viene effettuato un controllo per verificare se tutte le patch all'interno

della regione ghiandolare in esame siano estratte. Se il risultato risulta positivo, si processa una nuova regione ghiandolare come fatto in precedenza. Una volta terminate di processare tutte le regioni ghiandolari per quella immagine prostatica il processo di estrazione delle patch in maniera mirata sulle regioni ghiandolari per quell'immagine termina.

In Fig.2.27 è possibile vedere un esempio sulla modalità di estrazione delle patch mirata sulle ghiandole.



Figura 2.27: Estrazione delle patch mirata sulle ghiandole individuate

# Capitolo 3

# Risulati

In questa sezione vengono esposti i principali risultati ricavati dall'algoritmo implementato con i metodi descritti nel capitolo 2.

Una volta valutate le prestazioni qualitative dell'algoritmo per la scelta dei metodi da applicare, vengono esposte quelle quantitative riguardo l'estrazione delle ghiandole prostatiche, usando le metriche già discusse nel par.2.6. Vengono prima presentati e discussi i risultati per l'intero dataset delle immagini, successivamente viene effettuata una panoramica dettagliata sulle prestazioni dell'algoritmo nel caso di ghiandole benigne e tumorali. Questa doppia analisi permette di far capire alcuni possibili limiti dell'algoritmo.

Infine, vengono analizzate le prestazioni della rete neurale convoluzionale utilizzata per la rivelazione del tumore nel tessuto prostatico.

## 3.1 Validazione numerica

Prima di esporre le prestazioni complessive dell'algoritmo, in Fig.3.1 viene mostrata un'immagine di riferimento e i due output su cui sono state valutate le performance della segmentazione delle ghiandole. In alto nella Fig.3.1 viene mostrata un'immagine istologica presa come riferimento tra le 150 immagini presenti nel dataset. In basso nella Fig.3.1 sono presentati i due output di confronto per la validazione delle prestazioni dell'algoritmo.





Figura 3.1: Confronto segmentazione manuale ed automatica (intero dataset). (a) immagine originale (b) in giallo segmentazione manuale (c) in verde segmentazione automatica

L'esempio è utile per dimostrare come viene effettuata la validazione dell'algo-

ritmo. In Fig.3.1a viene presentata un'immagine istologica prostatica, colorata con ematossilina-eosina. In Fig.3.1b si può osservare, colorata in giallo, la segmentazione manuale eseguita dall'operatore, la quale rappresenta il ground truth (GT) su cui testare l'algoritmo. In Fig.3.1c è invece rappresentata la segmentazione automatica in uscita dall'esecuzione dell'algoritmo, colorata in verde. Visivamente la segmentazione sembra mostrare buone performance con una buona percentuale di overlap tra le due maschere di segmentazione. A questo punto per quantificare la corretta estrazione ed individuazione delle ghiandole prostatiche all'interno delle immagini istologiche, sono state prese in considerazione le metriche descritte nel par.2.6. In questo modo è stato possibile classificare ogni pixel della segmentazione manuale con quella della segmentazione automatica dell'algoritmo. Fra tutte le metriche di validazione esposte in precedenza, sono stati scelti quattro indici maggiormente significativi e non ridondanti: F1 score, recall, precision e jaccard index. Questi indici sono stati valutati rispetto alle segmentazioni manuali fornite da un solo ground truth. Per tutte le 150 immagini del dataset sono state eseguite le segmentazioni manuali delle zone ghiandolari presenti e valutate le prestazioni complessive rispetto alle segmentazioni automatiche dell'algoritmo. Successivamente tenendo conto della divisione del subset in ghiandole sane e malate, grazie alle indicazioni fornite dal medico, sono state valutate singolarmente le prestazioni per le immagini contenenti ghiandole benigne e tumorali, al fine di giustificare e dimostrare i possibili cali delle prestazioni nella ricerca dei pattern tumorali.

### 3.1.1 Validazione sull'intero dataset

Sono state dapprima analizzate le prestazioni sull'intero dataset per quantificare la percentuale di correttezza nell'individuazione delle ghiandole. Per rendere la lettura dei risultati facile ed immediata, si è deciso di rappresentare i quattro indici descritti in precedenza sotto forma di box plot. In statistica descrittiva, questo tipo di diagramma è molto utilizzato poiché consente di visualizzare intuitivamente la distribuzione degli indici, la mediana,i valori percentili e gli *outlier*, ossia quei valori distanti dalle osservazioni e definiti anomali.



