

ПІЩУН ОЛЕГ

Західноукраїнський національний університет

<https://orcid.org/0000-0003-0280-8786>e-mail: o.pitsun@wunu.edu.ua

БЕРЕЗЬКИЙ МИКОЛА

Західноукраїнський національний університет

<https://orcid.org/0000-0001-6507-9117>e-mail: m.berezkyi@wunu.edu.ua

ПОВОРОЗНИК ВІТАЛІЙ

Західноукраїнський національний університет

<https://orcid.org/0009-0006-5325-1585>e-mail: asp21_povoroznyk_vs@mm.com

МЕЛЬНИК ГРИГОРІЙ

Західноукраїнський національний університет

<https://orcid.org/0000-0003-0646-7448>e-mail: mgm@wunu.edu.ua

МЕТОД АВТОМАТИЧНОЇ СЕГМЕНТАЦІЇ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ЗОБРАЖЕНЬ

У цифровій патології виявлення та класифікація клітин часто є передумовами для кількісного визначення клітин і дослідження неоднорідності тканин. Розділення та маркування кожного ядра клітини є ключовим завданням у сегментації біомедичних зображень. Використання одного підходу для усіх біомедичних зображень є недостатнім, тому необхідно розробити метод з урахуванням вхідних параметрів зображення. Імуногістохімія (ІНС) є основною технологією, яка використовується для оцінки кількості біомаркерів на рівні білків у зразках тканин. У онкологічній клінічній діагностиці та дослідженнях аналізу імуногістохімічні зображення відіграють центральну роль у характеристиці пухлини та оцінці біомаркерів. Попередній діагноз зазвичай формується на основі візуального мікроскопічного дослідження експертом. Задачі опрацювання імуногістохімічних зображень є особливо складними для мультиплексних імуногістохімічних зображень через високий рівень варіабельності фарбування, інтенсивності та пошкоджень в результаті попереднього оброблення. Ручна оцінка забарвлених за допомогою біомаркера Her2/neu мікроскопічних зображень характеризується наявністю помилок, великою трудомісткістю у зв'язку із різноманітним фарбуванням, перекриваючими ділянками та неоднорідними параметрами предметного скла.

У даній роботі метод автоматичного підбору алгоритмів сегментації імуногістохімічних зображень на прикладі імуногістохімічних зображень. Враховуючи необхідність у адаптивному підборі параметрів сегментації, розроблений метод дозволяє підбирати алгоритми сегментації та їх вхідні параметри на основі вхідних параметрів зображення, таких як середній рівень яскравості, середній рівень каналів RGB зображення. Також у даній роботі окрім базових алгоритмів сегментації, таких як *k-means*, водорозподілу, порогової сегментації, використовується підхід глибокого машинного навчання на основі архітектури *U-net*. Встановлено, що для обробки зображень з великою кількістю мікрооб'єктів кращі результати показала сегментація засобами *U-net*, а для об'єктів з малою кількістю мікрооб'єктів найкращі результати демонструє сукупність алгоритмів водорозподілу у поєднанні із пороговою сегментацією зі значеннями від 65 до 90.

Ключові слова: імуногістохімічні зображення, біомаркер Her2/neu, сегментація, алгоритм, метод.

PITSUN OLEH, BEREZKY MYKOLA, POVOROZNYK VITALIY, MELNYK GRIGORY
West Ukrainian National University

METHOD OF IMMUNOHISTOCHEMICAL IMAGES AUTOMATIC SEGMENTATION

In digital pathology, cell detection and classification are often prerequisites for quantifying cell numbers and investigating tissue heterogeneity. Separation and labeling of each cell nucleus is a key task in biomedical image segmentation. Using one approach for all biomedical images is not enough, so it is necessary to develop a universal approach taking into account the input parameters of the image. Immunohistochemistry (IHC) is the primary technology used to quantify the amount of biomarkers at the protein level in tissue samples. In oncological clinical diagnosis and research, immunohistochemical imaging analyzes play a central role in tumor characterization and biomarker assessment. A preliminary diagnosis is usually formed on the basis of a visual microscopic examination by an expert. Immunohistochemistry image processing tasks are particularly challenging for multiplex immunohistochemistry images due to the high level of variability in staining, intensity, and damage resulting from preprocessing. Manual evaluation of HER2-stained microscopic images is characterized by the presence of errors, high labor intensity due to various staining, overlapping areas, and heterogeneous slide parameters.

In this work, an approach to the implementation of the mechanism of automatic selection of immunohistochemical image segmentation algorithms is proposed using the example of Her2/neu type images. Considering the need for adaptive selection of segmentation parameters, the proposed approach allows selection of segmentation algorithms and their input parameters based on input image parameters, such as average brightness level, average level of RGB image channels. Also, in this work, in addition to basic segmentation algorithms, such as *k-means*, water distribution. Threshold segmentation uses a deep machine learning approach based on the *U-net* architecture. It was found that for processing an image with a large number of micro-objects, the best results were shown by segmentation using *U-net*, and for objects with a small number of micro-objects, the best result is shown by a combination of water distribution algorithms in combination with threshold segmentation with values from 65 to 90.

Keywords: immunohistochemical images, Her2/neu, segmentation.

Постановка проблеми

Імуногістохімія – це аналітичний метод визначення підтипів раку на основі реакції гістохімічних зрізів на біомаркери та отримання кольорової реакції, яка видима за допомогою світлової мікроскопії. Ці

зображення, які отримані від світлового мікроскопа зафарбованих гістологічних зрізів, назвемо імуногістологічними зображеннями.

