

T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**MOLEKÜLER PATOLOJİ TETKİKLERİNDE TÜMÖR YÜZDESİ
BELİRLEMEDE YAPAY ZEKÂ TABANLI DİJİTAL PATOLOJİ
ALGORİTMASI GELİŞTİRİLMESİ**

Dr. Yunus Baran Kök

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ PATOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asiye Işın Doğan Ekici

İSTANBUL 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakların da kaynaklar listesinde yer aldığını, yine bu tezin çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Yunus Baran Kök
İstanbul, 2024

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Ülkemiz patoloji bilimi için bir öncü olan ve gerek uzmanlık eğitimimi gerekse tez sürecimi uzun yılların birikimi ile kurmuş olduğu donanım sayesinde gerçekleştirdiğim, inovatif yaklaşımı ve derin bilgisi ile yol gösteren ana bilim dalı başkanımız ve laboratuvar direktörümüz Sayın Prof. Dr. Ümit İnce'ye,

Eğitim ve tecrübe kazanma sürecimde sayısız emekleri olan, her birinin mikroskopunda öğrenim görme şerefine nail olduğum Sayın Hocalarım, Ağabey ve Ablalarım; Prof. Dr. Süha Göksel'e, Prof. Dr. Handan Zeren'e, Prof. Dr. Tülay Tecimer'e, Prof. Dr. Cuyan Demirkesen'e, Prof. Dr. İlkser Akpolat'a, Prof. Dr. Kürşat Yıldız'a, Prof. Dr. Selçuk Bilgi'ye, Prof. Dr. Sibel Erdamar Çetin'e, Prof. Dr. Hale Kırımlıoğlu'ya, Prof. Dr. Kemal Behzatoğlu'ya, Prof. Dr. Özlem Aydın'a, Prof. Dr. Işın Doğan Ekici'ye, Prof. Dr. Füsün Baba'ya, Prof. Dr. Gülçin Başdemir'e, Prof. Dr. Nalan Neşe'ye, Prof. Dr. Demet Etit'e, Prof. Dr. Beyhan Demirhan'a, Prof. Dr. Arzu Akçay'a, Prof. Dr. Canan Ersöz'e, Prof. Dr. Emel Dikicioğlu Çetin'e, Doç. Dr. Yeşim Sağlıcan'a, Doç. Dr. Ayça Erşen Danyeli'ye, Doç. Dr. Fatma Tokat'a, Doç. Dr. Pelin Yıldız'a, Doç. Dr. Zeynep Tosuner'e, Doç. Dr. Nuray Başsüllü'ye, Doç. Dr. Davut Şahin'e, Uzm. Dr. Engin Ciğercioğulları'ya, Uzm. Dr. İlker Ersöz'ü'ye, Uzm. Dr. Özgür Özkayar'a, Uzm. Dr. Süheyla Ekemen'e, Uzm. Dr. Gülgün Koçak'a, Uzm. Dr. Eylem Akar'a, Uzm. Dr. Nail Güngör'e, Uzm. Dr. Umut Aykutlu'ya, Uzm. Dr. Hülya Kozalı'ya, Uzm. Dr. Emel Bitlis'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Üç ay sürecince yanında moleküler patoloji stajı yapma şansını bulduğum Sayın Prof. Dr. Fernando Schmitt'e ve bana büyük akademik destek veren Sayın Uzm. Dr. Şule Canberk'e teşekkür ederim.

Hem eğitimim boyunca hem de tez sürecimde bana büyük destek vermiş olan, laboratuvar koordinatörümüz Sayın Seher Çakır'a teşekkür ederim.

Dijital patoloji birimimizin sorumlusu Cavit Kerem Kayhan’a, ViraSoft ekibinden Gizem Solmaz’a, Süha Kukuk’a, Sercan Çayır’a tez sürecimdeki katkılarından ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Tüm asistanlık sürecimde beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Ece Güneyi Duyar’a, Beyza Bütün’e, Turna Demirci’ye, Didem Tendric Doğan’a, Yağmur Bekdemir’e ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm akademik, bilimsel ve motivasyonel desteğiyle tez sürecimde arkamda duran tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Işın Doğan Ekici’ye, akademik hayatımda bilgisi ve mentorluğuyla bana yol gösteren Sayın Doç. Dr. Ayça Erşen Danyeli’ye, moleküler patoloji bilgisi ve tecrübesini bana aktaran ve birçok çalışmada bana yer veren Sayın Prof. Dr. Sibel Erdamar Çetin’e, jinekopatoloji eğitimimi borçlu olduğum ve bu konuda beni yazın hayatına dahil eden Sayın Prof. Dr. Handan Zeren’e, laboratuvarımızın dijital patoloji altyapısını oluşturmada büyük emeği geçen Sayın Doç. Dr. Fatma Tokat’a, bu tez çalışmasını olanaklı kılan tüm donanımlara sahip laboratuvarımızın kurucusu Sayın Prof. Dr. Ümit İnce’ye bir kez daha teşekkürlerimi sunarım.

Ailem, arkadaşlarım ve tüm sevdiklerime sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Yunus Baran Kök

İstanbul, 2024

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1 GİRİŞ VE AMAÇ	5
2 GENEL BİLGİLER	7
2.1 Seröz Karsinom	7
2.1.1 Ekstrauterin pelvik yüksek dereceli seröz karsinom	7
2.1.2 Uterin seröz karsinom	8
2.1.3 Seröz karsinomlarda moleküler biyobelirteçler	9
2.2 Solid Tümörlerde Moleküler Patoloji	11
2.2.1 Moleküler test ve yorumlamada tümör hücre yüzdesi	11
2.3 Dijital Patoloji ve Yapay Zekâ	13
2.3.1 Mikroskop okülerinden bilgisayar ekranına	14
2.3.2 Görüntü işleme ve görüntü analizi	14
2.3.3 Patolojide makine öğrenmesi	21
3 GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1 Eğitim, Validasyon ve Test Gruplarının Belirlenmesi	27
3.2 Görüntülerin Dijitalizasyonu ve Ön İşlemler	28
3.2.1 Görüntü setlerinin inşası	28
3.2.2 Görüntülerin kalibrasyonu	30
3.3 Görüntülerin Analizi	31
3.3.1 Hücre çekirdeklerinin tespiti ve sınıflandırılması	31
3.3.2 Nükleer ölçümlerin hesaplanması ve referans standardın belirlenmesi ...	32

3.4 Makine Öğrenmesi Modelinin Geliştirilmesi ve Validasyonu	33
3.5 İstatistik	33
4 BULGULAR	34
4.1 Temel Nükleer Ölçümler	35
4.2 Model Başarısının Analizi	38
5 TARTIŞMA	42
6 SONUÇLAR	55
7 KAYNAKLAR	57
8 EKLER	65
EK-1 Karar Ağacı ve Rassal Orman Deneyi	65
EK-2 Etik Kurul Onayı	66

KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ

DAB	3, 3'-diaminobenzidin
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FIGO	Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
H&E	Hematoksilen & Eozin
ICD-O	Onkolojik Hastalıkların Uluslararası Sınıflandırılması
İHK	İmmünohistokimya
KYM	Kırmızı – Yeşil – Mavi
MAE	Ortalama mutlak hata
MAPE	Ortalama mutlak yüzde hatası
NCCN	Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (<i>Amerika Birleşik Devletleri</i>)
NGS	Yeni Nesil Dizileme
TCGA	Kanser Genom Atlası
WSI	Tüm lam görüntü
YDSK	Yüksek dereceli seröz karsinom

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Dijital patolojide nesne düzeyinde özellikler	16
Şekil 2. Dijital patolojide uzamsal özellik örneği: Voronoi mozaikleri	19
Şekil 3. Nükleer tespit ve bölütleme	22
Şekil 4. Denetimli makine öğrenme algoritması örneği: K-en yakın komşu	23
Şekil 5. Denetimsiz makine öğrenmesi metotları	24
Şekil 6. İkili sınıflama probleminde model başarı metrikleri	26
Şekil 7. Eğitim ve validasyon sürecindeki nükleusların sınıflara göre dağılımı	34
Şekil 8. Temel nükleer ölçümler için ortalama grafikleri	36
Şekil 9. Temel nükleer ölçümlerin ikili sınıflama performansları için ROC eğrileri .	37
Şekil 10. Temel nükleer ölçümlerin korelasyon matrisi	37
Şekil 11. Tümör hücre yüzdeleri için model tahmini ve referans değerler	38
Şekil 12. Tümör hücre yüzdeleri regresyon grafiği	39
Şekil 13. Modelin aritmetik hataları	39
Şekil 14. Modelin oransal hataları	40

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Görüntü çözünürlüğü ve pikseller	15
Resim 2. Renk dekonvolüsyonu	20
Resim 3. Nükleer tespit ve bölütleme	21
Resim 4. Görüntü sütunlarının oluşturulması	29
Resim 5. Dijital doku mikrodizileri	30
Resim 6. Renk kalibrasyonu	30
Resim 7. Nükleer tespit ve bölütleme için kullanılan yazılım kodu	31
Resim 8. Nükleusların sınıflandırılması	31
Resim 9. Dansitometrik kanallar	32
Resim 10. Isı haritaları	41
Resim 11. Abartma (<i>overestimation</i>) hatasının en yüksek olduğu örnek: <i>WSI 5</i>	47
Resim 12. Azımsama (<i>underestimation</i>) hatasının en yüksek olduğu örnek: <i>WSI 13</i>	48
Resim 13. Dijital artefakt kaynaklı hatalar	49
Resim 14. Tümör dışı epitel hücrelerinde yanlış pozitif hatası	52

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Temel nükleer ölçümler için parametrik test sonuçları	35
--	----

ÖZET

Amaç: Moleküler patolojideki birçok test için önemli bir preanalitik bileşen olan tümör hücre yüzdesinin hesaplanması, genellikle patoloğun tümör dokusu içeren lamaları gözden geçirerek yaklaşık bir oran vermesi ile yapılır. Bu semikantitatif yaklaşım, hem patologlar içerisinde gözlemciler arası uyumsuzluğa sebep olabilmekte hem de hatalı değerlendirmelere açık olması sebebiyle test sonuçlarının yorumlanmasında hastanın tanı ve tedavisini önemli yönde etkileyecek düzeyde olumsuzluklara sebep olabilmektedir. Patolojide dijitalizasyonun ve yapay zekâ uygulamalarının gittikçe daha fazla benimsendiği günümüzde, nükleer tespit, bölütleme ve sınıflama yöntemleri, bu problem de dahil olmak üzere çok sayıda amaçla kullanılmaktadır. Bu çalışma söz konusu sürece katkı sağlamak için, tümör hücre yüzdesinin otomatize hesaplanmasına yönelik bir model geliştirme çalışmasıdır.

Yöntem: Çalışmada malign tümör olarak uterin seröz karsinom ve ekstrauterin pelvik yüksek dereceli seröz karsinom seçilmiştir. Bu tanının verildiği olgulara ait tümörlü dokular (n=100); eğitim (n=40), validasyon (n=40) ve test (n=20) gruplarına bölünmüştür. Hastalara ait seçili lamalar Aperio-Leica GT 450 DX cihazı ile dijitalize edildikten sonra, QuPath uygulama platformunda eğitim ve validasyon setlerini oluşturmak için görüntü örnekleri seçilerek, bu setleri oluşturmak üzere birleştirilmiştir. Sonrasında StarDist yazılımı kullanılarak nükleer tespit ve bölütleme yapılmış, tümör ve tümör dışı hücre nükleusları anotasyonlar ile sınıflandırılmıştır. Sınıflamanın öğretildiği rassal orman (random forest) algoritmasının hiperparametreleri ayarlanarak, çapraz validasyon eşliğinde ve hata matrisi ilişkili metrikler doğrultusunda en uygun bulunan model test örneklerindeki tüm lam görüntülerde denenmiştir. Referans standart, p53 ve PAX8 immünohistokimya çalışmaları yapılmış tümörlü dokularda, kahverengi çekirdek sayısının oranı olarak belirlenmiş ve modelin tahminleri referans standart ile kıyaslanarak, ortalama mutlak hata (MAE), ortalama mutlak yüzde hatası (MAPE) gibi metriklerle başarıları ölçülmüştür.

Sonuçlar: Bu çalışma, seröz karsinomlarda WSI düzeyinde bir nükleer sınıflamanın yapıldığı ilk yapay zekâ çalışmasıdır. Seçilen model eğitim setinde %87, validasyon setinde %83 doğruluğa sahiptir. Test lamlarındaki başarı metrikleri ise MAE=%11 (%0,36 - %35) ve MAPE=%41,8 (%1,32 - %175) olarak hesaplanmıştır. Öncelikli hata kaynakları arasında eğitim ve validasyon setlerinin görece küçüklüğü, doku takip prosedüründeki farklılıklar ve dijital artefaktlar gözlenmiştir.

Çıkarımlar: Mevcut modelin test lamlarındaki başarısında gözlenen farklılıklar, güvenilir bir yöntem olarak kullanmak için, konu üzerindeki çalışmaların artırılması gerektiğini göstermiştir. Ayrıca nükleer ölçümlerin farklı hücre tiplerinde gösterdikleri anlamlı farklılıklar, dijital patolojide hâkim olan ikili sınıflama yaklaşımının güvenilirliğini sorgulatmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dijital patoloji, Makine öğrenmesi, Moleküler Patoloji, Rassal orman, Tüm lam görüntü, Tümör hücre yüzdesi, Yapay zekâ

ABSTRACT

Objective: The calculation of tumor cell percentage, a critical pre-analytical component for many tests in molecular pathology, is typically performed by pathologists who review slides containing tumor tissue and provide an estimated ratio. This semi-quantitative approach can lead to inter-observer variability among pathologists and is susceptible to misinterpretation, potentially adversely affecting patient diagnosis and treatment outcomes. As digitalization and artificial intelligence applications are increasingly adopted in pathology, nuclear detection, segmentation, and classification methods are being utilized for various purposes, including addressing this issue. This study aims to contribute to this process by developing a model for automated calculation of tumor cell percentage.