Figura 3.2: Box plot per i quattro indici sull'intero dataset

Dai quattro box plot si evince come le prestazioni complessive dell'algoritmo risultino soddisfacenti per l'intero dataset. La mediana della distribuzione per gli indici F1 score, precision e recall risulta superiore al 90% e leggermente più bassa per il jaccard index. Esaminando ancora i quattro box plot, il valore adiacente inferiore (VAI) non scende sotto l'80% e il valore adiacente superiore (VAS) è quasi prossimo all'unità per le metriche F1 score, precision e recall. La misura della dispersione chiamata comunemente scarto interquartile o differenza interquartile (differenza tra terzo quartile Q3 e primo quartile Q1 rispettivamente la superficie superiore e inferiore della scatola) indica come il 50% dei valori si ritrovano in uno stretto range di pochi punti percentuali. Questo conferma l'affidabilità del metodo anche per un dataset così ampio come possono essere 150 immagini diverse tra di loro. La forma (distanza tra media e i quartili) della distribuzione presenta quasi per tutti gli indici una certa simmetria, particolarmente marcata per l'F1 score e la precision. Gli *outlier* (valori anomali nel dataset) sono segnati individualmente in rosso sul box plot. Questi rappresentano una percentuale molto bassa rispetto all'intero dataset analizzato e pochi outlier raggiungono valori inferiori al 80% per gli indici F1 score, precision e recall. Si è comunque reso necessario analizzare gli outlier per comprendere le cause che hanno determinato questo leggero calo delle prestazioni.

In calo rispetto agli altri indici risultano le percentuali dello jaccard index con una mediana poco più bassa del 90% e una differenza tra VAS e VAI di circa 20 punti percentuali. Valori più bassi dello jaccard index indicano una percentuale più bassa nell'intersezione tra le due maschere.

I valori non ricavabili direttamente dal box plot sono la media e la deviazione standard. Per questo motivo in tabella 3.1 vengono presentati, per le quattro metriche in analisi, i risultati medi (più o meno la deviazione standard) per l'intero dataset. Sui 150 campioni, si evince come il valore medio per gli indici F1 score, recall e precision sia maggiore del 90% e la deviazione standard sotto il punto percentuale. Per lo jaccard index anche la media risulta più bassa ma comunque accettabile sopra l'85%. I risultati sono accettabili e ottimi per l'intero dataset.

	F1 score	Recall	Precision	Jaccard
Dataset	$0.0275 \pm 0.0336$	$0.0333 \pm 0.0516$	$0.0238 \pm 0.0360$	$0.8666 \pm 0.0568$
totale	$0.9275 \pm 0.0350$	$0.9333 \pm 0.0310$	$0.9230 \pm 0.0309$	0.0000 ± 0.0000

Tabella 3.1: Media più deviazione standard dei quattro indici per l'intero dataset

### 3.1.2 Validazione dataset sane

Sono state analizzate separatamente le prestazioni delle immagini istologiche contenenti ghiandole sane e malate per cercare di analizzare i possibili limiti dell'algoritmo e giustificare la presenza di alcuni outlier nel dataset complessivo delle immagini. Come fatto in precedenza è possibile prima vedere gli output di un'immagine di riferimento contenente solo ghiandole sane (Fig.3.3).



(a)



Figura 3.3: Confronto segmentazione manuale ed automatica (dataset sane). (a) immagine originale (b) in giallo segmentazione manuale (c) in verde segmentazione automatica

I quattro grafici seguenti mostrano le prestazioni complessive anche per questo dataset di immagini, valutando nuovamente le metriche F1 score, recall, precision e jaccard index.