Імуногістохімічні зображення характеризуються високою складністю обчислення кількісних характеристик мікрооб'єктів. Тому, виникає необхідність у розробці алгоритмів і програмних засобів для автоматичного адаптивного підбору параметрів сегментації для конкретних зображень. Ручний режим сегментації зображень є трудомістким та потребує спеціалізованих знань в комп'ютерному зорі.

Об'єкт досліджень – процес аналізу імуногістохімічних зображень.

Предмет досліджень – алгоритми сегментації зображень.

Мета досліджень: дослідження алгоритмів автоматичної сегментації зображень і розробка методу сегментації зображень для забезпечення мінімальної похибки сегментації.

Для досягнення мети необхідно виконати такі задачі:

- дослідити існуючі алгоритми автоматичної сегментації зображень;
- розробити метод та архітектуру програмного модулю для автоматичного підбору параметрів сегментації в залежності від характеристик вхідного зображення;
- провести комп'ютерні експерименти;
- проаналізувати результати досліджень.

Аналіз літературних джерел

Проаналізуємо публікації, які пов'язані з об'єктом та предметом дослідження.

Аналіз біомедичних зображень раку молочної залози відображений в монографії [1]. На основі біомаркерів естрогену, прогестерону, та онкопротеїну HER-2/neu, а також визначення рівня проліферації клітин пухлини за допомогою Ki-67 визначають молекулярно-генетичний підтип пухлини. Існує чотири основних молекулярно-генетичних підтипи рака грудної залози: люмінальний А, люмінальний В, HER-2/neu-ампліфікований, базальноподібний. У даній роботі розглядаються зображення, які отримані від реакції біомаркера HER-2/neu на гістологічні зрізи для діагностування підтипів раку молочної залози.

Julie M. Jorns у роботі [2] аналізують основні підходи до діагностування раку молочної залози та звертають особливу увагу на біомаркер Her2/neu. Також автори наводять візуальний порівняльний аналіз імуногістохімічних зображень з різним ступенем забарвлення біомаркером Her2/neu.

Запропонована система глибокого навчання для автоматичного виявлення та оцінки експресії Her2/neu для раку молочної залози, запропонована у роботі [3], отримала обнадійливі результати. Розроблений фреймворк планується використовувати у прогностичній програмі для отримання клінічно значущих результатів.

У роботі [4] автори аналізують значущість використання досліджень Her2/neu в процесі діагностування раку.

У роботі [5] авторами розроблено програмний комплекс DeepLIIF, що є багатозадачною структурою глибокого навчання. Метою програмного комплексу є автоматична сегментація та обчислення кількісних характеристик імуногістохімічних зображень. Авторами використовують показники точності на рівні пікселів для первинної оцінки імуногістохімічних зображень на етапі сегментації/класифікації екземплярів клітин. Результати у роботі [6] підкреслюють переваги підходів на основі аналізу цифрових зображень, які пропонують об'єктивну, відтворювану та високомасштабовану стратегію для кількісного аналізу імуногістохімічних зображень. У статті [7] у якій автори представляють схему клітинної сегментації та ансамблевої класифікації на основі глибокого навчання для кількісної оцінки гормонального статусу, а саме естрогену або прогестерону, на зразку зображення. Запропонований підхід показав кращі результати у порівнянні з іншими. Оптимізація процесу опрацювання біомедичних зображень на основі багатошарового перцептронну, радіально-базисних функцій, засобів машинного навчання представлено у роботі [8]. Додатково автори використовують алгоритми інтелектуального аналізу даних для отримання додаткової інформації із вхідного набору даних. У роботі [9] авторами запропоновано метод глибокого навчання для виявлення та класифікації клітин на слайдах імуногістохімічних зображень для діагностування раку молочної залози. Авторами досягли точності класифікації 96.5%. В якості альтернативного підходу було розглянуто U-net підхід. У роботі [10] авторами описано техніку мультиплексного імуногістохімічного дослідження, фарбування для послідовних маркерів на одному предметному склі, яка використовує подібні етапи та подібні реагенти, що й стандартна імуногістохімія, та дає змогу будь-якій лабораторії зі стандартними можливостями виконувати цю процедуру.

У роботі [11] запропонована методика, яка складається з трьох етапів. На першому кроці використовується класифікатор навчання методом опорних векторів (SVM) на основі суперпікселів для класифікації епітеліальних і стромальних областей. На другому етапі, на класифікованих ділянках епітелію використано метод сегментації на основі згорткової нейронної мережі (CNN), який застосовується до ділянок сегментної мембрани. Нарешті, розділені набори зразків об'єднуються, і оцінюється загальний показник кожного слайда.

У роботі [12] автори оцінюють та порівнюють ефективність сегментації кількох архітектур глибокого навчання (U-Net, U-Net ResNet, Cellpose, Mask R-CNN, сегментація екземплярів KG) і двох звичайних алгоритмів (ітераційний вододіл, графі) на складних флуоресцентних ядерних зображеннях різних типів. Акцент робиться на використанні U-Net архітектури. Додатково автори пропонують нову стратегію створення штучних зображень для розширення навчального набору. У роботах [13-16] авторами представлено приклади

використання U-net архітектури для сегментації зображень. У роботах [11-20] наведено результати досліджень в задачах автоматичної сегментації імуногістохімічних зображень.

Метою роботи є: розробка методу та програмного засобу автоматичного вибору алгоритмів сегментації зображень на основі похибки сегментації.