Method: The study selected uterine serous carcinoma and extrauterine pelvic high-grade serous carcinoma as malignant tumors. Tumor tissues from cases with these diagnoses (n=100) were divided into training (n=40), validation (n=40), and test (n=20) groups. After digitizing selected slides from these patients using the Aperio-Leica GT 450 DX device, image samples were selected on the QuPath application platform to create the training and validation sets. Subsequently, nuclear detection and segmentation were performed using the StarDist software, and tumor and non-tumor cell nuclei were classified using annotations. The hyperparameters of the random forest algorithm, which was trained for classification, were adjusted and the most suitable model was tested on all slide images in the test set, accompanied by cross-validation and evaluated using metrics related to confusion matrix. The reference standard was defined as the ratio of brown nuclei in tumor tissues subjected to p53 and PAX8 immunohistochemistry studies, and the model's predictions were compared to the reference standard, with performance measured using metrics such as mean absolute error (MAE) and mean absolute percentage error (MAPE).

Results: This study is the first artificial intelligence study to perform nuclear classification at the whole slide image (WSI) level in serous carcinomas. The selected model achieved an accuracy of 87% in the training set and 83% in the validation set. The success metrics in the test slides were calculated as MAE=7.9% (range 0.36% - 35%) and MAPE=41.8% (range 1.32% - 175%). The primary sources of error included the relatively small size of the training and validation sets, variations in tissue processing procedures, and digital artifacts.

Conclusions: The observed variations in the model's performance on test slides indicate the need for further research to establish a reliable method. Additionally, the significant differences in nuclear measurements across different cell types question the reliability of the prevalent binary classification approach in digital pathology.

Keywords: Digital pathology, Machine learning, Molecular pathology, Random forest, Whole slide image, Tumor cell percentage, Artificial intelligence

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser tedavisine yönelik girişimler, 20. yüzyılda modern kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapinin kanser tedavisinde sistematikleştirilmesiyle birlikte devrim niteliğinde bir değişime uğramıştır.¹ Bu değişim, yüzyılın son çeyreğinde, normal hücrelere de sitotoksik etki gösteren kemoterapiye kıyasla, daha az yan etkiye sahip moleküler hedefli tedavilerin geliştirilmesi ve hastalar üzerindeki klinik kullanımının başlatılmasıyla ivmelenmiştir.² Rituksimab, Trastuzumab, Setuksimab gibi hedefli tedavilere öncülük eden monoklonal antikorlar, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmaya başlamıştır.³ İnsan genom projesinin tamamlanması ile beraber, onkoloji pratiği “kişiselleştirilmiş tıp” anlayışının hakimiyetine girmiştir.⁴ Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin geliştirilmesi de bu süreci pekiştirmiştir.⁴

Moleküler patoloji tetkiklerini daha kapsamlı hale getiren teknoloji, bir yandan da dijital görüntü analizi, yapay zekâ ve makine öğrenmesi gibi kavramlar üretmiştir. Biyomedikal bilimlere de hızla entegre olan bu kavramlar, bilgisayar işlemcileri ve grafik işlemci ünitelerinin gelişmesi, verilerin zenginleşmesi ve öğrenme algoritmalarının geliştirilmesi sayesinde patolojide de benimsenmiştir.⁵ Sitolojik ve histolojik görüntülerin ekranlara yansıtılması için kullanılan enstrümanlar içerisinde, statik görüntü sağlayan teknolojiler zamanla yerlerini dinamik ve robotik telepatolojiye ve sonrasında da tüm lam görüntülerin (WSI) tarandığı ve bugün yaygın olarak kullanılan dijital patolojiye bırakmıştır.⁶ Patolojik tanının öznel doğası gereği, ölçüme dayalı görüntü analizleri, sağladığı daha objektif yaklaşımla bir ihtiyaç haline gelmiştir.⁷

Patoloji branşındaki öznellik ve bunun bir çıktısı olan gözlemciler arası uyumsuzluğun önemli örneklerinden birisi, tüm lam görüntülerde tümör hücre yüzdesinin hesaplanması üzerinedir. Moleküler patoloji incelemelerinin önemli bir pre-analitik bileşeni olan tümör hücre yüzdesinin belirlenmesinde, gözlemciler arası değişkenlik literatürde sıkça bildirilmiş olup, hatalı değerlendirmelerin hasta yönetimini olumsuz yönde değiştirecek çıktılar doğurabileceğine değinilmiştir.

Patologların semikantitatif hesabına dayalı bu konudaki sorunların incelendiği çok sayıda çalışma literatürde mevcut olup, aynı örnekte %10 ile %95 gibi dramatik hesap farklılıkları bildirilmiştir.⁸

Bu tür farklılıklara vurgu yapılarak, dijital patoloji ve makine öğrenmesi uygulamaları içerisinde böyle bir problemin üstesinden gelmek için yöntemler geliştirilmesi gerekliliği gündeme getirilmiştir.⁸ Bu çalışmada, jinekolojik kanser nedenli mortalitede ön sırada yer alan ve moleküler incelemelere de sıklıkla konu olan ovaryan yüksek dereceli seröz karsinom ile endometrial seröz karsinomlarda, tümör hücre yüzdesinin hesaplanabilmesine yönelik bir algoritma eğitimi yapılmış ve tümör içeren tüm lam görüntülerde test edilmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Seröz Karsinom

Seröz karsinom terminolojisi, kadın genital sistem tümörlerinin güncel sınıflamasında 4 temel anatomik lokalizasyonda kullanılmaktadır: Endometrium, over, tuba (tuba uterina) ve periton. Ancak ileride detaylandırılacağı üzere bu tümörler, evreleme ve tedavi yönetimi açısından “endometrium” ve “over/tuba/periton” şeklinde 2 ayrı grupta toplanmaktadır. Olası bir terminolojik karışıklığı önlemek için şu not düşülmelidir: Seröz karsinom, endometrial olgularda doğrudan yüksek histolojik dereceli (FIGO derece 3) bir tümör olarak kabul edilirken, ekstrauterin lokalizasyonlarda düşük ve yüksek dereceli olmak üzere iki grupta ele alınmaktadır. Günümüzde bu iki grubun, aynı tümör tipinin farklı histolojik derecelerini temsil etmektense, farklı iki biyolojik antite oldukları kanaati mevcuttur.⁹ “Düşük dereceli seröz karsinom” bu çalışmanın kapsamı dışındadır. Bu çalışmada yer alan “yüksek dereceli seröz karsinom (YDSK)” veya anlatımı sadeleştirmek adına kullanılan “seröz karsinom” ifadeleri, şu iki yüksek histolojik dereceli antite için kullanılmaktadır: Endometrium (uterus) kökenli seröz karsinom (ICD-O kodu: 8441/3) ve over/tuba/periton (ekstrauterin pelvis) kökenli yüksek dereceli seröz karsinom (ICD-O kodu: 8461/3).

2.1.1 Ekstrauterin pelvik yüksek dereceli seröz karsinom

Kadın genital sistem tümörleri, global verilere göre memeden sonra kadınlarda kanserin en sık görüldüğü ikinci lokalizasyondur.¹⁰ Bu verilere göre sıklık açısından serviks ve korpus uteri kanserlerinin ardından gelmesine karşın, over kanseri kadınlar için önde gelen bir mortalite nedenidir.¹¹ Over malignitelerinin %90’ını epitelyal tümörler (karsinomlar) oluşturmaktadır ve bu tümörlerin çoğunluğunu oluşturan yüksek dereceli seröz karsinom, genellikle ileri evrede prezente olmasıyla diğerlerinden ayrılan, yüksek mortalite oranına sahip, agresif davranışlı bir alt tiptir.¹² Etyolojide, kalıtsal *BRCA* mutasyonlarını da kapsayan homolog rekombinasyon eksikliği, kronik salpenjit ve pelvik inflamatuvar hastalık gibi iltihabi süreçler, oral

kontraseptif kullanımı ve gebeliğin pelvik seröz karsinomdan koruyucu etkisi üzerinden yorumlanan hormonal mekanizmalar yer almaktadır.¹³

Tubal ve ovaryan YDSK patogenezindeki hakim görüş, prekürsör lezyon olarak tubanın fimbriyal ucundan kaynaklanan moleküler anormallikleri işaret etmektedir.^{9, 13} Bu moleküler anormalliklerin başında gelen *TP53* mutasyonları, Kanser Genom Atlası verilerine göre YDSK'lerin tamamına yakınında -kimi jinekopatoloji eksperlerince kategorik olarak tüm olgularda- mevcuttur ve bu tümörlerin diğer histolojik tiplerden ayırıcı tanısı için önemli bir parametredir.¹⁴ Primer peritoneal YDSK olgularının patogenezinin ilişkin açıklamalar, tubo-ovaryan olgulara benzer biçimde, prekürsör bir tuba lezyonundan (seröz tubal intraepitelyal karsinom) dökülen hücrelerden gelişen disseminasyon veya peritoneal endosalpingiozisin malign transformasyonunu içermektedir.¹⁵ Pelvik YDSK'leri tek bir çatı altında toplayan etyopatogeneze ve tümörlerin büyük kısmının ileri evrelerde tanı almasından ötürü, her ne kadar primeri saptamak yönünden algoritmalar geliştirilse de, bu tümörler için ortak bir evreleme sistemi kullanılmaktadır.¹⁶

Yüksek dereceli seröz karsinomun histolojik yapılanması, papiller, villoglandüler, labirent benzeri, solid, psödo-endometrioid, transizyonel formlarda olabilir. Sitolojik düzeydeki en ayırt edici özelliği, çapı 50 µm'yi aşan dev nükleusların izlenebildiği ağır nükleer pleomorfizmdir.¹⁷

2.1.2 Uterin seröz karsinom

Endometrium kanserlerinin etyopatogenezinin yönelik çalışmalar, kırk yıl önce bu kanserleri iki farklı kategoriye ayıran araştırmayla birlikte dualistik bir model üzerinde şekillenmiştir: Endokrin ve metabolik anormalliklerin eşlik ettiği, hiperöstrojenizm zemininde gelişen tip 1 kanserler ve bu tür hormonal mekanizmaların rol oynamadığı ve daha ileri evrelerde prezente olan tip 2 kanserler.¹⁸ Günümüzde de kısmen geçerli olan bu dualistik modelde, seröz karsinomlar tip 2 endometrial kanserlerin prototipini oluşturmaktadır. Endometrioid tipten sonra uterustaki en sık

ikinci karsinom tipi olan seröz karsinomlar, sadece %10'unu oluşturmalarına karşın, endometrial kanser nedenli ölümlerde başı çekmektedir.¹⁹

Patogenezinde, morfolojisi normal endometrial glandlardaki p53 anormallikleri ile başlayan, endometrial glandüler displazi ve seröz endometrial intraepitelyal karsinom (SEİK) ile devam eden karsinogenez süreci önerilmektedir.²⁰ Morfolojik olarak endometrial glandlara sınırlı SEİK dahil olmak üzere, myometriuma invazyon göstermeyen veya minimum invazyon gösteren erken seröz karsinom olgularında dahi rastlanılabilen ektrauterin yayılım, tümörün agresif doğasını açıklar niteliktedir.²⁰

2.1.3 Seröz karsinomlarda moleküler biyobelirteçler

TCGA kapsamında endometrial karsinomların moleküler karakterlerine göre sınıflandırıldığı çalışma, endometrial karsinomları şu 4 ana başlık altında toplamaktadır: 1) “*POLE*-ultramutant” grup, 2) “mikrosatellit instabil”, 3) “kopya sayısı düşük” ve 4) *TP53* mutasyonları ile birlikte yüksek oranda somatik kopya sayısı değişiklikleri gösteren “kopya sayısı yüksek” ya da “*p53*-anormal (mutant)” grup.²¹ Bu moleküler gruplar, mutlak olmamakla beraber, tümörlerin histofenotipleriyle örtüşme göstermektedir. Seröz karsinomlar, büyük ölçüde (> %90) kopya sayısı yüksek grup içinde yer almakta olup, aynı zamanda bu grubun büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Her ne kadar immünohistokimya ile de güvenilir bir şekilde saptanabilen *TP53* mutasyonları endometrial seröz karsinomlar için karakteristik olsa da, *POLE* mutasyonu ve mikrosatellit instabilite analizi, histolojik tipten bağımsız olarak tüm endometrial karsinomlar için önerilmektedir.²² Doğru bir moleküler sınıflamanın klinik gerekliliği şu şekilde özetlenebilir: *TP53* mutasyonları, *POLE*-ultramutant ve mikrosatellit instabil tümörlerde de eşlikçi moleküler değişiklik olarak gözlenebilir²³; histopatolojik ayırıcı tanıda özellikle derece 3 endometrioid karsinomlarla benzerlikleri de göz önüne alındığında, seröz karsinom tanısının doğru bir şekilde konulması gereklidir.²⁴ *POLE*-ultramutant ve mikrosatellit instabil tümörlerde immünoterapi seçenekleri alternatif oluştururken, *p53*-mutant karsinomlar daha agresif gidişatlarıyla sistemik kemoterapi gerektirirler.²⁴

Endometrial seröz karsinomların bir kısmı, bir büyüme faktörü reseptörünü kodlayan ve tümör hücrelerinde büyüme, hayatta kalma ve proliferasyonda rol oynayan *HER2* geninin amplifikasyonunu gösterirler; immünohistokimya veya in situ hibridizasyonla gösterilen *HER2* amplifikasyon/aşırı ekspresyonu, tıpkı meme kanserinde olduğu gibi endometrial seröz karsinomda da *trastuzumab* tedavisi için hedef oluşturur.²⁵

Ekstrauterin pelvik YDSK'lerde, endometrial seröz karsinomlarda olduğu kadar keskin moleküler inceleme önerileri yoktur. Bununla birlikte güncel NCCN kılavuzları, tedavi stratejisinin geliştirilmesi için en azından *BRCA1/2* mutasyonlarını içeren HRD durumunun ve heterozigosite kaybının araştırılmasını önermektedir.²⁶ Tuba-ovaryan YDSK'ler, endometrial seröz karsinoma oranla daha fazla *BRCA1/2* mutasyonu gösterirler.²¹ Somatik ya da kalıtsal olabilen BRCA mutasyonlarının araştırılması hem hedefli tedavilerin geliştirilmesi hem de ailesel yatkınlığın araştırılması açısından önem arz etmektedir. Hereditör meme/over kanseri sendromu hastalarında aile taramasını gerektirmesinin yanı sıra, BRCA mutasyonları taşıyan asemptomatik bireylerde salpingoofektominin kanser riskini azalttığına yönelik bulgular, profilaktik cerrahi yaklaşımı getirmiştir⁹. Rekürren over kanserinde kullanılan poli-ADP-riboz-polimeraz inhibitörlerinin, kalıtsal ya da somatik oluşundan bağımsız olarak *BRCA*-mutant tümörlerde sağkalımı belirgin olarak artırması, sendromik olmayan hastalarda da bu mutasyonların araştırılmasının önerilmesine neden olmuştur.¹⁰ Bunun haricinde çeşitli gerekçelerle; mikrosatellit instabilite, tümör mutasyon yükü, *BRAF*, *FR-alfa*, *RET*, *NTRK* gibi moleküler biyobelirteçler de ovaryan YDSK'ler için güncel onkoloji kılavuzlarına girmiştir.²⁶