Figura 3.4: Andamento F1 score (dataset sane)



Figura 3.5: Andamento recall (dataset sane)



Figura 3.6: Andamento precision (dataset sane)



Figura 3.7: Andamento jaccard index (dataset sane)

Come già visto qualitativamente i risultati rispecchiano le aspettative. Le prestazioni migliori dell'algoritmo vengono fornite per le immagini contenenti ghiandole sane. Questo risultato è giustificato dalla forma più prevedibile e precisa delle ghiandole non tumorali rispetto a quelle tumorali. È stato dimostrato come l'algoritmo fornisse percentuali nettamente superiori alla media dell'intero dataset con un aumento significativo delle performance. In dettaglio, vengono valutati i valori dei quattro indici visti in

	F1 score	Recall	Precision	Jaccard
Dataset	$0.9441 \pm 0.0178$	$0.9583 \pm 0.0279$	$0.9314 \pm 0.0301$	$0.8946 \pm 0.0319$
sane			0.00011 ± 0.00001	

precedenza, anche sul dataset delle immagini istopatologiche contenenti solo ghiandole sane. L'algoritmo forniva le seguenti performance visibili in tabella 3.2.

Tabella 3.2: Media più deviazione standard dei quattro indici per il dataset (ghiandole sane)

Nel complesso si può notare come le prestazioni degli indici aumentano di circa il 2-3% rispetto alle performance valutate sull'intero dataset delle immagini. La deviazione standard decresce e non raggiunge mai valori più alti dello 0.5% confermando come per un dataset così ampio di immagini l'algoritmo mostra risultati ripetibili e soddisfacenti. Si evince dai grafici precedenti come nessun indice dei quattro analizzati scende al di sotto del 80% e in particolar modo nessun immagine del dataset presenta F1 score sotto il 90%. Le performance medie risultano essere superiori rispetto a quelle del dataset complessivo. Questo conferma l'attendibilità, la riproducibilità e l'affidabilità del metodo di estrazione per le ghiandole benigne.

### 3.1.3 Validazione dataset tumorali

Anche per le ghiandole tumorali è stato preso come riferimento un esempio per mostrare qualitativamente le performance dell'algoritmo. È chiaramente già visibile come le ghiandole non sono trovate con la stessa accuratezza e precisione mostrata in precedenza.



(a)



Figura 3.8: Confronto segmentazione manuale ed automatica (dataset tumorali). (a) immagine originale (b) in giallo segmentazione manuale (c) in verde segmentazione automatica
Ancora una volta viene fatta l'analisi quantitativa dei quattro indici per cercare di analizzare le performance e dimostrare il calo delle prestazioni per alcuni pattern tumorali.



Figura 3.9: Andamento medio F1 score (dataset tumorali)



Figura 3.10: Andamento medio recall (dataset tumorali)



Figura 3.11: Andamento medio precision (dataset tumorali)



Figura 3.12: Andamento medio jaccard index (dataset tumorali)

Per quelle ghiandole con un alto punteggio di Gleason compreso tra 4 e 5, come già ampiamente detto, l'identificazione delle ghiandole può portare ad errori e dunque risultare poco accurata. Questo è dovuto principalmente all'assenza di una vera struttura ghiandolare.

Espandendo i risultati per le ghiandole tumorali è possibile dunque confermare quanto detto. I quattro grafici delle metriche F1 score, recall, precision e jaccard index, rivelano un andamento medio delle performance inferiori rispetto a quelle viste per il dataset delle immagini sane. Gli indici medi sul dataset delle immagini tumorali, come evidenziato dalla tabella 3.3, risultano più bassi rispetto agli indici medi delle ghiandole sane. Le prestazioni calano anche quasi del 10% come per lo jaccard index, mentre la deviazione standard cresce e supera lo 0.5%. L'andamento generale degli indici risulta maggiormente variabile e i valori oscillano tra  $\pm 15\%$ . I picchi più bassi nell'andamento delle performance sono associabili ai pattern tumorali di grado più elevato, mentre le performance maggiormente soddisfacenti sono associabili ai pattern tumorali di grado più basso della scala di Gleason. Nel complesso i risultati mostrati in tabella 3.3 mostrano comunque buone performance, seppur inferiori a quanto dimostrato per le immagini istologiche contenenti esclusivamente ghiandole sane.