Основний матеріал

Автоматизація процесів опрацювання медичних зображень має велике значення в сучасній медицині і може відігравати ключову роль у покращенні діагностики, лікуванні та управлінні медичними даними. Імуногістохімічні зображення дозволяють візуалізувати присутність конкретних біомаркерів або вираження білків у тканинах та клітинах. Використання імуногістохімічних зображень дозволяє отримувати детальну інформацію про місце концентрації біомаркерів. Це дозволяє покращити якість діагностування та подальшого лікування пацієнтів. Перевагами автоматизації є:

- швидкість;
- ефективність;
- точність;
- надійність;
- розширення можливостей досліджень;
- зменшення ризику людських помилок;
- вдосконалення управління медичними даними.

Аналіз наукової літератури показав, що задачам аналізу біомедичних зображень приділяють велику увагу представники наукової спільноти. Процес опрацювання біомедичних зображень дозволяє аналізувати та інтерпретувати великий обсяг даних, отриманих із зображень. Надалі такі дані дозволять більш якісніше аналізувати патології, вивчати характеристики ядер клітин на зображенні. Використання сучасних підходів опрацювання зображень, зокрема елементів штучного інтелекту, дозволяє покращити якість діагностування, зменшити час аналізу та уникнути суб'єктивних факторів при аналізі біомедичних зображень.

Автоматизація процесів аналізу зображень використовує ефективні алгоритми попереднього оброблення та сегментації зображень. Автоматизація дозволяє пришвидшити процес обробки, зменшити вплив людського фактору, покращити репрезентативність результатів та забезпечити стабільність процесу.

Метод автоматичного вибору параметрів сегментації зображень складається з таких кроків:

1. Визначення вхідних параметрів імуногістохімічного зображення:
 - середній рівень яскравості;
 - середній рівень червоного каналу;
 - середній рівень зеленого каналу;
 - середній рівень синього каналу;
2. Сегментація такими алгоритмами:
 - водорозподілу (на основі маркерів);
 - k-середніх (KMEANS_RANDOM_CENTERS, KMEANS_PP_CENTERS, KMEANS_USE_INITIAL_LABELS);
 - порогова (значення порогів 40 -165 з кроком 5).
3. Сегментація засобами глибокого машинного навчання (U-net).
4. Оцінка результатів. Крайній результат зберігається у базу даних. Також формується зв'язок між алгоритмами сегментації / нейронною мережею, параметрами та вхідними параметрами. Надалі такий підхід допоможе будувати правила підбору параметрів сегментації в залежності від вхідного зображення.

У даному випадку використано найкращі алгоритми сегментації k – середніх та водорозподілу у поєднанні із пороговою сегментацією.

Графічне представлення методу автоматичного вибору алгоритмів сегментації наведено на рисунку 1.

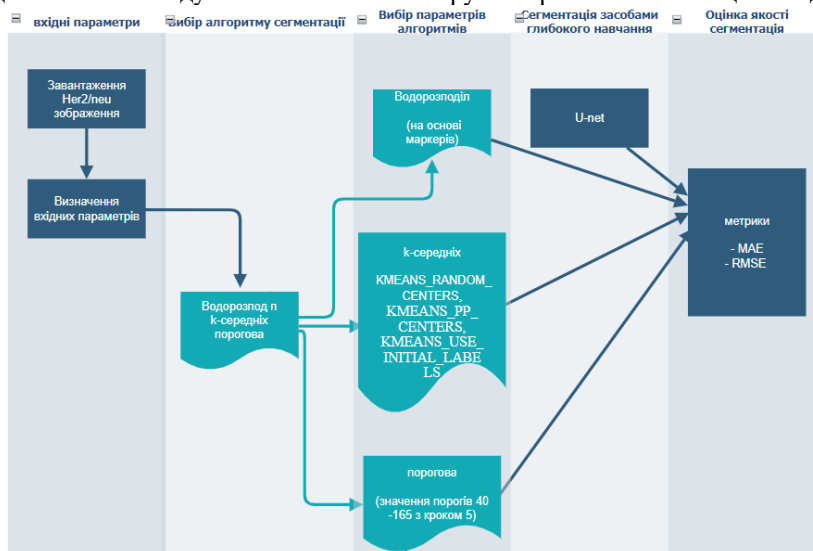


Рис. 1. Графічне представлення методу автоматичного підбору алгоритмів сегментації

Розроблений метод включає в себе використання алгоритмічного підходу та підбору параметрів, використання підходу глибокого навчання, зокрема згорткових нейронних мереж у формі архітектури U-net.

Оцінка якості сегментації обчислюється метриками в залежності від вибору користувача. Метрики подібності використовуються для кількісної оцінки ступеня подібності між двома зображеннями. Вибір конкретної метрики залежить від завдання та вимог конкретної задачі. Наприклад, для деяких застосувань важливо враховувати локальні особливості, тоді як для інших - глобальні характеристики.

Для оцінки ступеня подібності між двома зображеннями у даній роботі використано метрику RMSE та метрику MAE.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n_x n_y} * \sum_0^{n_x-1} \sum_0^{n_y-1} [r(x, y) - t(x, y)]^2}$$

$$MAE = \frac{1}{n_x n_y} * \sum_0^{n_x-1} \sum_0^{n_y-1} |r(x, y) - t(x, y)|$$

, де $n_x n_y$ – розмір зображення, x, y – координати пікселя.

Комп'ютерні експерименти

Для проведення комп'ютерних експериментів авторами розроблена база даних імуногістохімічних зображень [21].

Оригінальне зображення наведено у таблиці 1.

З метою визначення кращої комбінації алгоритмів сегментації, та їх параметрів розроблено програмний модуль для тестування комбінацій алгоритмів.

Програмний модуль складається з таких модулів:

- модуль визначення вхідних параметрів зображення;
- модуль автоматичної сегментації на основі алгоритмів;
- модуль підбору параметрів алгоритмів сегментації;
- модуль оцінки якості сегментації.