2.2 Solid Tümörlerde Moleküler Patoloji

Moleküler genetik patolojisinin onkoloji açısından tarihsel niteliğe sahip örneklerine, meme kanserinde *HER2* amplifikasyonu, sarkomlarda translokasyonlar ve kolorektal kanserde mikrosatellit instabilite örnek gösterilebilir.²⁷ Önemli bir kısmının *HER2* aşırı-ifadesi gösterdiği meme kanserlerinde, bu genin kodladığı büyüme faktörü reseptörüne karşı geliştirilmiş monoklonal antikörün metastatik olgularda etkinliğinin gösterilmesi, söz konusu hasta grubunda bu genin araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur.²⁸ Tedavileri farklılık gösteren ancak ayırıcı tanı problemlerine neden olan morfolojik benzerlikleri ile çocukluk çağı sarkomlarında, bu tümörlerin gösterdiği çeşitli translokasyonlar doğru teşhis için yol gösterici olmuştur.²⁹ İlk olarak Lynch sendromu ile tanınan ve daha sonra çeşitli sporadik kanserlerde de tespit edilen mikrosatellit instabilite, kolorektal kanser hastaları ve hastaların ailelerini ilgilendiren tarama stratejilerinin geliştirilmesinde rol oynamıştır.³⁰ Yirmi birinci yüzyıla gelinmesiyle birlikte, *BRAF* geninin çok çeşitli kanserlerin patogeneğinde yer alan bir onkogen oluşunun ilanı³¹; akciğer kanserinde kullanılmak üzere onay alan ilk moleküler hedefli ilaç olan Gefitinib'e, küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularının *EGFR* mutasyonu gösteren alt grubunun belirgin şekilde daha iyi yanıt vermesine³² karşılık, *KRAS* mutasyonu gösteren olguların tedaviye dirençle ilişkili olduğunun gösterilmesi³³ gibi gelişmeler, moleküler patolojinin "kişiyeye özel tıp" anlayışına entegrasyonu ile sonuçlanmıştır.³⁴

2.2.1 Moleküler Test ve Yorumlamada Tümör Hücre Yüzdesi

Moleküler patolojideki diagnostik modaliteler, araştırılan genetik değişiklik ve kullanılan yöntemle göre değişen oranlarda duyarlılığa sahiptir. Düşük tümör hücre yüzdesinin meydana getirebileceği zorluklar, kullanılan testin tipine ve materyalin hazırlanma sürecine göre farklılık göstermekle beraber, moleküler patoloji için evrensel bir problemdir. Örneğin kolorektal kanserlerde *KRAS* ya da *BRAF* mutasyonlarını saptamak için sıkça kullanılan moleküler testlerde (Sanger dizileme, pirodizileme vb.), ilgili gendeki mutasyonu saptayabilmek için gerekli asgari tümör hücre yüzdesi %50'ye ulaşabilmektedir.³⁵⁻³⁹

Bu nedenle tümör hücre yüzdesine dair sorunlar için en çok vurgu yapılan nokta, Sanger dizileme gibi tümör hücre oranı duyarlılık eşiği %50'ye varabilen incelemelerde, gerçekte eşik değerin altında olan bir oranın eşik değerinde üzerinde olarak değerlendirilmesi sebebiyle yanlış negatif sonuç verme riskidir. Kolorektal kanserlerde 194 laboratuvarı dahil eden büyük bir anket çalışması, aynı örnek üzerindeki tümör yüzde tahminlerinin %10 ila %95 arasında değerlendirilmesi gibi dramatik farklılıkları vurgulamış; çalışmanın bütünü ele alındığında yanlış negatif sonuçlara yol açabilecek tahminlerin oranının en az %5 olduğunu bildirmiştir.⁸ Akciğer kanserlerini konu eden ve 9 patoloğun gözlemlerinin kıyaslandığı bir başka çalışma ise, tümör hücre yüzdesinin gerçekte %20'nin altında olduğu spesimenlerde, bu oranın %20'nin üzerinde tahmin edildiği gözlemlerin oranını %38 olarak bildirmiş; bu tür bir değerlendirme hatasının, analitik sensitivite eşiği %20 olan direkt dizileme tekniği için yanlış negatif sonuç verme riskine işaret etmiştir.⁴⁰

Tümör hücre yüzdesinin yanlış değerlendirilmesi karşımıza basitçe iki farklı şekilde çıkabilir: Mevcut tümör hücresi oranının olduğundan az (*underestimation*) ya da fazla (*overestimation*) şekilde hesaplanması. Daha öncelikli bir sorun olarak ele alınan, olduğundan fazla hesaplanmış tümör hücre yüzdesi, gerçekte sensitivite eşiğinin altında bir tümör hücresi oranı içeren olgularda testin yanlış negatif olarak yorumlanması riski taşır.^{8, 40} Moleküler patoloji rutininde tümör hücre yüzdesinin hesaplanmasındaki semikantitatif yaklaşımın, test sonuçlarında ve raporlamada fark yaratacak ölçüde belirgin bir gözlemciler arası uyumsuzluğa yol açması, literatürde giderek artan biçimde ilgi çeken bir konudur.^{8, 40-42} Tümör mikroçevresinde yer alan tümör dışı hücrelerin ve müsin gibi aselüler materyallerin miktarı, incelenen alanın büyüklüğü, kesit kalınlığı ve boya kalitesi gibi teknik nedenler, hatta laboratuvarlar arası veya coğrafi farklılıklar bu konuyla ilişkili olarak ileri sürülmektedir.⁴¹ Ancak, her halükârda tümör hücre yüzdesi hesabındaki gözlemciler arası uyumsuzluk ve gözlemci bazında tümör hücre oranının olduğundan az ya da fazla olarak yorumlanması, laboratuvar kalite standartları açısından sorun oluşturan bir unsur olarak ele alınmaktadır.

Bu sorunun önüne geçmek için kılavuzlarca da belirtilen çeşitli öneriler şu şekilde sıralanabilir: 1) Tümör hücre yüzdesinin tümör alanı ile eşdeğer anlam taşımadığının altı çizilerek hesaplamada hücre nükleuslarını temel alan bir oran verilmesi; 2) Yanlış değerlendirmelerin klinik açıdan daha az anlam taşıyacağı yüksek oranlara erişmek için uygun bir makrodiseksiyon ya da mikrodiseksiyon yapılması; 3) Tümör hücrelerini nontümöral hücrelerden ayıracak bir immünohistokimya yönteminin kullanılması -*burada tümör hücrelerinin yoğun şekilde boyanmasından kaynaklanan olması gerekenden fazla hesaplama riski ve ayrıca sınırlı tümörlerde doku kaybetme riski göz önünde tutulmalıdır*-; 4) Gözlemci bazında süregelen hataları engellemek adına tümör hücre yüzdesi detaylı hesaplanmış eğitim setleri oluşturulması; 5) Gözlemcilerin kendi laboratuvarlarındaki testlerin analitik sensitivitelere hakim olması ve test sonucuyla hesaplamayı yapan gözlemciye geribildirim sağlanması.^{40, 41}

Bütün bu araştırma, gözlem ve önerilerin ortak paydada bulunduğu nokta, patoloğun çoğunlukla binlerce hatta milyonlarca hücreyi içeren bir lamda hesaplayacağı tümör hücre yüzdesinin ancak kabaca bir tahmin olduğudur; bu nedenledir ki, bilişim teknolojilerinin ivmeli bir şekilde ilerleme gösterdiği 21. yüzyılda daha objektif değerlendirmeler için otomatize sistemler geliştirilmesi gerekliliği gündeme gelmiştir.⁸

2.3 Dijital Patoloji ve Yapay Zekâ

Sağlık alanına, insan yükünü hafifletmek, daha hızlı ve standardize çözümler sunmak amacıyla entegre edilen bilgisayar-destekli tanının (CAD) yaygınlaşması, dijital mamografi gibi modalitelerin geliştiği 1990'lı yıllara dek uzanır.⁷ Tıpkı radyoloji gibi, inspeksiyonun esas muayene yöntemi olduğu histopatolojide de tümörlerde moleküler alt-tiplendirme, mortalite ve nüks öngörüsü, tedaviye yanıtı değerlendirme gibi çeşitli diagnostik, prognostik ve teragnostik amaçlarla kullanılmaktadır.^{43,44}

2.3.1 Mikroskop okülerinden bilgisayar ekranına

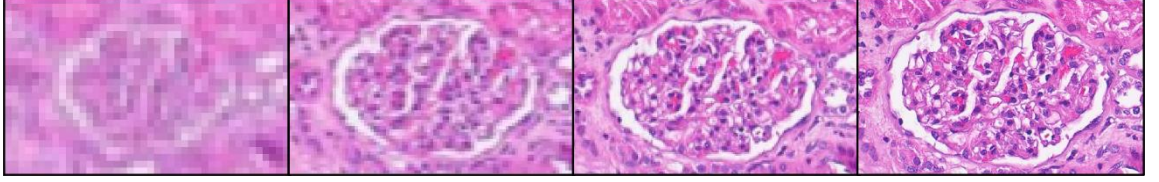
En genel anlamıyla, sağlık hizmetlerinde telekomünikasyon teknolojilerinin kullanımı olarak tariflenebilecek *telesaglık* ya da *teletıp*; Willem Einthoven'ın “telekardiyogram” olarak isimlendirdiği, fizyoloji laboratuvarında çekilmiş olan elektrokardiyogramın telefon hatları aracılığıyla kendisinin bulunduğu hastaneye aktarımını sağlayan cihazın literatürde ilk modern örneği olarak gösterildiği⁴⁵, günümüz sağlık dünyasında geniş kullanım alanlarına ulaşmış bir yaklaşımdır. Sağlık disiplinlerinin neredeyse tümünün uyarlanabileceği bu şemsiye kavramın altında *telerehabilitasyon*, *tele-diyabet bakımı*, *telekardiyoloji*, *evde telebakım*, *telepsikiyatri*, *teledermatoloji*, *telenöroloji* gibi çok sayıda uzmanlık alanı örnek olarak gösterilebilir.⁴⁶ Yakın tarihli bir küresel sağlık sorunu olan COVID-19 pandemisi de dahil olmak üzere, sağladığı avantajlar sağlık hizmetlerindeki etkinliğini ortaya koymuştur.⁴⁷

Teletıbbın patolojiye uyarlanışının izleri ise, *televizyon mikroskopi* konseptinin tanımlandığı 1952 yılına dek sürülebilir.⁶ 1968 yılında, Ronald Weinstein -kendisi aynı zamanda telepatolojiyi kavramlaştırmıştır- ve ekibi, periferik kan yaymalarına ait siyah beyaz görüntülerin Boston'daki Logan Havalimanı'ndan Massachusetts Genel Hastanesi'ne aktarıldığı çalışmaları yürütmüştür.^{6, 48} Takip eden dönemde telepatoloji; *frozen* inceleme, kurumlar arası konsültasyon ve transplant patolojisi gibi çeşitli uygulamalar için hızla benimsenmiştir.⁴⁹ Tarama hızı, maliyet düşüşü ve bilgi teknolojileri altyapılarının gelişimi ile beraber, yüksek çözünürlüklü tüm lam görüntülerin (WSI) incelenmesine olanak tanıyan dijital patoloji sahaya çıkmıştır.⁴⁹

2.3.2 Görüntü işleme ve görüntü analizi

“Görüntü işleme”, verilen görüntüyü bir başka görüntüye çevirme işlemi; “görüntü analizi” ise, verilen görüntüden sayısal bir değer elde etme işlemi olarak tanımlanabilir.⁵⁰ Bunlara dair bilgilerin öncesinde, bu yöntemlerin temelindeki birkaç kavrama değinilmelidir. Bunların ilki olan “piksel (*picture element*)”, bir görüntüyü oluşturan en küçük noktasal birimdir.⁵¹ Doğrudan bir ölçüye sahip değildir; ancak

dikdörtgen ekranlara uygun olması için temsil edildiği kare şeklin ölçüleri, görüntünün çözünürlüğüne bağlı olarak hesaplamalar için kullanılır. (Resim 1)

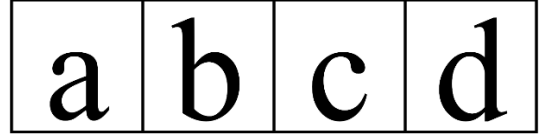


Resim 1. Görüntü çözünürlüğü ve pikseller.

Aynı glomerülün sırasıyla x4, x10, x40 ve x100'lük büyütmelerdeki görüntülerinde, çözünürlük arttıkça aynı görüntüyü oluşturan piksel sayısının arttığı ve piksellerin temsil ettiği kare şekillerin boyutlarının azaldığı görülebilir.

Bir diğer kavram olan “nesne”, dijital görüntülerde en azından bir benzerlik kriterini karşılayan komşu piksellerden oluşur.⁷ Nesne, en az bir özelliğiyle çevresinden ayırt edilebilen “şey”dir. Nesne kavramı, bir görüntüdeki herhangi bir “ilgilenilen alanı (*region of interest*)” tariflemek için kullanılabilmekle birlikte, bu yazının geri kalan kısmında dijital patoloji çalışmalarında da sıkça kullanıldığı biçimde, hücre nükleuslarının dijital görüntüsü için kullanılmıştır.

Nesneleri ayırt etmeye yarayan “özellikler (*features*)”, bir modeldeki hedef çıktıyı elde etmek için kullanılan girdi değişkenlerini ifade eder.⁵² Histopatolojik özellikler arkitektürel, biçimsel ve dokusal gibi çeşitli biçimlerde kategorize edilen herhangi bir ölçüm için kullanılabilir.⁵³ Bu özelliklere ilişkin sistematik ve kapsamlı bir literatür incelemesi 54 no’lu referansta matematiksel formülleriyle dokümante edilmiş olup, nesne düzeyindeki özelliklerin bir kısmı Şekil 1’de bu formüller üzerinden görselleştirilmiştir.