	F1 score	Recall	Precision	Jaccard
Dataset	$0.8944 \pm 0.0334$	$0.8833 \pm 0.0519$	$0.9088 \pm 0.0443$	$0.8106 \pm 0.0545$
tumorali				

Tabella 3.3: Media più deviazione standard dei quattro indici per il dataset (tumorali)

### 3.2 Validazione della Rete Neurale Convoluzionale

Effettuata l'estrazione ghiandolare con i risultati mostrati in precedenza, nel par.2.8 è stato esposto il metodo di estrazione delle patch dalle zone ghiandolari individuate. Queste hanno consentito poi l'addestramento della rete neurale convoluzionale per la rivelazione del tumore. In Fig.3.13 è possibile visualizzare un esempio di tre patch benigne (i.) e tre patch tumorali (ii.) estratte secondo le modalità esposte nel par.2.8. Queste patch dimostrano come la dimensione [227x227x3] consente di ottenere immagini con dettagli ghiandolari sufficienti a discriminare una patch tumorale da una sana. Per questo motivo si è mantenuta tale dimensione come input. Tra tutte le patch estratte in precedenza ne sono state scelte 5346 in maniera random per avere la giusta proporzione tra benigne (2673) e tumorali (2673).

i.



ii.

Figura 3.13: Esempi di patch estratte. (i) patch benigne (ii) patch tumorali

Una volta estratte le patch, adottato il metodo del transfer learning e suddiviso il dataset, lo step successivo è stato quello di addestrare la rete neurale convoluzionale per la rivelazione del tumore. In Fig.3.14 è possibile vedere i progressi dell'addestramento della rete. La rete è stata addestrata su un singolo processore da 2,7 GHz Intel Core i5 in ambiente Matlab<sup>©</sup> 2018b.



Figura 3.14: Progressi dell'allenamento

Tra le 5346 patch estratte, 5000 patch sono state utilizzate per l'allenamento della rete e 346 immagini a scopo di test. Per monitorare l'allenamento è stato scelto di utilizzare il 30% del training set come validation set per selezionare i parametri ed evitare l'overfitting. Come strategia di apprendimento è stata scelto l'*early stopping* in modo da interrompere l'allenamento quando la curva della validazione (nella curva di *loss*) smette di diminuire. Questa tecnica di apprendimento è stata utilizzata principalmente per ridurre l'overfitting della rete [37]. L'addestramento è stato effettuato per 16 epoche (Fig.3.14) e vengono mostrati i progressi della curva di *loss* e *accuracy*. Il modello sembra convergere abbastanza rapidamente entro le prime epoche. La velocità di decadimento della curva di *loss* indica che il tasso di apprendimento è appropriato. La pendenza simile tra la validazione e l'apprendimento esclude una possibile presenza di overfitting. L'accuratezza finale della rete risulta al 98,4%.

Sono state successivamente utilizzate 346 patch come test set per stimare l'accuratezza reale del modello e dunque la capacità di generalizzazione della rete.

Sono state espresse le percentuali dell'accuratezza della rete neurale convoluzionale sul test set in termini di *confusion matrix* 2x2 visibile in Fig.3.15.



Figura 3.15: Confusion Matrix sul test set

In Fig.3.15, le prime due celle in diagonale (colorate in verde) mostrano il numero e la percentuale delle classificazioni corrette dalla rete addestrata. 169 patch sono correttamente classificate come benigne e queste corrispondono al 48,8% di tutte le patch. Allo stesso modo, 167 patch sono classificate correttamente come tumorali e corrispondono al 48,3% di tutte le patch. 4 patch benigne sono erroneamente classificate come tumorali e questo corrisponde allo 1,2% del totale. Analogamente, 6 patch tumorali sono erroneamente classificate come benigne e questo corrisponde all'1,7% di tutti i casi.

Su 175 patch previste benigne il 96,6% è stato identificato correttamente e il 3,4% in modo errato. Su 171 previste maligne il 97,7% è stato identificato correttamente e il 2,3% in modo errato.

Su 173 patch benigne, il 97,7% è correttamente previsto come benigno e il 2,3% come maligno. Su 173 patch maligne, il 96,5% è classificato correttamente come maligno e il 3,5% è classificato come benigno.

Nel complesso il 97,1% delle previsioni sono corrette e il 2,9% sono classificazioni errate. Sono state prese casualmente sei patch dal validation set per valutare la corretta classificazione. In Fig.3.16 vengono raffigurate le immagini ghiandolari.



Figura 3.16: Validazione della rete su sei immagini del test set

Le sei immagini prese in maniera random dal test set sono state correttamente classificate in benigne (0) e tumorali (1). Solo due delle sei sono benigne (0) (la quarta e la sesta da sinistra a destra e da sopra a sotto), mentre le restanti quattro risultano tumorali (1).