Програмний модуль автоматичної сегментації на основі використання згорткових нейронних мереж типу U-net складається з таких підмодулів:

- підмодуль завантаження зображень;
- підмодуль виділення оригінальних зображень та зображень – масок;
- підмодуль формування архітектури U-net мережі;
- підмодуль підбору гіперпараметрів навчання;
- підмодуль виводу результату.

Експеримент 1

Параметри вхідного зображення наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Параметри вхідного зображення

Зображення	Середній рівень гистограми	Значення червоного каналу	Значення зеленого каналу	Значення синього каналу
	35	136	141	118


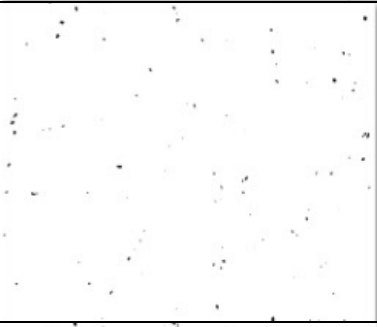
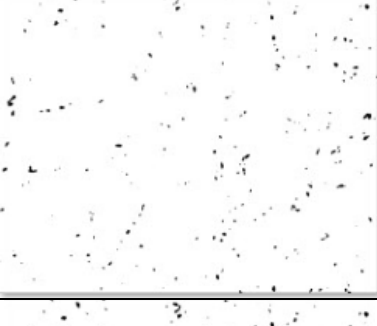
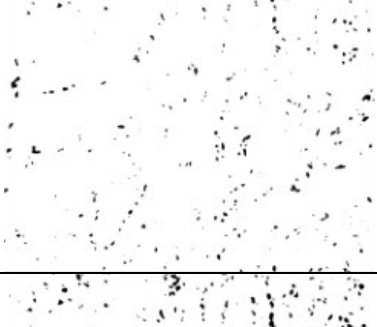
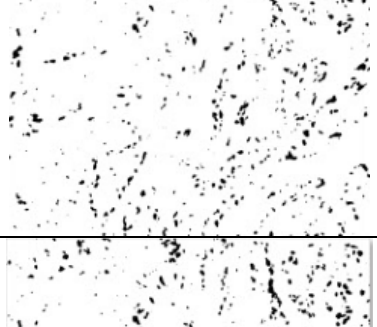

Гістограма відображає інформацію про кількість пікселів певної інтенсивності та кольору. Середній рівень гистограми є середньою інтенсивністю або середнім значенням яскравості всіх пікселів на зображенні. Середній рівень гистограми дає загальний показник того, наскільки світле або темне зображення в середньому.

Гістограма зображення може бути розглянута окремо для кожного кольорового каналу у зображеннях у форматі RGB (червоний, зелений, синій). Кожен канал представляється власною гістограмою інтенсивності, і у кожній гістограмі можна визначити середній рівень.

Результати роботи наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Тестування алгоритмів сегментації

Автоматично просегментоване зображення		Значення порогу
		65
		75
		85
		90
		100
		105

Результати порівняння просегментованих зображень за параметром порогу наведено у таблиці 5. Отже, поріг у діапазоні 75-90 є найбільш оптимальним, оскільки зі збільшенням порогу – відображається більша площа неінформативних областей, що спотворює дані.

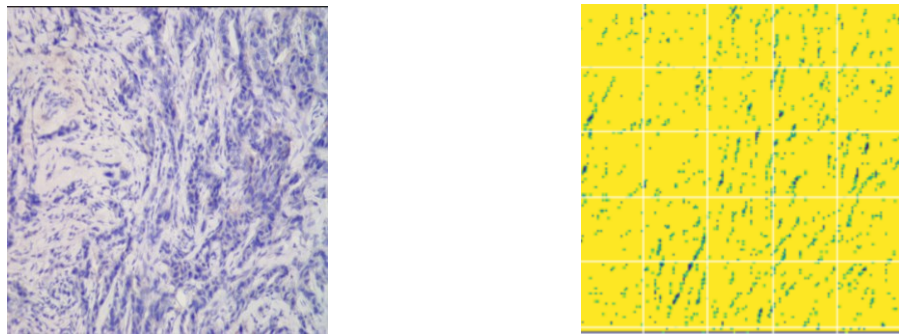


Рис. 2 Результат використання технології U-net

Використання мережу U-net для даного зображення показало кращі результати, ніж алгоритмічний підхід.

Таблиця 3

Результати порівняння просегментованих зображень за параметром порогу

Підхід до сегментації	RMSE	MAE
Watershed + Нижній поріг сегментації 65	22,7	2,02
Watershed + Нижній поріг сегментації 75	19,48	1,49
Watershed + Нижній поріг сегментації 85	14,25	0,8
Watershed + Нижній поріг сегментації 90	21,23	1,78
Watershed + Нижній поріг сегментації 100	45,89	8,28
Watershed + Нижній поріг сегментації 105	57,22	12,88
U-Net	10,65	0.44

Експеримент 2

Приклад зображення (експеримент 2) представлено на рисунку 3 (а). Приклад експертного зображення наведено на рисунку 3 (б).