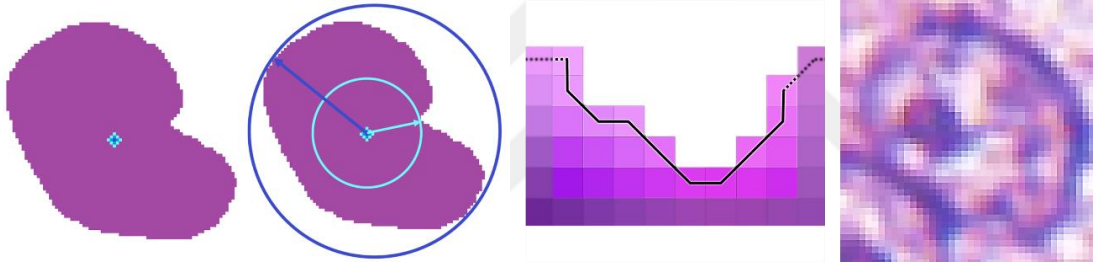


Şekil lejantı.



Şekil 1.1 Boyut ve biçim özellikleri.

Boyut ve biçim özelliklerinin tariflenmesi için, çalışmadaki iki seröz karsinom (a) ve (b) nükleusuna ait maskeler (c) ve (d) kullanılmıştır.



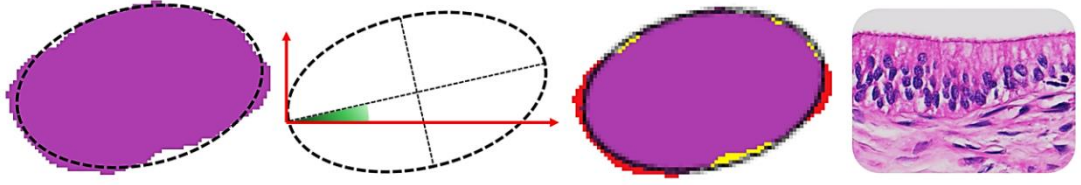
Şekil 1.1.1 Genel özellikler.

(a) *Alan ve geometrik merkez.* Alan, nesnedeki piksel sayısı; geometrik merkez ise nesnenin piksel konumlarının aritmetik ortalamasıdır.

(b) *Çembersellik.* Merkezleri, şeklin geometrik merkezi olacak şekilde, nesne içerisine sığan en büyük çember çapının, nesneyi kapsayan en küçük çember çapına oranıdır.

(c) *Çevre uzunluğu.* Nesnenin sınır piksellerini, sekiz komşusundan birine bağlayan doğru parçası uzunluklarının toplamıdır.

(d) *Sınır problemi.* Nükleer sınırlar, piksel düzeyine indikçe çevreyle iç içe geçmektedir. Bu durum hem manuel anotasyon için hem de nükleer segmentasyon metotları için standardizasyon sorunu yaratan bir problemidir.



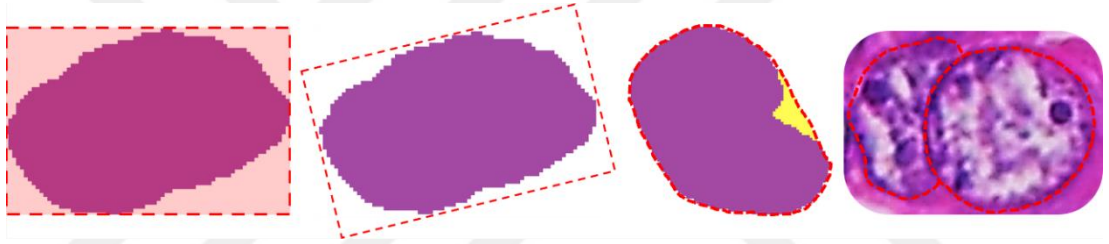
Şekil 1.1.2 Eliptik özellikler.

(a) *Eşdeğer elips*. Eliptik özellikler, nesneyle aynı eylemsizlik momentlerine sahip elips baz alınarak hesaplanır. Bu özelliklerden biri olan *dış merkezlik*, bu elipsin çemberden sapmasının ölçüsüdür.

(b) *Eliptik ölçümler*. Kesikli çizgiler nesnenin minimum ve maksimum çaplarını, kırmızı doğrular görüntü düzleminin yatay ve dikey eksenlerini, yeşil açı ise nesnenin görüntü düzlemine *oryantasyonunu* göstermektedir.

(c) *Eliptik deviasyon*. Nesne ile eşdeğer elipsin örtüşmeyen piksellerinin (sadece nesnede bulunan kırmızı pikseller ile sadece eşdeğer elipste bulunan sarı pikseller) toplamının, nesne alanına oranıdır.

(d) *Histopatolojik korelasyon*. Matematiksel olarak ölçülebilirlikleri bir tarafa, hücrelerin ve nükleusların eliptik özelliklerine dair ifadeler histopatoloji terminolojisinde sıkça kullanılır. Olağan bir safra kesesi mukozasına ait mikrofotografda gösterildiği üzere, üstte yer alan epitel hücrelerinin nükleusları daha yuvarlak iken, alttaki bağ doku hücrelerinin nükleusları “iğsi” ya da diğer bir deyişle daha yüksek dış merkezlik (*eccentricity*) değerine sahiptir.



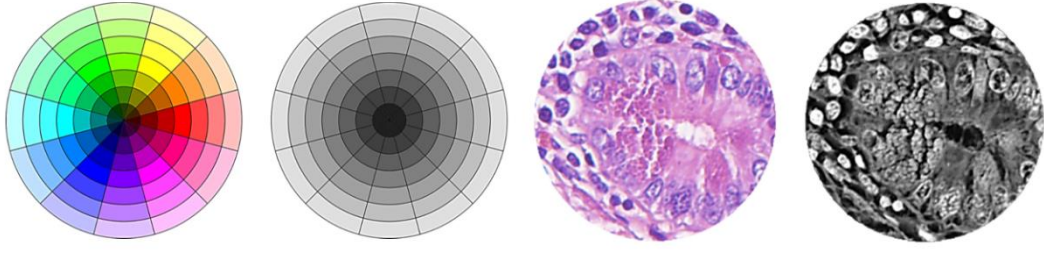
Şekil 1.1.3 Sınırlayıcı kutu (*bounding box*) ve dışbükey zarf (*convex hull*) özellikleri.

(a) *Sınırlayıcı kutu*. Sınırlayıcı kutu özellikleri, nesneyi bütünüyle sınırlayan en küçük dikdörtgen üzerinden hesaplanır. Bu özelliklerin içerisinde *kapsam* (sınırlayıcı kutu alanı) ve *çerçeve oranı* (sınırlayıcı kutunun yüksekliğinin genişliğine oranı) sayılabilir.

(b) *Sınırlayıcı kutuda oryantasyon*. Sınırlayıcı kutular farklı şekillerde ele alınabilir. Bir önceki görüntüdeki sınırlayıcı kutu, görüntü düzlemi ile paralelken, bu görüntüdeki sınırlayıcı kutu ise nesnenin kendi eksenleri ile paraleldir.

(c) *Dışbükey zarf*. Kimi zaman bir sınırlayıcı kutu biçimi olarak da kabul edilen dışbükey zarf, nesneyi sınırlayan en küçük dışbükey şekli tanımlar. Dışbükey zarf özellikleri içinde *konveksite eksikliği* (sarı alanın mor alana oranı) ve *sağlamlık* (nesne alanının dışbükey zarfının alanına oranı) sayılabilir.

(d) *Dijital patoloji korelasyonu*. Genel biyoloji prensibinde her ne kadar hücre nükleusları çoğunlukla dışbükey olsa da dışbükey zarf özelliklerine dair hesaplamalar, özellikle hücrelerin yığılma (*overlapping*) gösterdiği durumlarda, görüntü işleme ve analizi için büyük önem taşımaktadır. Örneğin bu mikrofotografda görüldüğü üzere, öndeki nükleus arkasındakinin bir kısmını örtüp, dijital görüntüde dışbükeylik eksikliğini artırarak sağlamlık değerini düşürmektedir.



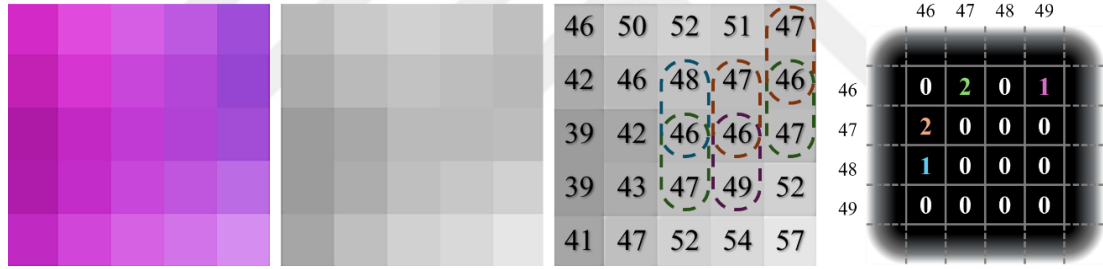
Şekil 1.2 Radyometrik ve dansitometrik özellikler.

(a) *Renkler*. Bu renk tekerleği, 12 farklı *renk tonunu* göstermektedir. Genellikle açılı dereceleriyle ifade edilen renk tonlarının temel örnekleri içerisinde, ana renkler kırmızı (0°), yeşil (120°), mavi (240°) ile bu renklerin eşit orandaki karışımları ile oluşan sarı (60°), camgöbeği (180°), macenta (300°) yer alır.

(b) *Parlaklık değeri*. Renk tekerleğinin doygunluğu sıfırlanarak oluşturulan bu görüntüde, parlaklık değerlerinin merkez dilimlerden çevre dilimlere göre arttığı söylenebilir. Parlaklık, kullanıldığı skalada pür beyaz görüntü için maksimum, pür siyah görüntü için minimum değerini verir.

(c) *Histolojik korelasyon*. Renklere ilişkin bilgiler, H&E boyalı görüntülerde sıklıkla “bazofilik” ve “eozinofilik” terimleriyle, dokunun biyokimyasal düzeydeki özelliklerin tanımlanması için kullanılır.

(d) *Optik dansite*. Görüntü elementlerinin ışığı geçirgenliği üzerinden tanımlanır. Bir önceki kolon kriptinin optik dansite filtrelili bu görüntüsüne bakıldığında, ışığı daha az geçiren öğelerin (örn. lenfositler) optik dansite değerlerinin daha yüksek olduğu ve radyolojideki “hiperdens” tanımına paralel olarak daha beyaz görüldüğü söylenebilir.



Şekil 1.3 Dokusal (textural) özellikler.

(a) *5x5 piksel ölçülerinde yama örneği*.

(b) *Yamanın gri-tonlamalı (grey scale) görüntüsü*.

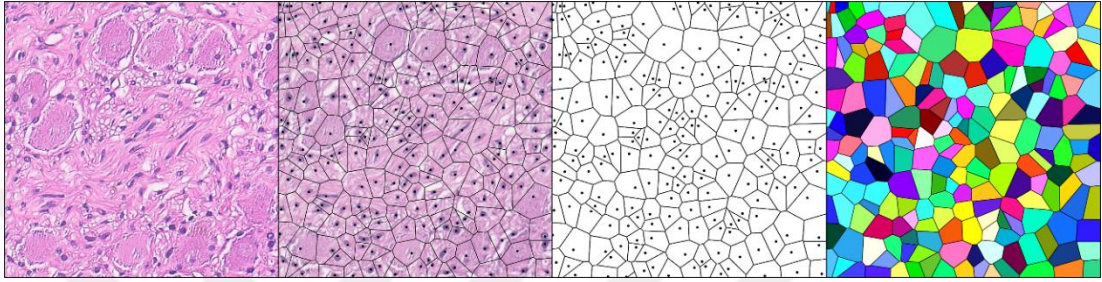
(c) *Piksellerin parlaklık değerleri*. Buradaki hesaplamada değerler 0 (siyah) – 63 (beyaz) aralığında verilmiştir. Dikey yönde tekrar eden sayı ikilileri çerçeve içerisine alınmıştır.

(d) *Gri düzey eş oluşum matrisi (grey scale co-occurrence matrix)*: Burada bir önceki görüntüde tekrarlayan sayı çiftlerinin yerleştiği bir matris kesiti gösterilmiştir. Gri düzey eş oluşum matrisleri, görüntü analizinde patern tanıma görevi için en sık kullanılan metotlardan biridir.

Şekil 1. Dijital patoloji görüntü analizinde nesne düzeyinde özellikler.⁵⁴

Nesne düzeyinde özellikler, nükleer tespit, bölütleme ve sınıflama konusunda yürütülen çalışmaların ana inceleme konusudur.⁷ Hücrelerin birbiri ile konumsal ilişkisinin incelenmesi ise uzamsal özellikler (*spatial features*) temelinde yapılır. Uzamsal özelliklerin matematiksel dayanağı olan çizge kuramı (*graph theory*);

düğümmler (*nodes*) ve bu düğümleri tanımlanmış kıstaslara göre birbirine bağlayan kenarlardan (*edges*) meydana gelen yapıları (grafik, ağaç) inceler.⁷ Uzamsal özelliklere; düğüm sayısı, kenar sayısı, kenar uzunluğu, derece (bir düğümün ilişkide olduğu kenarların ölçüsü), komşu sayısı (bir düğümün ilişkide olduğu diğer düğümmlerin ölçüsü), alan (örn. bir Voronoi mozaığı içerisindeki piksel sayısı) hesaplamaları örnek gösterilebilir.⁵⁴

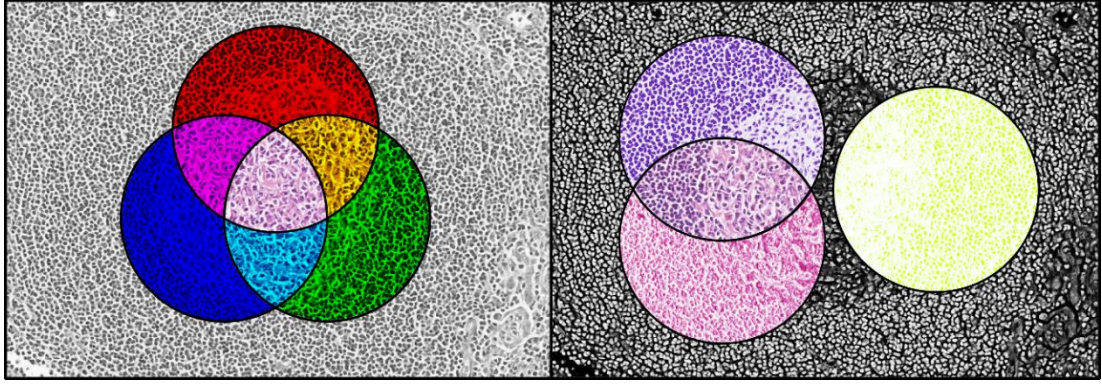


Şekil 2. Dijital patolojide uzamsal özellik örneği: Voronoi mozaikleri.