### Capitolo 4

### Conclusioni e sviluppi futuri

### 4.1 Conclusioni

In questo progetto di tesi è stato sviluppato un sistema automatico per la caratterizzazione architetturale delle immagini istologiche prostatiche. Il sistema consente l'individuazione delle ghiandole prostatiche e la loro classificazione in tumorali o benigne per l'individuazione del carcinoma prostatico.

Questo progetto si pone come strumento di supporto, aiuto o second opinion per l'esperto patologo nella corretta diagnosi del tumore alla prostata. L'estrazione delle ghiandole consente di individuare la fonte principale da cui hanno origine la maggior parte dei carcinomi. La classe degli adenocarcinomi ha origine dalle cellule ghiandolari che incominciano a crescere in maniera incontrollata. Fornendo dunque al medico un sistema per la corretta individuazione delle ghiandole può diventare un approccio utile per la successiva rivelazione del tumore. Con la grande accuratezza che forniscono i sistemi di *deep learning*, tra cui le reti neurali convoluzionali utilizzate nel progetto di tesi, si è dimostrato che estraendo delle immagini dalle zone ghiandolari è possibile individuare il tumore alla prostata con un'affidabilità del 97,1%. L'innovazione è sopratutto nell'utilizzo di questa nuova frontiera del *deep learning* per la rivelazione del tumore che riesce ad apportare enormi benefici nel campo dell'imaging medico, consentendo di ottenere risultati migliori rispetto ai classici classificatori. La variabilità di immagini tumorali per l'addestramento della rete può facilitare la diagnosi di qualsiasi carcinoma prostatico. Altro aspetto importante del progetto è l'individuazione delle ghiandole prostatiche con un approccio euristico rivelatosi affidabile. Estrarre tutte le regioni ghiandolari all'interno delle immagini istologiche facilita anche il successivo addestramento della rete. L'idea importante risiede nel fatto di non addestrare la rete con tutte le patch della biopsia ma con quelle patch maggiormente significative che consentono la discriminazione di un tessuto tumorale. In questo modo la rete dimostra ottime capacità di generalizzazione.

Questo algoritmo ha portato ottimi risultati sia nell'estrazione delle ghiandole sia nell'addestramento della rete per la rivelazione del tumore. Il sistema è completamente automatico ed il patologo può dare in input una qualsiasi immagine istologica prostatica consentendo la rivelazione delle zone tumorali su cui concentrare l'attenzione in fase di diagnosi.

Quantitativamente i risultati sono ottimi nella segmentazione delle ghiandole prostatiche fornendo performance del 92,7%, e un'accuratezza complessiva del 97,1% nella classificazione. Questa risultati sono una solida base per la successiva fase di miglioramenti e sviluppi che possono essere effettuati.

#### 4.1.1 Sviluppi futuri

Per il momento l'algoritmo è stato testato su 150 immagini istologiche rendendo equa la suddivisione delle immagini contenenti ghiandole sane e tumorali. La rivelazione del tumore risulta affidabile ma al sistema tuttavia possono essere aggiunti miglioramenti che possono rivelarsi importanti nella diagnosi del carcinoma prostatico.

Questo progetto infatti pone le basi per sviluppi futuri e studi dettagliati sulla classificazione delle ghiandole. L'estrazione di ogni singola ghiandola e la classificazione nei due stati benigna o maligna è un primo approccio che ha portato ottimi risultati. Il poter estendere la classificazione in uscita dalla rete nei diversi pattern tumorali è uno sviluppo che può facilitare la diagnosi del carcinoma prostatico, fornendo dettagli al medico anche sulla modalità di cura da effettuare. Questo scopo è raggiungibile ed accessibile nel momento in cui si dispone di un dataset ampio per addestrare la rete a riconoscere i vari pattern tumorali e discriminare tutti i possibili casi di tumore secondo la scala di Gleason. Allo stesso attuale delle cose occorre comunque aumentare le performance della segmentazione, migliorando sopratutto l'estrazione ghiandolare dei pattern tumorali. Questa sarà poi la base di partenza per la futura miglioria nella classificazione del tumore.

## Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il Prof. Filippo Molinari per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi. Ringrazio l'Ing. Massimo Salvi per aver dato un contributo importantissimo con i suoi preziosi consigli. Ringrazio tutto il Biolab per avermi accolto con grande affetto in questa fantastica esperienza.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori e mio fratello per avermi supportato in questo tragitto. Grazie per essere stati sempre vicini in questi anni. Un immenso grazie va a Claudia che ha sempre creduto in me e sostenuto nei momenti più difficili, con tutti voi vorrei condividere questo importante momento.

Ringrazio i miei zii e i miei cugini che da lontano mi hanno dimostrato grande affetto. Un pensiero speciale va anche ai miei nonni e parenti che mi hanno lasciato durante il percorso.

Ringrazio tutti i miei colleghi e amici di Torino che hanno condiviso con me gli anni universitari.

Ringrazio i miei coinquilini, con i quali ho condiviso buona parte del mio percorso e vi ringrazio per il sostegno.

Ringrazio tutti gli amici di sempre, lontani tanti chilometri ma vicini con il cuore.

Un pensiero speciale va a nonna Nina, che mi ha lasciato a metà del percorso, a cui voglio dedicare il traguardo più importante della mia vita.

# Bibliografia

- Picture of prostate. [Online]. Available: https://www.qsstudy.com/medical/ development-and-structure-of-the-prostate
- [2] Zone prostata. [Online]. Available: http://medpoint.altervista.org/la-prostata/
- [3] Picture of ipb. [Online]. Available: https://prostatainforma.com/blog/ prostata-ingrossata/
- [4] Prostata radiologie. [Online]. Available: https://www.radiologie24.ch/ RAD%20DIENSTLEISTUNGEN/3\_RAD%20Fortbildungen/FB%202018/ handouts%202018/MTRA%202018/Abdomen%20II/PPP%20Abdomen%20II/6. %20Prostata%20-radiologie24%20Abd%20II-.pdf
- [5] Tecniche istologiche. [Online]. Available: http://www.wesapiens.org/ class/4933003/file/2/Histological+techniques%3A+How+is+done+to+get+ histological+sections%2C+Embedding+and+sectioning+(diagram+in+spanish)
- [6] F. Vakar-Lopez, "Histopathological evaluation in prostate cancer," in *Principles and Practice of Urooncology*. Springer, 2017, pp. 169–189.
- M. Macenko, M. Niethammer, J. S. Marron, D. Borland, J. T. Woosley, X. Guan,
  C. Schmitt, and N. E. Thomas, "A method for normalizing histology slides for quantitative analysis," in *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2009. ISBI'09. IEEE International Symposium on.* IEEE, 2009, pp. 1107–1110.
- [8] F. Bergeaud and S. Mallat, "Matching pursuit of images," in *Image Processing*, 1995. Proceedings., International Conference on, vol. 1. IEEE, 1995, pp. 53–56.

- [9] K. H. Zou, S. K. Warfield, A. Bharatha, C. M. Tempany, M. R. Kaus, S. J. Haker, W. M. Wells III, F. A. Jolesz, and R. Kikinis, "Statistical validation of image segmentation quality based on a spatial overlap index1: scientific reports," *Academic radiology*, vol. 11, no. 2, pp. 178–189, 2004.
- [10] Convolutional neural networks. [Online]. Available: http://cs231n.github.io/ convolutional-networks/
- [11] Understanding alexnet. [Online]. Available: https://www.learnopencv.com/ understanding-alexnet/
- [12] Transfer learning. [Online]. Available: https://towardsdatascience.com/ transfer-learning-from-pre-trained-models-f2393f124751
- [13] Registri tumori. [Online]. Available: http://www.registri-tumori.it/PDF/ AIOM2016/I\_numeri\_del\_cancro\_2016.pdf
- [14] Prostate. [Online]. Available: https://www.etymonline.com/word/prostate
- [15] M. Sharma, S. Gupta, B. Dhole, and A. Kumar, "The prostate gland," in *Basics of Human Andrology*. Springer, 2017, pp. 17–35.
- [16] A. Christine H.Lee, OluyemiAkin-Olugbade, "Overview of prostate anatomy, histology, and pathology," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 40, pp. 565–575, 2011.
- [17] I. for Quality and E. in Health Care (IQWiG). (2011) How does the prostate work?
  [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072475/
- [18] L. Aaron, O. E. Franco, and S. W. Hayward, "Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia," *Urologic Clinics*, vol. 43, no. 3, pp. 279–288, 2016.
- [19] Ipertrofia prostatica benigna. [Online]. Available: http://www.montallegro.it/ wp-content/uploads/2016/04/Fascicolo\_Prostata\_Puppo1.pdf
- [20] Istologia. [Online]. Available: http://www.treccani.it/enciclopedia/istologia/