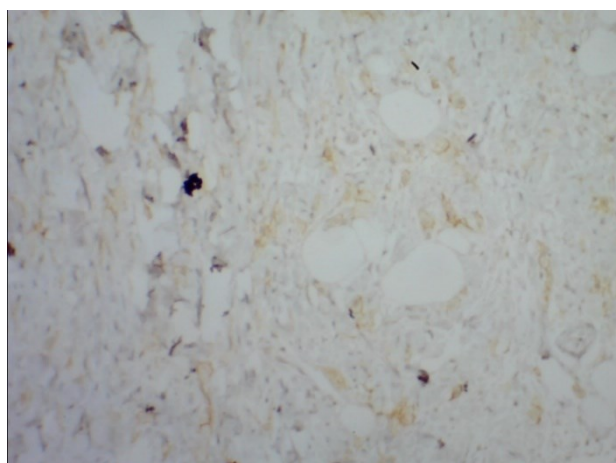
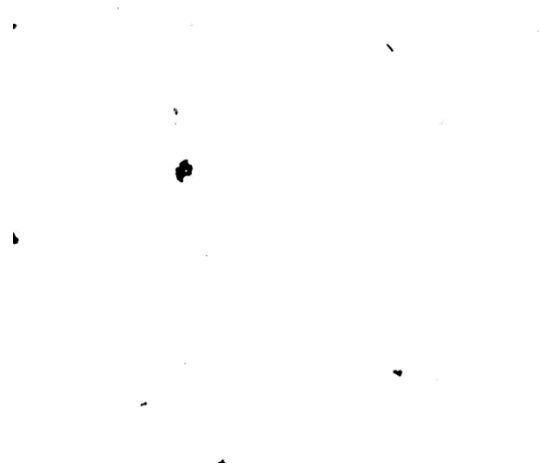


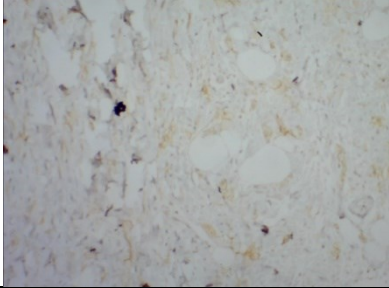
Рис. 3. а) приклад зображення (експеримент 2)



б) Зображення, просегментоване людиною




Параметри вхідного зображення наведено у таблиці 3.

Таблиця 4

Зображення	Параметри вхідного зображення			
	Середній рівень гистограми	Значення червоного каналу	Значення зеленого каналу	Значення синього каналу
	225	168	171	170

Результати тестування алгоритмів сегментації наведено у таблиці 5.

Таблиця 5

Тестування алгоритмів сегментації			Значення порогу
Автоматично просегментоване зображення			
			65
			90
			100

Приклад автоматичної сегментації U-net мережею наведено на рисунку 4.

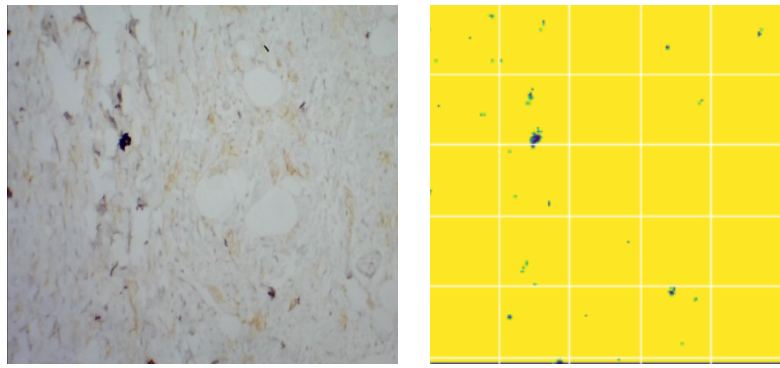


Рис. 4 Приклад сегментації імуногістохімічного зображення U-net мережею

Архітектуру U-net мережі [20] наведено на рисунку 4. Мережа складається із двох частин: звуження та розширення. Даний підхід дозволяє використовувати меншу кількість зображень на етапі навчання. Принцип роботи мережі полягає у почерговому застосуванні шарів згортки (ядро 3x3 пікселі) – функцією активації ReLU та операції максупулінгу (ядро 2x2 пікселі). Операція звуження характеризується зменшенням просторової інформації та збільшенням інформації про ознаки. В процесі розширення мережі за допомогою згорток поєднується просторова інформація та інформація про ознаки. У даному дослідженні використовувалась базова структура U-net мережі, зображена на рисунку 5. На вхід надано зображення розміром 572 на 572 пікселі.

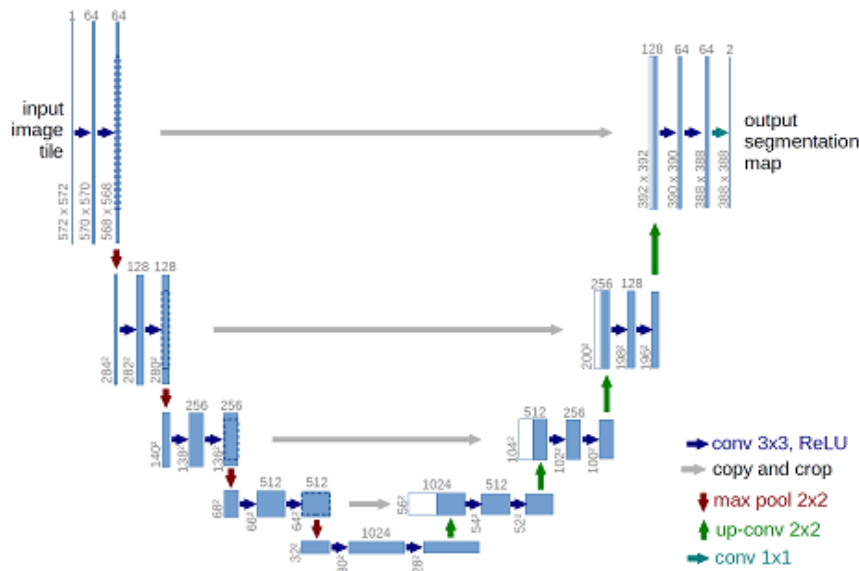


Рис. 5. Архітектура u-net мережі

Результати роботи

Результати порівняння просегментованих зображень за параметром порогу наведено у таблиці 6.