Burada, periferik sinir kesitindeki hücre nükleusları *düğüm* kabul edilerek oluşturulmuş Voronoi mozaikleri görülmektedir.

Dijital patoloji rutini ve çalışmalarındaki sürecin işleyişi, bu bölümün başında bahsedilmiş olan şu iki ana bileşenden oluşur: Görüntü işleme ve görüntü analizi. Görüntü analizi başlığı altında toplanabilecek nükleer tespit, bölütleme ve sınıflama süreçlerinin niteliği, görüntü işleme tekniklerine sıkı sıkıya bağlıdır. Dijitalize edilmiş histopatolojik görüntüler; boya konsantrasyonu, kesit düzensizliği, yabancı materyal varlığı, doku örneğinde hasar gibi *histoteknik* ya da veri kompresyonu, arka plan gürültüsü, tarama cihazına özgü farklılıklar gibi *dijital* birçok artefakt ya da varyasyonun etkisi altındadır.^{44, 55-56} Bu sebeple, görüntü işleme yöntemlerinin ana odağı, yöntemi tüm bu çeşitli durumların üstesinden gelebilecek şekilde yapılandırmaktır. Görüntü işleme teknikleri arasında; piksellerin optik yoğunluklarını ikili sınıflamaya indirgeyen *eşik değer atama* (thresholding), görüntüleri geometrik şekiller olarak ele alan ve erozyon/genişletme işlevlerini kullanan *morfolojik operasyonlar*, referans piksel komşuluğundaki pikselleri alana dahil etme kararı üzerinden çalışan *alan büyütme* (region growing) ve *nehir havzası* (watershed) algoritmaları, görüntüleri gradyanlar şeklinde işleyen *aktif kontur modelleri* örnek gösterilebilir.^{44, 55}

Görüntü işleme teknikleri, dijital patoloji ve görüntü analizi sürecinin herhangi bir basamağında rol oynayabilir. Görüntü analizi öncesinde uygulanan *ön işlemler*; *ışılma* ve *renk normalizasyonları*, histoteknik veya dijital süreçlerden kaynaklanan artefaktları gidermek için yapılan *gürültü azaltma* ve *görüntü yumuşatma*, işlem sürecini kısaltmak ve verimi artırmak için uygulanan *alakalı bölgeyi belirleme* (ing. region of interest) gibi amaçlar için kullanılır.^{7, 55} Görüntü işleme ve analizi metotlarının histopatoloji açısından özgün bir örneği olarak; dijital görüntülerdeki standart KYM (kırmızı, yeşil, mavi) değerlerini, hematoksilin, eozin ve DAB boyalarının ölçülebilir değerlerine dönüştüren *renk dekonvolüsyonu* gösterilebilir.⁵⁷ (Resim 2)



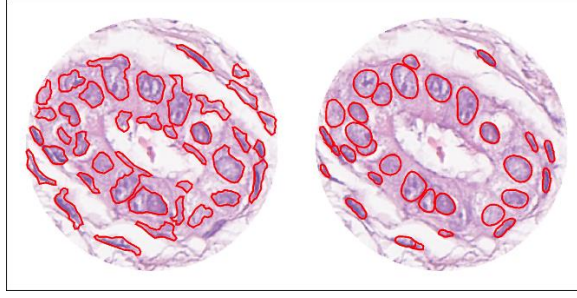
Resim 2a. Renk kanalları.

Zemindeki gri görüntü de dahil olmak üzere, renkli ekranların çoğunda görüntü, kırmızı, yeşil ve mavi kanallardaki değerlerin değişen oranlarda birleşiminden oluşur. Bu, dijitalize edilmiş histopatolojik görüntüler için de geçerlidir.

Resim 2b. Yapay renk kanalları.

Renk dekonvolüsyonu metodu, görüntüleri optik dansite ve KYM değerleri temelinde yapay hematoksilin ve eozin kanallarına ayırır. Toplam optik dansiteden artan değerler içinse üçüncü bir rezidüel kanal oluşturur.

Sıklıkla birlikte ele alınan *nükleer tespit* ve *nükleer bölütleme (segmentasyon)*, dijital patoloji görüntüsündeki hücre nükleuslarını ayırt etmek için kullanılan iki işlemdir. Nükleer tespit (ya da görüntü analizi terminolojisindeki daha kapsamlı karşılığı olan nesne tespiti), bir nükleusun görüntüdeki yerinin saptanmasını; nükleer bölütleme ise, saptanan nükleusun sınırlarının çevresinden ayrılmasını ve nükleer tespitin bir anlamda daha incelikli hale getirilmesini sağlayan işlemleri ifade eder.⁵⁸ Bu iki kavram arasındaki nüansı gösteren bir örnek Resim 3'te verilmiştir.



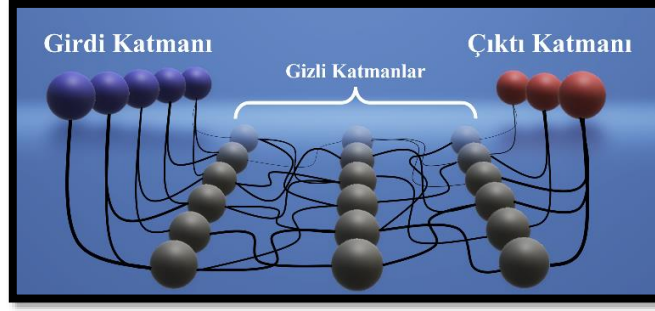
Resim 3. Nükleer tespit ve bölütleme.

Bu görüntüde, iki farklı algoritma tarafından yapılan nükleer tespit ve bölütleme gösterilmiştir. Zemindeki H&E görüntü ile değerlendirildiğinde, nükleer tespit başarılarının birbirine yakın olduğu söylenebilir. Ancak soldaki resimde tespit nesnelerinin, nükleuslar için gerçekle bağdaşmayacak düzeyde şekil bozuklukları içermesi, burada kullanılan algoritmanın bölütleme konusundaki başarısızlığını göstermektedir.

Nükleer tespit ve bölütleme işlemlerini takip eden *nükleer sınıflama*, sınıflama problemlerinin genel prensibinde yer alan özellik ölçümleri temelinde yapılır. İlgili özelliklerin analizi, insan gözlemcinin -patoloğun- düşünsel şemasının makine öğrenmesine uyarlanması için önemlidir.⁷

2.3.3 Patolojide makine öğrenmesi

Yapay zekâ, zekâ gerektiren insan davranışlarını taklit etme işlevi güden uygulamalardan meydana gelir. Temelinde, biyolojik sinir sisteminin karmaşık işleyişini taklit eden “yapay sinir ağları” yatar ve tıpkı doğada olduğu şekilde, paternleri öğrenme süreci gözlemlere dayanır.⁵ Makine öğrenme modelleri içerisinde, eğitilebilir sinir ağlarının öncü örneği olarak atfedilen *perceptron*, birer “girdi (input)” ve “çıktı (output)” bileşenlerinden ibaret olan “tek-katmanlı (single-layer)” bir mimariye sahiptir.⁵ Bu türden bir modelin karmaşık verileri işleyebilmesi amacıyla, girdi ve çıktı katmanlarının arasına, bir veya daha fazla “gizli” katmanın dahil edilmesi ile “çok-katmanlı (multi-layer)” mimarilerin inşa edilmesi sonucu “derin öğrenme” kavramının temeli atılmıştır.⁵ Derin öğrenmenin avantajı, karmaşık görevleri yerine getirmek için daha az parametre ve daha küçük veri seti gerektirmesidir.⁵



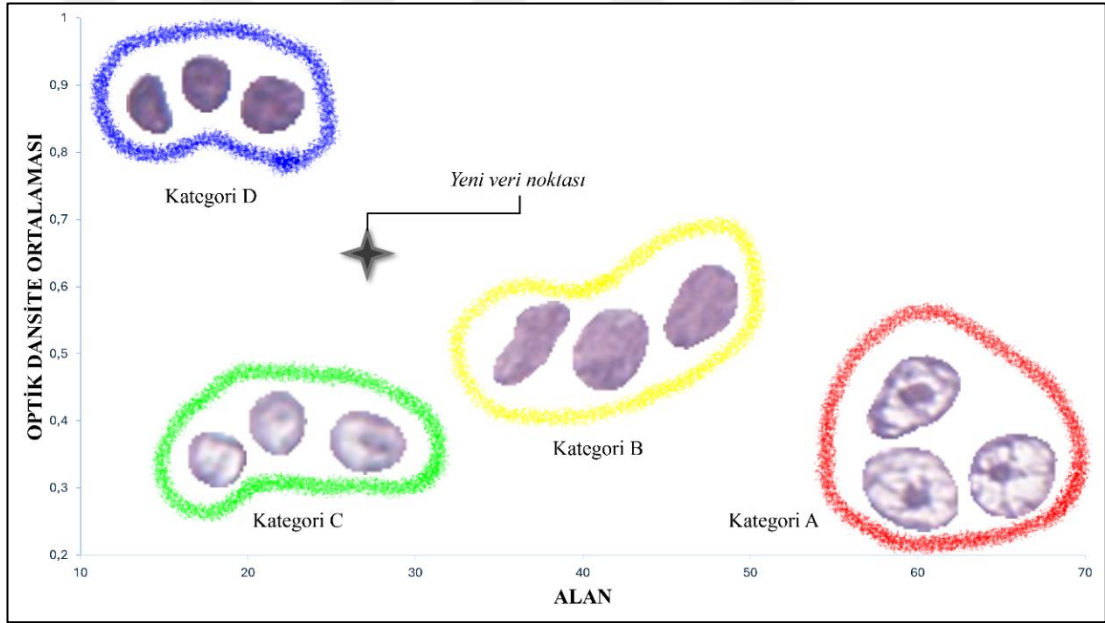
Şekil 3. Yapay sinir ağları.

Günümüz tıbbında yapay sinir ağları ve derin öğrenmeye ilişkin araştırmalar; çeşitli radyodiagnostik modaliteler (örn. beyinde manyetik rezonans, akciğer grafisi, mamografi, kas-iskelet tomografisi), oftalmoloji (örn. fundus fotografisi), kardiyoloji (örn. sol ventrikül segmentasyonu), gastroenteroloji (örn. kolonoskopi), dermatoloji (örn. dermoskopi) gibi çok çeşitli alanlarda uygulanabilecek bir kapsama ulaşmıştır.⁵⁹ Yapay sinir ağlarının bir çeşidi olan “evrişimli sinir ağları (*convolutional neural networks*)”, histopatolojideki nükleer tespit ve bölütleme görevlerindeki başarısıyla diğer birçok yöntemi geride bırakmıştır.⁴⁴

Bilişimsel patoloji, bir yüzünü dijital patolojinin oluşturduğu bir madalyona benzetilecek olursa, bu madalyonun öteki yüzünü makine öğrenmesinin oluşturduğu söylenebilir. Yapay zeka kavramının bir kolu olan makine öğrenmesi, bilgisayarların istenen çıktıyı bütünüyle karşılayan bir programlama yapılmaksızın, deneyimler üzerinden öğrenmesini ve bu öğrenmenin daha önce kendisine tanımlanmamış veriler üzerinde uygulayabilmesini hedefler.⁵² Makine öğrenmesi yöntemleri başlıkları içerisinde, dijital patolojideki görüntü analizi için en çok şu iki kategori kullanılmaktadır: Denetimli (*supervised*) öğrenme ve denetimsiz (*unsupervised*) öğrenme.^{52, 56, 60} Bunların türevleri olan yarı-denetimli (*semi-supervised*) öğrenme ve çoklu örnekle (*multiple instance*) öğrenme metotları sayılabilecek diğer örnekler arasındadır.⁵⁶

Denetimli öğrenme, bir uzman (örn. patolog) tarafından etiketlenmiş veriler (örn. hücre nükleusları) yordamıyla yapılır ve öğrenme çıktılarını niceliksel ya da niteliksel olarak inceler. Niceliksel çıktıları konu eden *regresyon* yaklaşımı, girdilerin

sayısal sonuçlara döküldüğü algoritmaları içerir.^{52,60} Buna, patoloğun sınıfladığı nükleusların çevre uzunluğu veya optik yoğunluğu gibi ölçümleri doğrultusunda, sınıflı verilen yeni bir nükleustaki değerlerin öngörülmesi örnek gösterilebilir. Niteliksel çıktıları konu eden *sınıflandırma* yaklaşımı ise, etiketlenmiş verilerin, tanımlanmış özelliklerini temel alarak bir kategorik sonuç vermekle ilgilenir.⁵² Tümör ve tümör dışı olarak sınıflandırılan nükleuslara ait verilerin, algoritmaya yeni tanıtılan nükleusları bu iki gruptan birine ataması bu kavramın basit bir örneğidir. Denetimli öğrenme metotları içerisinde, *lineer regresyon*, *lojistik regresyon*, *Naive Bayes*, *k-en yakın komşu*, *destek vektör makinesi*, *evrişimli sinir ağı*, *karar ağacı* ve *rastgele orman* algoritmaları sayılabilir. Denetimli öğrenme algoritmaları, patoloji uygulamaları içerisinde en fazla benimsenen metotlardır.⁵²



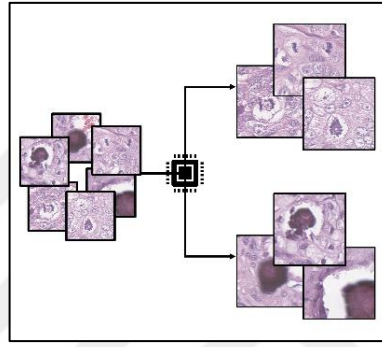
Şekil 4. Denetimli makine öğrenme algoritması örneği: K-en yakın komşu.