- [21] M. N. Gurcan, L. Boucheron, A. Can, A. Madabhushi, N. Rajpoot, and B. Yener, "Histopathological image analysis: A review," *IEEE reviews in biomedical engineering*, vol. 2, p. 147, 2009.
- [22] A. H. Fischer, K. A. Jacobson, J. Rose, and R. Zeller, "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections," *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2008, no. 5, pp. pdb–prot4986, 2008.
- [23] Hematoxylin and eosin stain. [Online]. Available: http://www.uniroma2.it/ didattica/tecnistol/deposito/LEZ.\_2-\_ISTOMORFOLOGICHE.pdf
- [24] Histological techniques. staining artifacts. [Online]. Available: http://www.wesapiens.org/file/4807011/Tecniche%2Bistologiche.
   %2BManufatti%2Bdi%2Bmacchiatura
- [25] J. I. Epstein, W. C. Allsbrook Jr, M. B. Amin, L. L. Egevad, I. G. Committee et al., "The 2005 international society of urological pathology (isup) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma," *The American journal of* surgical pathology, vol. 29, no. 9, pp. 1228–1242, 2005.
- [26] L. Egevad, R. Mazzucchelli, and R. Montironi, "Implications of the international society of urological pathology modified gleason grading system," Archives of pathology & laboratory medicine, vol. 136, no. 4, pp. 426–434, 2012.
- [27] New prostate cancer grading system. [Online]. Available: https://www.prostateconditions.org/about-prostate-conditions/ prostate-cancer/newly-diagnosed/gleason-score
- [28] Aperio scanscope slide scanner. [Online]. Available: https://med.virginia.edu/biomolecular-analysis-facility/services/ shared-instrumentation/aperio-scanscope-slide-scanner/
- [29] Analisi istologica. [Online]. Available: http://didattica.uniroma2.it/assets/uploads/ corsi/148591/DISPENSE.pdf

- [30] A. C. Ruifrok, D. A. Johnston *et al.*, "Quantification of histochemical staining by color deconvolution," *Analytical and quantitative cytology and histology*, vol. 23, no. 4, pp. 291–299, 2001.
- [31] A. Vahadane, T. Peng, A. Sethi, S. Albarqouni, L. Wang, M. Baust, K. Steiger, A. M. Schlitter, I. Esposito, and N. Navab, "Structure-preserving color normalization and sparse stain separation for histological images," *IEEE transactions on medical imaging*, vol. 35, no. 8, pp. 1962–1971, 2016.
- [32] T. F. Chan, B. Y. Sandberg, and L. A. Vese, "Active contours without edges for vector-valued images," *Journal of Visual Communication and Image Representation*, vol. 11, no. 2, pp. 130–141, 2000.
- [33] Metrics to evaluate your machine learning algorithm. [Online]. Available: https://towardsdatascience.com/ metrics-to-evaluate-your-machine-learning-algorithm-f10ba6e38234
- [34] D. Steinkraus, I. Buck, and P. Simard, "Using gpus for machine learning algorithms," in *Eighth International Conference on Document Analysis and Recognition* (ICDAR'05). IEEE, 2005, pp. 1115–1120.
- [35] W. Rawat and Z. Wang, "Deep convolutional neural networks for image classification: A comprehensive review," *Neural computation*, vol. 29, no. 9, pp. 2352–2449, 2017.
- [36] L. Torrey and J. Shavlik, "Transfer learning," in Handbook of Research on Machine Learning Applications and Trends: Algorithms, Methods, and Techniques. IGI Global, 2010, pp. 242–264.
- [37] Y. Yao, L. Rosasco, and A. Caponnetto, "On early stopping in gradient descent learning," *Constructive Approximation*, vol. 26, no. 2, pp. 289–315, 2007.