Таблиця 6

Результати порівняння просегментованих зображень за параметром порогу

Підхід до сегментації	RMSE	MAE
Watershed + Нижній поріг сегментації 65	12,19	0,58
Watershed + Нижній поріг сегментації 80	14,08	0,78
Watershed + Нижній поріг сегментації 85	15,21	0,91
Watershed + Нижній поріг сегментації 90	16,46	1,07
Watershed + Нижній поріг сегментації 100	20,55	1,66
Watershed + Нижній поріг сегментації 105	23,19	1,83
U-Net	13,07	0.78

Висновки

За результатами наукового дослідження можна зробити такі висновки:

- проведено аналіз сучасних підходів до оцінки якості сегментації біомедичних зображень, що дозволило виділити множину алгоритмів та обґрунтувати підхід з використанням глибокого машинного навчання;
- розроблено метод автоматичного підбору алгоритмів і параметрів сегментації в залежності від вхідних параметрів зображення. Даний метод використовує класичний алгоритмічний підхід і підхід на основі глибокого машинного навчання для задач сегментації. Розроблений метод можна використовувати для усіх типів зображень;
- проведено комп'ютерні експерименти з використанням імуногістохімічних зображень на основі алгоритмів сегментації зображень та U-net мереж, що дозволило визначити комбінацію алгоритмів для різних типів зображень. Встановлено, що для обробки зображень з великою кількістю мікрооб'єктів кращі результати показала сегментація засобами U-net, а для об'єктів з малою кількістю мікрооб'єктів найкращі результати демонструє поєднання алгоритмів водорозподілу у поєднанні із пороговою сегментацією зі значеннями від 65 до 90.

Література

1. Методи, алгоритми та програмні засоби опрацювання біомедичних зображень / Березький О. М., Батько Ю.М., Березька К.М., Вербовий С.О., Дацко Т.В., Дубчак Л.О., Ігнатев І.В., Мельник Г.М., Николук В.Д., Піцун О.Й. – Тернопіль: Економічна думка, ТНЕУ, 2017. – 330 с.
2. Jorns, Julie M. "Breast cancer biomarkers: challenges in routine estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2/neu evaluation." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 143, no. 12 (2019): 1444-1449.
3. Kabir, Saidul, Semir Vranic, Rafif Mahmood Al Saady, Muhammad Salman Khan, Rusab Sarmun, Abdulrahman Alqahtani, Tariq O. Abbas, and Muhammad EH Chowdhury. "The utility of a deep learning-based approach in Her-2/neu assessment in breast cancer." *Expert Systems with Applications* (2023): 122051.
4. Yan, F., Rinn, K. J., Kullnat, J. A., Wu, A. Y., Ennett, M. D., Scott, E. L., & Kaplan, H. G. (2022). Response of Leptomeningeal Metastasis of Breast Cancer With a HER2/neu Activating Variant to Tucatinib: A Case Report. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 20(7), 745-752. Retrieved Oct 30, 2023, from <https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.7006>
5. Ghahremani P, Li Y, Kaufman A, Vanguri R, Greenwald N, Angelo M, Hollmann TJ, Nadeem S. Deep Learning-Inferred Multiplex ImmunoFluorescence for Immunohistochemical Image Quantification. *Nat Mach Intell.* 2022 Apr;4(4):401-412. doi: 10.1038/s42256-022-00471-x. Epub 2022 Apr 7. PMID: 36118303; PMCID: PMC9477216.
6. Ram S, Vizcarra P, Whalen P, Deng S, Painter CL, Jackson-Fisher A, et al. (2021) Pixelwise H-score: A novel digital image analysis-based metric to quantify membrane biomarker expression from immunohistochemistry images. *PLoS ONE* 16(9): e0245638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245638>
7. Lipi B. Mahanta, Elima Hussain, Navarun Das, Lopamudra Kakoti, Manish Chowdhury IHC-Net: A fully convolutional neural network for automated nuclear segmentation and ensemble classification for Allred scoring in breast pathology, *Applied Soft Computing*, Volume 103,2021, 107136, ISSN 1568-4946, <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2021.107136>.
8. Carreras, Joaquim, Yara Yukie Kikuti, Masashi Miyaoka, Shinichiro Hiraiwa, Sakura Tomita, Haruka Ikoma, Yusuke Kondo, Atsushi Ito, Naoya Nakamura, and Rifat Hamoudi. 2021. "A Combination of Multilayer Perceptron, Radial Basis Function Artificial Neural Networks and Machine Learning Image Segmentation for the Dimension Reduction and the Prognosis Assessment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma" *AI 2*, no. 1: 106-134. <https://doi.org/10.3390/ai2010008>
9. Hagos, Yeman Brhane, Priya Lakshmi Narayanan, Ayse U. Akarca, Teresa Marafioti, and Yinyin Yuan. "ConCORDe-Net: cell count regularized convolutional neural network for cell detection in multiplex immunohistochemistry images." In *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention–MICCAI 2019: 22nd International Conference, Shenzhen, China, October 13–17, 2019, Proceedings, Part I 22*, pp. 667-675. Springer International Publishing, 2019.
10. Akturk G, Sweeney R, Remark R, Merad M, Gnjjatic S. Multiplexed Immunohistochemical Consecutive Staining on Single Slide (MICSSS): Multiplexed Chromogenic IHC Assay for High-Dimensional Tissue Analysis. *Methods Mol Biol.* 2020;2055:497-519. doi: 10.1007/978-1-4939-9773-2_23. PMID: 31502167; PMCID: PMC7869027.
11. Fariba Damband Khameneh, Salar Razavi, Mustafa Kamasak, Automated segmentation of cell membranes to evaluate HER2 status in whole slide images using a modified deep learning network, *Computers in Biology and Medicine*, Volume 110, 2019, Pages 164-174, ISSN 0010-4825, <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2019.05.020>.
12. F. Kromp et al., "Evaluation of Deep Learning Architectures for Complex Immunofluorescence Nuclear Image Segmentation," in *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 40, no. 7, pp. 1934-1949, July 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3069558.