Bu örnekte dört sınıftan (A-seröz karsinom, B-tuba epiteli, C-düz kas, D-lenfosit) üçer nükleusun yer aldığı iki boyutlu (alan ve optik dansite ortalaması) bir veri uzayı gösterilmektedir. K-en yakın komşu algoritması, sınıflama probleminde, yeni veri noktasının kendisine tanımlanan sayı (K) kadar en yakın komşu ile mesafesi üzerinden bir tahmin yaparak çalışır.

Denetimsiz öğrenmede, denetimli öğrenmenin aksine verileri gruplamak için kullanıcının bir kriter belirlemesine gerek duyulmaz.⁴⁹ Patoloji uygulamalarında geri planda kalmakla birlikte, patolog için yorucu ve zaman alıcı anotasyon işlemini gerektirmemesi avantajı ve patoloğun öğrenme sürecini daha iyi temsil ettiği gibi düşünceler ile, denetimli öğrenmenin alternatifi veya tamamlayıcısı (yarı-denetimli

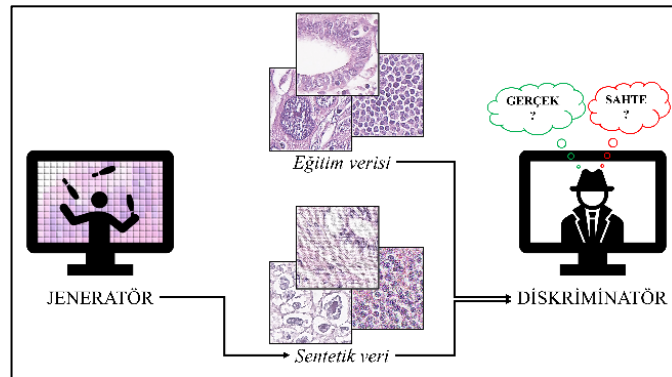
öğrenme) konumunda görülmektedir.⁶⁰ Bu metotların içerisinde, *kümeleme algoritmaları, üretici çekişmeli ağlar ve otokodlayıcılar* örnek gösterilebilir.⁶⁰

- Kümeleme (*clustering*) algoritmaları: Bunlar, verileri herhangi bir etiket gerektirmeksizin, benzerlikleri üzerinden gruplandıran algoritmalarlardır. DSÖ beyin tümörleri sınıflamasındaki kategoriler üzerinden verilen 1656 WSI görüntüyü ayırt etme başarısını inceledikleri çalışmalarında, Faust ve ark., bu konuda ortaya koyduğu başarının insan gözlemcilerle yarışır düzeyde olduğunu bildirmiştir.⁶¹



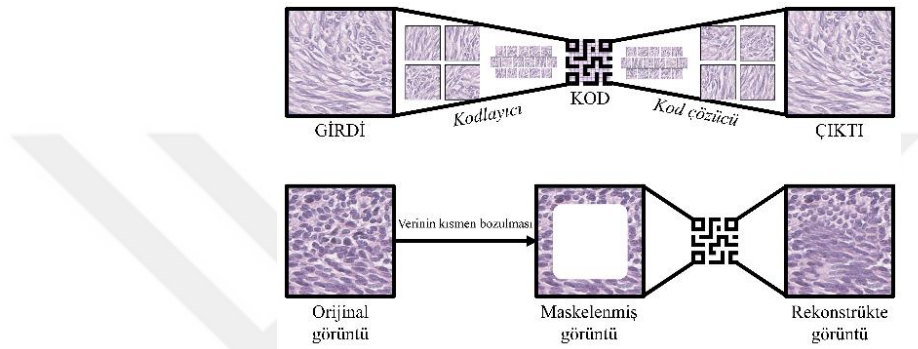
Şekil 5.1. Kümeleme algoritması.

- Üretici çekişmeli ağlar (*generative adversarial networks*): Bu yapay zekâ algoritması, birbiriyle rekabet halindeki iki yapay sinir ağından oluşur: Jeneratör, diskriminatörün gerçeğinden ayırt edemeyeceği veriler üretme başarısını; diskriminatör ise hangi verinin gerçek, hangi verinin sahte olduğunu ayırt etme başarısını artırmayı hedefler.⁶⁰ Patolojide renk normalizasyonu ve görüntü segmentasyonu gibi görevlerde sıkça kullanılmaktadır.⁶²



Şekil 5.2. Üretici çekişmeli ağlar.

- Otokodlayıcılar (*autoencoders*): Bu algoritmalar, verilen görüntüyü bir veri çıktısı haline nasıl getirilebileceğini öğrenmeyi hedefler ve kendinden denetimli (self-supervised) olarak tanımlanır.⁶⁰ Otokodlayıcılar, bir girdiyi örtük bir veri temsiline (latent representation) dönüştüren *kodlayıcı* ve bu kodu rekonstrükte görüntüye dönüştüren *kod çözücü* olmak üzere iki bileşenden oluşur.⁶⁰ Patolojideki kullanım alanlarının bir örneği olarak renk standardizasyonu gösterilebilir.



Şekil 5.3. Otokodlayıcı.

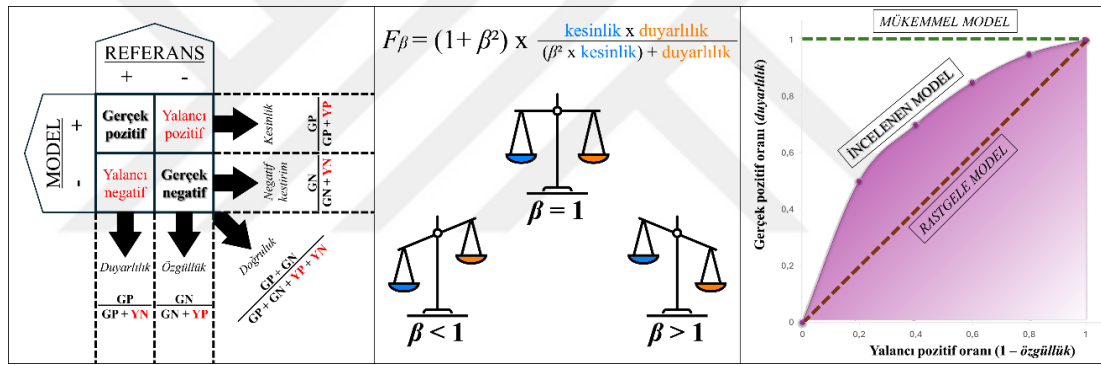
Patolojide sınıflama problemleri için geliştirilen makine öğrenmesi modellerinin sınanması için sıkça kullanılan metrikler, bir kısmı Şekil 6’da gösterilmiş olup, şunları içermektedir⁶³:

- Duyarlılık (gerçek pozitif oranı): Modelin, pozitif olguları yakalama becerisidir (örn. %100 duyarlılıktaki bir model, tümör hücre nükleuslarının tümünü tanımıştır).
- Özgüllük (gerçek negatif oranı): Modelin, negatif olguları yakalama becerisidir (örn. %100 özgüllükteki bir model, tümör dışı hücre nükleuslarının tümünü tanımıştır).
- Kesinlik (pozitif kestirim değeri): Modelin, pozitif olarak değerlendirdiği olgulardaki isabetli tahmininin ölçüsüdür (örn. %100 kesinlikteki bir model, tümör olarak sınıfladığı tüm nükleusları doğru tanımlamıştır).
- Doğruluk: Modelin, pozitif ya da negatif, tüm isabetli tahminlerinin oranıdır.

Görece sınırlı bilgi sağlayan bu metriklerin yanında, model başarılarını daha derinlemesine irdelemek amacıyla sunulan diğer bazı metrikler şunlardır:

- F-beta metrikleri: Kesinlik ve duyarlılık ölçümleri arasında dengeli bir dağılım yapmayı esas alır. Prototipi olan F1 skoru, kesinlik ve duyarlılık değerlerinin harmonik ortalamasını verir.
- ROC (alıcı işletim karakteristiği) eğrisi: Gerçek pozitif oranı (duyarlılık) ile yalancı pozitif oranı (1-özgüllük) kıyasının, saptanan tüm eşik değerlerde ölçülmesine dayanır.

Buraya kadar bahsedilen tüm bu metrikler, sınıflama probleminin geleneksel 2x2'lik hata matrisi üzerine kuruludur. Bu metriklerin uyarlamalarını içeren çok sınıflı (2'den fazla sınıfın olduğu), çok etiketli (bir verinin birden fazla sınıfa dahil olabildiği) ya da regresyon problemlerini konu alan istatistiki metotlar bu çalışmanın konusu dışındadır.



Şekil 6.1.
Temel hata metrikleri.

Şekil 6.2.
F-beta metrikleri.

Şekil 6.3.
ROC eğrisi.

Bir makine öğrenmesi modelinin geliştirilme ve validasyon basamakları şu şekilde özetlenebilir: 1-Veri kaynaklarının hazırlanması, 2-Geliştirilecek yapay zekâ modelinin tanınması ve başarı metrikleri eşliğinde validasyonu, 3-Modelin genelleştirilebilirliğinin değerlendirilmesi, 4- Model performansının, gerçek dünya tecrübesini yansıtacak verilerde ölçülmesi.⁵²

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 14.12.2023 tarihinde Acıbadem Üniversitesi ve Acıbadem Sağlık Kuruluşları Tıbbi Araştırma Etik Kurulu (ATADEK) tarafından onaylanmış; dosya/veri kaynağı taraması ve bilgisayar ortamında test uygulanmasına dayalı bir sistem model geliştirme çalışmasıdır. Bölüm 1, paragraf 3'te detaylandırıldığı üzere, jinekolojik organlarda sık görülen, agresif seyirleri ve moleküler incelemelere de sıklıkla konu olmaları dolayısıyla, tümör tipi olarak yüksek dereceli seröz karsinom belirlenmiştir. Hasta grubu, çalışma sürecinde kişisel verileri anonimize edilen, 18 yaş ve üzerindeki kadın hastalardan oluşturulmuştur. Hastaların patoloji materyallerine yönelik arşiv taraması, Tenay Patoloji uygulaması – Tıbbi Raporlar Sorgu Modülünde yapılmıştır. Kullanılan materyallere ait patolojik raporlama tarih aralığı 01.01.2017-31.12.2023 olarak belirlenmiştir.

Toplam 100 hastayı içeren çalışmada, hastaların seçimi için Acıbadem Sağlık Grubu bünyesindeki hastanelerde, en az bir rezeksiyon materyalinde, (yüksek dereceli) seröz karsinom histopatolojik tanısı verilmiş olması esas alınmıştır. Bu bağlamda; düşük dereceli seröz karsinom, serömüsinöz karsinom, seröz/serömüsinöz *borderline* tümörler, YDSK komponenti içeren mikst karsinom/dediferansiye karsinom/karsinosarkom, ayırıcı tanıda YDSK'nin irdelendiği ancak ileri tanısı verilmemiş tümörler, YDSK tanısı biyopsi ya da küretaj materyalinde verilmiş ancak ileri rezeksiyonu bulunmayan tümörler çalışma dışı bırakılmıştır. Hastalara ait tümör materyalleri, yapay zekâ algoritmasının eğitim, validasyon ve test gruplarında kullanılmak üzere üç gruba ayrılmıştır.

3.1 Eğitim, Validasyon ve Test Gruplarının Belirlenmesi

Hem rutin tecrübeyi yansıtması hem de tümör materyallerinin korunması açısından, test grubunu oluşturan tümörler için sırasıyla şu kriterler gözetilmiştir: 1) Moleküler patoloji çalışmasına konu olmuş ve bu çalışma için seçilen örneğe ait bilgilerin (histopatolojik çalışmanın protokol numarası ve seçilen parafin bloğun kodunun) moleküler patoloji raporunda belirtilmiş veya arşivde kayıt altına alınmış

olması; 2) Örneğin seçildiği histopatolojik incelemeye ait tüm parafin blokların, tüm H&E ve çalışılmışsa İHK boyalı lamaların arşivde mevcut olması; 3) Moleküler patoloji çalışması için seçilmiş örneğe karşılık gelen ve referans standart olarak kullanıma uygun bir İHK belirtecinin patolojik inceleme sürecinde uygulanmış ya da deneme amacıyla uygulanabilir olması: Mevcut İHK belirteçler içerisinde, referans standarda yönelik kullanılabilecek optimal belirteçler olarak p53 ve PAX8 belirlenmiştir. Bu gözleme dayanarak, materyalleri daha sonra istenebilecek bir çalışma için yeterliliğe sahipse, bu belirteçlerin çalışılmamış olduğu olgularda da PAX8 ve p53 çalışmaları tamamlanarak, referans standarda uygun bulunanlar test grubuna dahil edilmiştir. Tanımlanan tüm bu kriterlere uygun 20 olgu belirlenmiştir.

Eğitim ve validasyon gruplarını oluşturmak için, geriye kalan 80 hasta iki eşit gruba ayrılmıştır. Hastaların H&E boyalı örnekleri, neoplastik ve nonneoplastik hücrelerin morfolojik çeşitliliğini en üst düzeyde tutacak şekilde seçilmiştir. Jinekolojik dokularda rastlanılmayan hücre tiplerini (intestinal epitel, serebellar nöroglial hücre vb.) içeren örnekler, algoritmanın eğitiminde standart oluşturmak için eğitim grubundan hariç tutularak tümüyle validasyon grubuna dahil edilmiştir. Geriye kalan örnekler ise bu iki gruba rastgele dağıtılmıştır.

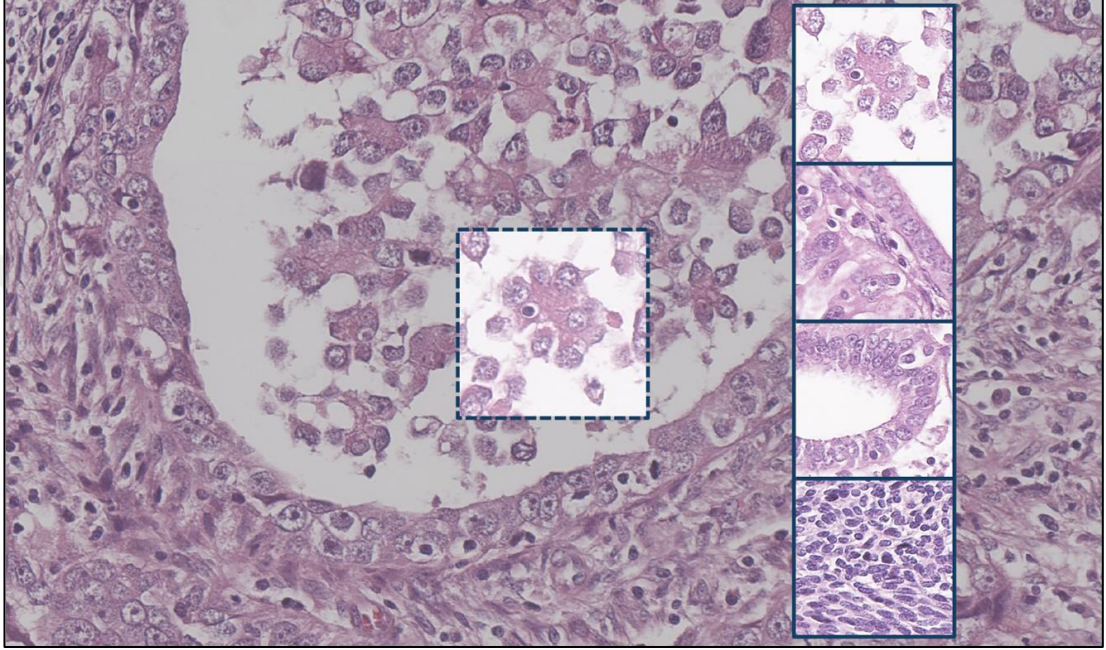
3.2 Görüntülerin dijitalizasyonu ve işlenmesi

H&E boyalı ve İHK belirteçli kesitleri içeren lamalar Aperio-Leica GT 450 DX cihazı ile dijitalize edilerek “.svs” formatında dosyalar oluşturulmuştur. Hücre çekirdeklerinin tespit, sınıflama ve test işlemlerine yönelik görüntü işlenmesi ve görüntü analizi için, açık kaynak biyomedikal görüntü analizi yazılımı olan QuPath⁶⁴ (sürüm 0.5.1) kullanılmıştır.

3.2.1 Görüntü setlerinin inşası

Eğitim ve validasyon grubunu oluşturan her bir olgu için, 300x300 piksel ölçülerinde (tüm görüntülerde 1 piksel uzunluğu 0,2622 µm’ye karşılık gelmektedir), en az 1’inde tümör hücreleri temsil edilecek şekilde seçilen 4 adet referans alan birleştirilerek *referans görüntü sütunları* oluşturulmuştur. (Resim 4) Farklı hastalara

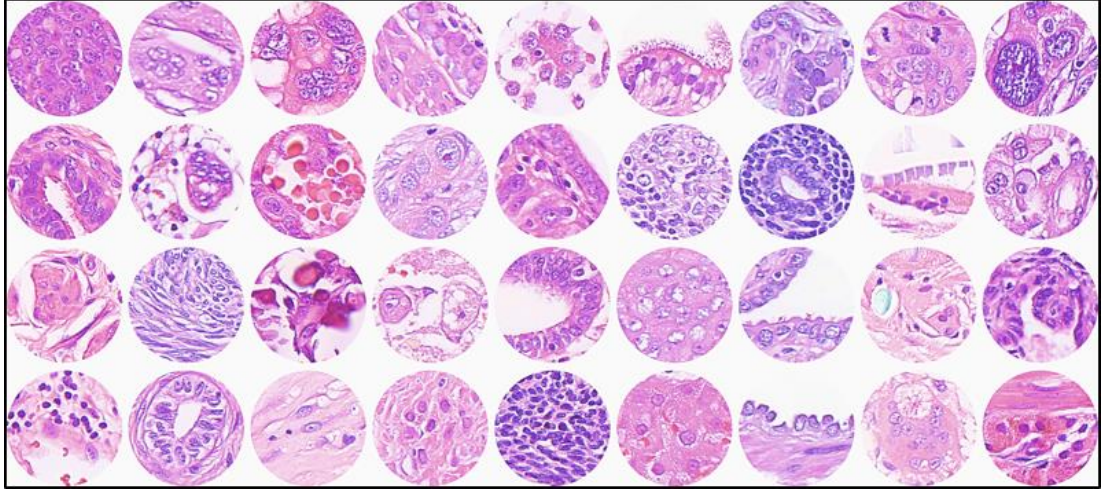
ait görüntü sütunları, eğitim ve validasyon veri setlerini oluşturmak üzere ardışık olarak birleştirilmiştir. Komşu referans görüntülerin sınır hatlarında meydana gelebilecek hatalı tespitleri önlemek için, her referans görüntü içerisinde, 75 mikrometre çapında çember şekilli *anotasyonlar* ile sınırlanan *dijital doku korları* oluşturularak, bu korların dışında kalan tüm alan beyaz renkle doldurulmuştur.



Resim 4. Görüntü sütunlarının oluşturulması.

Her olgu için dört farklı alandan olmak üzere, toplamda 320 görüntü karesi içeren 80 sütun ile eğitim ve validasyon veri setleri hazırlanmıştır.

Tüm nükleer tespit, sınıflama, ölçüm ve validasyon süreci, QuPath uygulaması ile uygulamanın ImageJ eklentisi kullanılarak tasarlanan ve görüntü meta verilerini (örn. piksel değerleri, piksel kalibrasyonu) koruyacak şekilde, sıkıştırma uygulanmamış “.tif” formatı ile kaydedilen bu *dijital doku mikrodizileri* üzerinden gerçekleştirilmiştir.



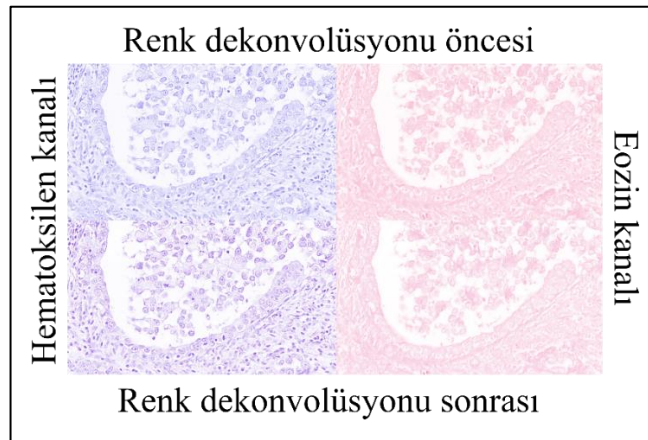
Resim 5. Dijital doku mikrodizileri.

Burada 4x40 görüntü kolu içeren eğitim setinin bir kısmı gösterilmektedir.

Test seti için, dokuları temsil eden H&E boyalı ve İHK belirteçli örneklerin tüm lam görüntüleri (WSI) kullanılmıştır.

3.2.2 Görüntülerin kalibrasyonu

Hematoksilen, eozin ve DAB kromojen boyalarının dijital platformdaki ayrımları ve kantitatif değerlendirilmeleri için, görüntülere QuPath uygulamasının otomatik ayarları kullanılarak, Resim 2’de tariflenen renk dekonvolüsyonu uygulanmıştır. Renk dekonvolüsyonunun görüntü düzeyinde yarattığı etkiler Resim 6’da gösterilmiştir.



Resim 6. Renk kalibrasyonu.

Burada renk dekonvolüsyonu öncesi ve sonrası H&E kanallarındaki görüntü değişimi gösterilmektedir.

3.3 Görüntülerin Analizi

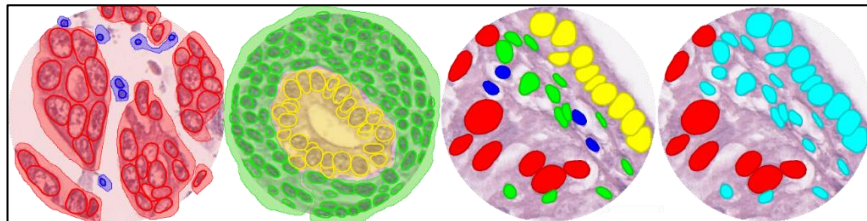
3.3.1 Hücre çekirdeklerinin tespiti ve sınıflandırılması

Hücre çekirdeklerinin tespiti için, QuPath platformuna entegre edilen ve derin öğrenme tabanlı bir nükleer tespit ve bölütleme yöntemi sunan StarDist⁶⁵ (sürüm 0.5.0) yazılımı kullanılmıştır. (Resim 7)

```
1 /* Hücre çekirdeklerinin tespiti, StarDist'in geliştiricileri Uwe Schmidt ve Martin Weigert tarafından eğitilen
2 açık kaynak bir model (he_heavy_augment.pb) kullanılarak gerçekleştirilmiştir
3 Aşağıdaki kod, orijinalinin modifiye edilmiş hali olup, işlev ve parametrelere ilişkin açıklamaları içermektedir */
4
5 import qupath.lib.scripting.QP
6 import qupath.ext.stardist.StarDist2D
7 def Nükleer_Tespit_Modeli = "he_heavy_augment.pb"
8 def Veri_Seti = QP.getCurrentImageData()
9 def Hücre_Çekirdeği = QP.getSelectedObjects()
10 def Nükleer_Tespit_Yazılımı = StarDist2D
11 .builder(Nükleer_Tespit_Modeli) // Hücre çekirdek tespit modelini kurar
12 .threshold(0.1) // Tanımlanan değerin üzerindeki olasılıklardaki nesneleri hücre çekirdeği sayar
13 // Burada, görece düşük bir değer olarak 0.1 (%10) eşiği alınmıştır */
14 .pixelSize(0.2622) // Nesnelerin tespiti için taranan piksel boyutunu belirler
15 // Burada çözünürlük değerinde (0.2622 µm) alınmıştır */
16 .measureShape() // Alan, çevre uzunluğu, çembersellik, sağlamlık, çap gibi şekil ölçümlerini kaydeder
17 .measureIntensity() // Hematoksiyen ve eozin boyaları üzerinden hesaplanmış yoğunluk değerlerini kaydeder
18 .build() // Hücre çekirdek tespit modelini, tanımlanan kriterler doğrultusunda yapılandırır
19
20 Nükleer_Tespit_Yazılımı.detectObjects(Veri_Seti, Hücre_Çekirdeği)
21 // Veri setindeki görüntülerde, hücre çekirdeği olarak değerlendirilen nesneleri tespit eder
```

Resim 7. Nükleer tespit ve bölütleme için kullanılan yazılım kodu.

Eğitim setindeki hücre çekirdekleri öncelikle, kökensel ve öngörülen morfolojik farklılıkları temel alınarak; tümör, epitel, mezenkim ve lökosit olmak üzere 4 kategoride sınıflandırılmıştır. Sınıflandırma, tek veya gruplar halindeki hücre çekirdeklerini kapsayacak şekilde çizilen anotasyonlar ile yapılmıştır. Sonrasında tüm çalışma verilerinin bir kopyası oluşturularak, tümör dışındaki tüm hücre çekirdeklerinin tümör dışı kategorisi altında birleştirilmesiyle sınıflama ikiliye indirgenmiştir. (Resim 8)



Resim 8. Nükleusların sınıflandırılması.

İlk iki görüntüde, dörtlü nükleer sınıflama için yapılan anotasyonlar (tümör: kırmızı, epitel: sarı, mezenkim: yeşil, lökosit: koyu mavi) gösterilmiştir. Diğer iki görüntüde ise, tümör haricindeki sınıfların "tümör dışı" sınıfında (açık mavi) toplandığı görülmektedir.

Sınıflanan hücre çekirdeklerine ait detaylar şu şekildedir:

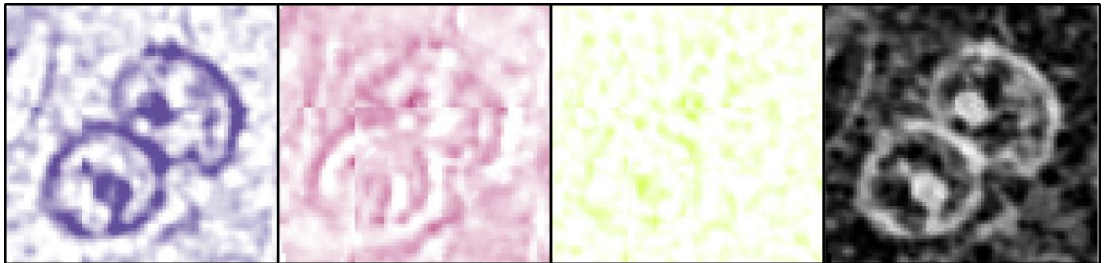
- ❖ TUMÖR: Seröz karsinom hücresi
- ❖ TUMÖR DIŞI;
 - Epitel: Metaplastik ve glandüler endoservikal epitel, endometrial epitel, tubal epitel, over yüzey epiteli, mezotel, granüloza hücresi.
 - Mezenkim: Fibroblast, kas hücresi, damar endoteli, adiposit, endometrial stroma hücresi, over korteksindeki tekal hücreler, Leydig hücresi, periferik sinir hücreleri.
 - Lökosit: Lenfoplazmasiter hücre, polimorf nüveli lökosit, makrofaj, germinal merkez hücreleri.

Yazılımcı tespit edilen nesneler içerisinde, canlı bir hücre çekirdeğini temsil etmeyen nesneler (kalsifikasyonlar, sekretler, endojen/ekzojen pigmentler vb.), hatalı tespit kabul edilerek sınıflandırma dışı bırakılmıştır.

3.3.2 Nükleer ölçümlerin hesaplanması ve referans standardın belirlenmesi

Tüm H&E boyalı görüntülerde, nükleuslar için şu ölçümler kaydedilmiştir:

- Boyutsal ve biçimsel: Alan, çevre uzunluğu, maksimum ve minimum çaplar, çembersellik, sağlamlık.
- Radyometrik ve dansitometrik: Renk dekonvolüsyonu sonrası hematoksilen, eozin ve rezidüel kanallar ile optik dansite toplamalarının nesne piksellerindeki değerleri.
- Dokusal: Radyometrik ve dansitometrik ölçümlerin patern (Haralick) özellikleri.



Resim 9. Dansitometrik kanallar (sırasıyla *hematoksilen*, *eozin*, *rezidüel* ve *optik dansite*).

Her bir kanala karşılık gelen 18'er tane özellik (piksel değerleri için maksimum, minimum, ortalama, ortanca değer, standart sapma, Haralick F0-F12) kaydedilmiştir.