13. Lu, Haoran, Yifei She, Jun Tie, and Shengzhou Xu. "Half-UNet: A simplified U-Net architecture for medical image segmentation." *Frontiers in Neuroinformatics* 16 (2022): 911679.
14. Huang, Huimin, Lanfen Lin, Ruofeng Tong, Hongjie Hu, Qiaowei Zhang, Yutaro Iwamoto, Xianhua Han, Yen-Wei Chen, and Jian Wu. "Unet 3+: A full-scale connected unet for medical image segmentation." In *ICASSP 2020-2020 IEEE international conference on acoustics, speech and signal processing (ICASSP)*, pp. 1055-1059. IEEE, 2020.
15. Lou, Ange, Shuyue Guan, and Murray Loew. "DC-UNet: rethinking the U-Net architecture with dual channel efficient CNN for medical image segmentation." In *Medical Imaging 2021: Image Processing*, vol. 11596, pp. 758-768. SPIE, 2021.
16. Cao, Hu, Yueyue Wang, Joy Chen, Dongsheng Jiang, Xiaopeng Zhang, Qi Tian, and Manning Wang. "Swin-unet: Unet-like pure transformer for medical image segmentation." In *European conference on computer vision*, pp. 205-218. Cham: Springer Nature Switzerland, 2022.
17. Піцун О. Мікросервісна архітектура системи опрацювання імуногістохімічних зображень / Піцун Олег, Пришляк Катерина, Каліновський Роман, Поворозник Віталій// Вісник Хмельницького національного університету, №3, 2023 (321) – С.166 -174 <https://www.doi.org/10.31891/2307-5732-2023-321-3-166-174>
18. O. Yo. Pitsun MULTI-THREAD PARALLELIZING OF CELL CHARACTERISTICS OF BIOMEDICAL IMAGES UJIT. 2022; Volume 4, Number 2 : 40-44 <https://doi.org/10.23939/ujit2022.02.040>
19. Oleh Berezsky, Oleh Pitsun, Bohdan Derysh, Tamara Datsko, Kateryna Berezka, Nadiya Savka. Automatic Segmentation of Immunohistochemical Images based on U-NET Architectures. *Proceedings of the 4th International Conference on Informatics & Data-Driven Medicine*, Valencia, Spain, November 19 - 21, 2021. P.
20. База даних «База даних цифрових імуногістохімічних зображень раку молочної залози «IHCDBI». :авторське свідоцтво 118979 / Березький О. М., Мельник Г. М., Піцун О. Й., Дацко Т. В., Кліш І. М., Дериш Б. Б. Зареєстровано 10.05.2023. Опубл. 31.07.2023, Бюл. № 76.
21. Salpea, N., Tzouveli, P., Kollias, D. (2023). Medical Image Segmentation: A Review of Modern Architectures. In: Karlinsky, L., Michaeli, T., Nishino, K. (eds) *Computer Vision – ECCV 2022 Workshops. ECCV 2022. Lecture Notes in Computer Science*, vol 13807. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-25082-8_47

References

1. Jorns, Julie M. "Breast cancer biomarkers: challenges in routine estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2/neu evaluation." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 143, no. 12 (2019): 1444-1449.
2. Kabir, Saidul, Semir Vranic, Rafif Mahmood Al Saady, Muhammad Salman Khan, Rusab Sarmun, Abdulrahman Alqahtani, Tariq O. Abbas, and Muhammad EH Chowdhury. "The utility of a deep learning-based approach in Her-2/neu assessment in breast cancer." *Expert Systems with Applications* (2023): 122051.
3. Yan, F., Rinn, K. J., Kullnat, J. A., Wu, A. Y., Ennett, M. D., Scott, E. L., & Kaplan, H. G. (2022). Response of Leptomeningeal Metastasis of Breast Cancer With a HER2/neu Activating Variant to Tucatinib: A Case Report. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 20(7), 745-752. Retrieved Oct 30, 2023, from <https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.7006>
4. Ghahremani P, Li Y, Kaufman A, Vanguri R, Greenwald N, Angelo M, Hollmann TJ, Nadeem S. Deep Learning-Inferred Multiplex ImmunoFluorescence for Immunohistochemical Image Quantification. *Nat Mach Intell*. 2022 Apr;4(4):401-412. doi: 10.1038/s42256-022-00471-x. Epub 2022 Apr 7. PMID: 36118303; PMCID: PMC9477216.
5. Ram S, Vizcarra P, Whalen P, Deng S, Painter CL, Jackson-Fisher A, et al. (2021) Pixelwise H-score: A novel digital image analysis-based metric to quantify membrane biomarker expression from immunohistochemistry images. *PLoS ONE* 16(9): e0245638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245638>
6. Lipi B, Mahanta, Elima Hussain, Navarun Das, Lopamudra Kakoti, Manish Chowdhury IHC-Net: A fully convolutional neural network for automated nuclear segmentation and ensemble classification for Allred scoring in breast pathology, *Applied Soft Computing*, Volume 103, 2021, 107136, ISSN 1568-4946, <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2021.107136>.
7. Carreras, Joaquim, Yara Yukie Kikuti, Masashi Miyaoka, Shinichiro Hiraiwa, Sakura Tomita, Haruka Ikoma, Yusuke Kondo, Atsushi Ito, Naoya Nakamura, and Rifat Hamoudi. 2021. "A Combination of Multilayer Perceptron, Radial Basis Function Artificial Neural Networks and Machine Learning Image Segmentation for the Dimension Reduction and the Prognosis Assessment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma" *AI 2*, no. 1: 106-134. <https://doi.org/10.3390/ai2010008>
8. Hagos, Yeman Brhane, Priya Lakshmi Narayanan, Ayse U. Akarca, Teresa Marafioti, and Yinyin Yuan. "ConCORDe-Net: cell count regularized convolutional neural network for cell detection in multiplex immunohistochemistry images." In *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention–MICCAI 2019: 22nd International Conference, Shenzhen, China, October 13–17, 2019, Proceedings, Part I 22*, pp. 667-675. Springer International Publishing, 2019.
9. Akturk G, Sweeney R, Remark R, Merad M, Gnjjatic S. Multiplexed Immunohistochemical Consecutive Staining on Single Slide (MICSSS): Multiplexed Chromogenic IHC Assay for High-Dimensional Tissue Analysis. *Methods Mol Biol*. 2020;2055:497-519. doi: 10.1007/978-1-4939-9773-2_23. PMID: 31502167; PMCID: PMC7869027.
10. Fariba Damband Khameneh, Salar Razavi, Mustafa Kamasak, Automated segmentation of cell membranes to evaluate HER2 status in whole slide images using a modified deep learning network, *Computers in Biology and Medicine*, Volume 110, 2019, Pages 164-174, ISSN 0010-4825, <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2019.05.020>.
11. F. Kromp et al., "Evaluation of Deep Learning Architectures for Complex Immunofluorescence Nuclear Image Segmentation," in *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 40, no. 7, pp. 1934-1949, July 2021, doi: 10.1109/TMI.2021.3069558.
12. Lu, Haoran, Yifei She, Jun Tie, and Shengzhou Xu. "Half-UNet: A simplified U-Net architecture for medical image segmentation." *Frontiers in Neuroinformatics* 16 (2022): 911679.
13. Huang, Huimin, Lanfen Lin, Ruofeng Tong, Hongjie Hu, Qiaowei Zhang, Yutaro Iwamoto, Xianhua Han, Yen-Wei Chen, and Jian Wu. "Unet 3+: A full-scale connected unet for medical image segmentation." In *ICASSP 2020-2020 IEEE international conference on acoustics, speech and signal processing (ICASSP)*, pp. 1055-1059. IEEE, 2020.
14. Lou, Ange, Shuyue Guan, and Murray Loew. "DC-UNet: rethinking the U-Net architecture with dual channel efficient CNN for medical image segmentation." In *Medical Imaging 2021: Image Processing*, vol. 11596, pp. 758-768. SPIE, 2021.
15. Cao, Hu, Yueyue Wang, Joy Chen, Dongsheng Jiang, Xiaopeng Zhang, Qi Tian, and Manning Wang. "Swin-unet: Unet-like pure transformer for medical image segmentation." In *European conference on computer vision*, pp. 205-218. Cham: Springer Nature Switzerland, 2022.

16. Pitsun O. Mikroservisna arhitektura sy'stemy` opracyuvannya imunogistoximichny`x zobrazhen` / Pitsun Oleg, Pry'shlyak Katery`na, Kalinovs`ky`j Roman, Povorozny`k Vitalij// *Visny`k Xmel`ny`cz`kogo nacional`nogo universy`tetu*, №3, 2023 (321) – C.166 -174 <https://www.doi.org/10.31891/2307-5732-2023-321-3-166-174>
17. Berezsky, Oleh, Oleh Pitsun, Grygoriy Melnyk, Tamara Datsko, Ivan Izonin, and Bohdan Derysh. 2023. "An Approach toward Automatic Specifics Diagnosis of Breast Cancer Based on an Immunohistochemical Image" *Journal of Imaging* 9, no. 1: 12. <https://doi.org/10.3390/jimaging9010012>
18. O. Yo. Pitsun MULTI-THREAD PARALLELIZING OF CELL CHARACTERISTICS OF BIOMEDICAL IMAGES *UJIT*. 2022; Volume 4, Number 2 : 40-44 <https://doi.org/10.23939/ujit2022.02.040>
19. O. Berezsky, O. Pitsun, B. Derysh, I. Pazdriy, G. Melnyk and Y. Batko, "Automatic Segmentation of Immunohistochemical Images Based on U-net Architecture," 2021 IEEE 16th International Conference on Computer Sciences and Information Technologies (CSIT), LVIV, Ukraine, 2021, pp. 29-32, doi: 10.1109/CSIT52700.2021.9648669.
20. Salpea, N., Tzouveli, P., Kollias, D. (2023). Medical Image Segmentation: A Review of Modern Architectures. In: Karlinsky, L., Michaeli, T., Nishino, K. (eds) *Computer Vision – ECCV 2022 Workshops. ECCV 2022. Lecture Notes in Computer Science*, vol 13807. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-25082-8_47
21. K.Strasters and J.J.Gerbrands, Three-dimensional image segmentation using a split, merge and group approach, *Pattern Recognition Letters* 12, 307-325 (1991).