Test lamalarının İHK boyalı görüntülerinde ise DAB kanalındaki piksel ortalamaları kaydedilmiştir. Referans standart, p53 ya da PAX8 biyobelirteçlerindeki pozitiflik değerleri doğrultusunda belirlenmiştir.

3.4 Makine Öğrenmesi Modelinin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Modelin geliştirilmesi için QuPath uygulamasında yer alan rassal orman (*random forest*) algoritması kullanılmıştır. Rassal orman algoritmasının hiperparametreleri (*maksimum ağaç derinliği, düğümlerdeki minimum örnek sayısı, ağaç başına maksimum özellik sayısı, maksimum ağaç sayısı*) ayarlanarak geliştirilen ön-modeller, veri setlerinde çapraz validasyonla değerlendirilip *kesinlik, özgüllük, duyarlılık, doğruluk* değerleri ile *F1* ve *F0.5 skorları* hesaplanmıştır. En başarılı bulunan model test lamalarına uygulanmak üzere seçilmiştir.

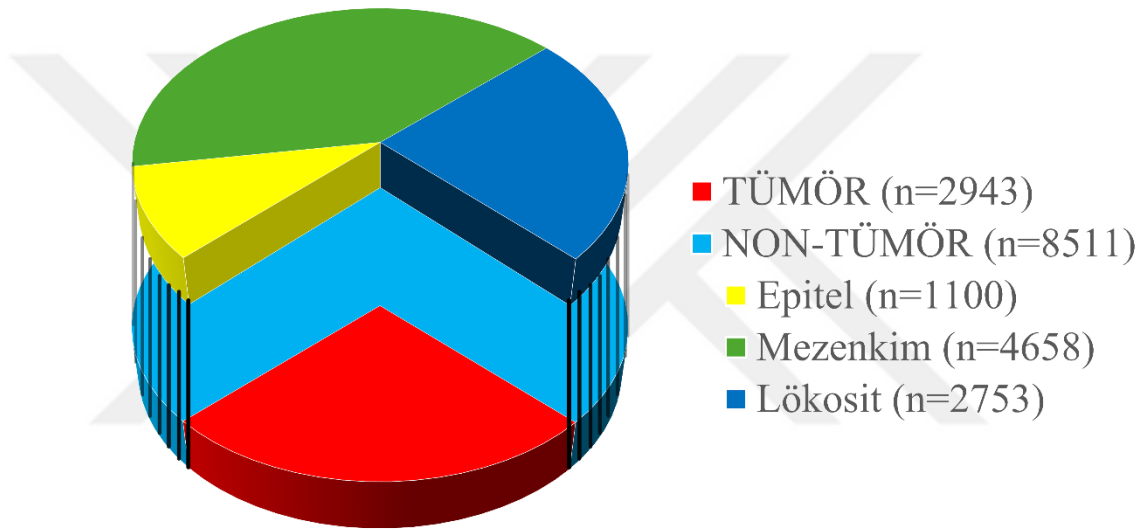
3.5 İstatistik

Modelin test grubundaki başarısı, tümör yüzde tahminleri referans standart ile kıyaslanarak hesaplanan regresyon metrikleri üzerinden değerlendirilmiştir. Bunun için Microsoft® Office 365 Excel® (sürüm 2404) uygulaması kullanılmıştır.

Ayrıca sınıflayıcının çalışma sürecinin iç yüzüne ilişkin veri sağlamak adına, eğitim setindeki nükleuslara dair 12 temel ölçüm (*alan, çevre uzunluğu, maksimum ve minimum çaplar, çembersellik, sağlamlık; nesne piksellerinin optik dansite/hematoksilen/eozin kanallarındaki ortalama değerleri ve standart sapmaları*) sınıflar arasında karşılaştırılmıştır. Bunun için bağımsız değişkenler t testi, tek yönlü ANOVA ve çift değişkenli korelasyon analizi için PASW Statistics (sürüm 18.0.0; SPSS Inc., 2009) uygulaması; ROC eğrilerinin analizi için ise Python (sürüm 3.11) yazılımında scikit-learn kütüphanesi kullanılmıştır.

4 BULGULAR

Çalışmaya, yüksek dereceli seröz karsinom tanılı toplam 100 hasta dahil edilmiştir. Hastaların 80'inde tümör örneklerinin dijital görüntüleri, her bir olgudan yaklaşık 507x507 piksele karşılık gelen dijital görüntü korları halinde, eğitim ve validasyon setlerinde eşit ölçüde yer almıştır. Eğitim ve validasyon süreçleri için toplam 11.454 nükleus sınıflanmıştır. Sınıflanan nükleusların dağılımları şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. Eğitim ve validasyon sürecinde yer alan nükleusların sınıflara göre dağılımı.
Toplam sayının %25,7'sini seröz karsinom nükleusları; tümör dışı (%74,3) nükleusların %12,9'unu epitel sınıfı, %54,7'sini mezenkim sınıfı, %32,4'ünü lökosit sınıfı nükleusları oluşturmuştur.

Test örneklerini oluşturmak üzere kullanılan 20 olguda, hem H&E boyalı hem de İHK (p53 ya da PAX8) çalışması yapılmış ardışık kesitler, WSI olarak bulunmaktadır. Test grubu örneklerinin (n=20) 6'sını uterin seröz karsinom, 14'ünü tubal/ovaryan/peritoneal yüksek dereceli seröz karsinom oluşturmuştur. Moleküler incelemeye gönderilen örneklerin alındığı anatomik bölgeler içerisinde uterin adneks (n=6), omentum (n=4), uterin korpus (n=2), pelvik periton (n=2), pelvik lenf nodu (n=1), inguinal yumuşak doku (n=1), kolon (n=1), ince bağırsak (n=1), karaciğer (n=1) ve akciğer (n=1) yer almıştır.

4.1 Temel Nükleer Ölçüm Sonuçları

Tablo 1. Temel nükleer ölçümler için parametrik test sonuçları.

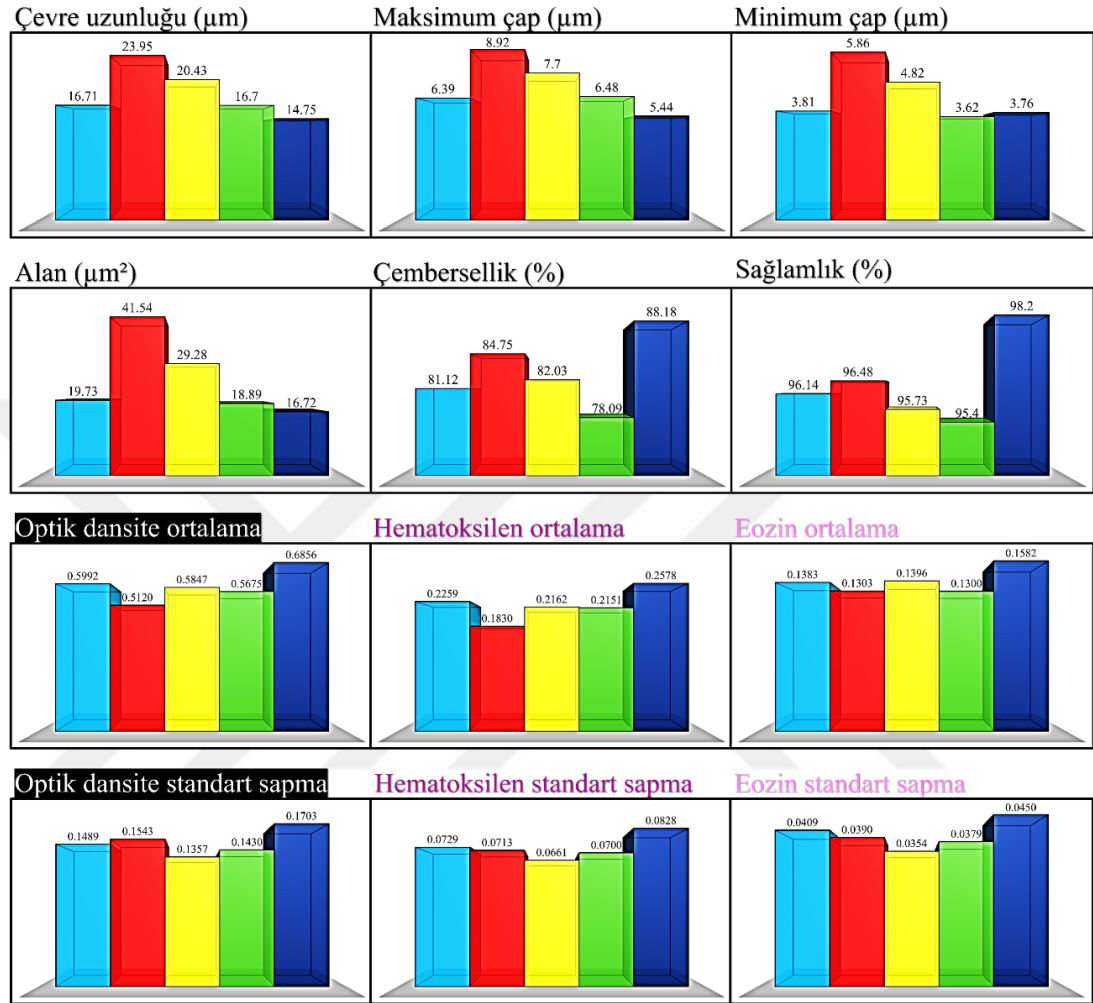
(X: Ortalama, Ss: Standart sapma, T: Tümör, NT: Non-tümör, E: Epitel, M: Mezenkim, L: Lökosit)

		TÜMÖR	NON-TÜMÖR			T x NT		
			Epitel	Mezenkim	Lökosit	T x E	T x M	T x L
		X (Ss)			p			
BOYUTSAL VE BİÇİMSSEL ÖLÇÜMLER	ALAN (μm^2)	41,54 (25,10)	19,73 (13,89)			<0,001		
	ÇEVRE UZUNLUĞU (μm)	23,95 (6,59)	16,71 (5,41)			<0,001		
	ÇEMBERSELLİK (%)	84,75 (14,73)	81,12 (16,36)			<0,001		
	SAĞLAMLIK (%)	96,48 (8,56)	96,14 (8,90)			0,181		
	MAKSİMUM ÇAP (μm)	8,92 (2,46)	6,39 (2,15)			<0,001		
	MİNİMUM ÇAP (μm)	5,86 (1,90)	3,81 (1,41)			<0,001		
RADYOMETRİK VE DANSİTOMETRİK ÖLÇÜMLER	OPTİK DANSİTE ORTALAMA	0,51 (0,14)	0,60 (0,17)			<0,001		
	OPTİK DANSİTE STANDART SAPMA	0,15 (0,05)	0,15 (0,05)			<0,001		
	HEMATOKSİLEN ORTALAMA	0,18 (0,06)	0,23 (0,08)			<0,001		
	HEMATOKSİLEN STANDART SAPMA	0,07 (0,02)	0,07 (0,03)			0,025		
	EOZİN ORTALAMA	0,13 (0,04)	0,14 (0,04)			<0,001		
	EOZİN STANDART SAPMA	0,04 (0,01)	0,04 (0,02)			<0,001		

Tabloda verilen istatistiki anlamlılık değerleri (p), tümör ile tümör dışı sınıflarının karşılaştırıldığı bağımsız değişkenler t testinden alınanlar için büyük ve kalın puntolarla; tümör ile her bir tümör dışı alt sınıfının karşılaştırıldığı ANOVA post-hoc Games-Howell testinden alınanlar için küçük ve normal puntolarla verilmiştir.

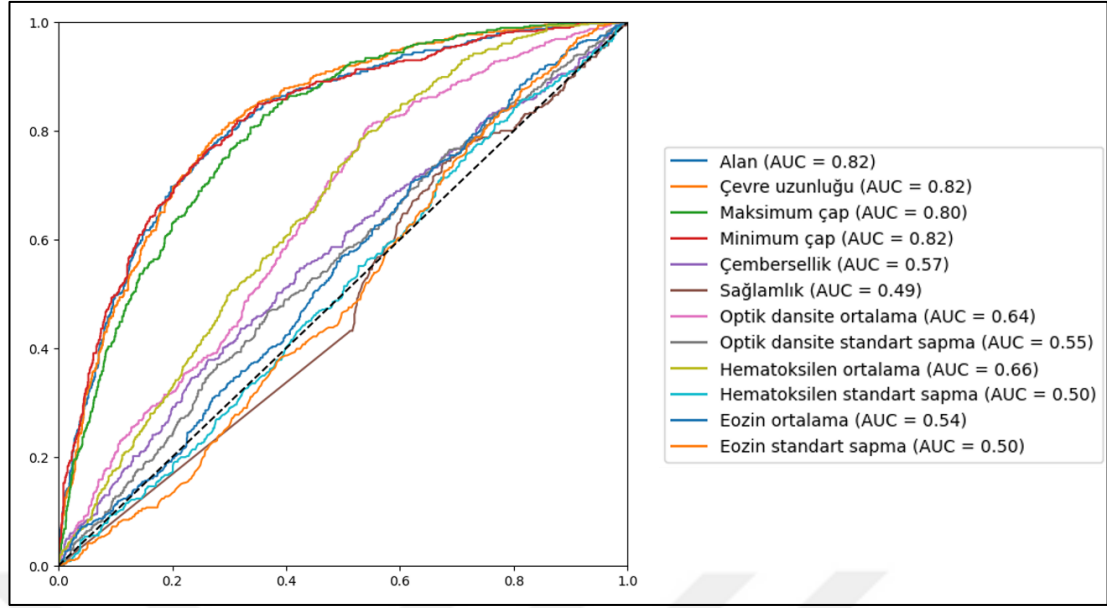
Tümör nükleuslarının boyutsal ölçümleri (alan, çevre uzunluğu, maksimum ve minimum çaplar), hem tümör dışı sınıfına hem de alt-sınıflara kıyasla istatistiki olarak anlamlı derecede yüksektir. Çembersellikte ise, tümör dışı sınıfına kıyasla anlamlı derecede yüksekken, alt-sınıflar açısından bakıldığında en yüksek değeri lökositler vermiştir. Dansitometrik özelliklerde ise, tümör ile tümör dışı sınıfı ve alt-sınıfları

arasında çeşitli varyasyonlar izlenmektedir. Nükleus sınıfları ve alt-sınıfları üzerinden yapılan ortalamalar hesabı Şekil 8'deki grafiklerde gösterilmiştir.



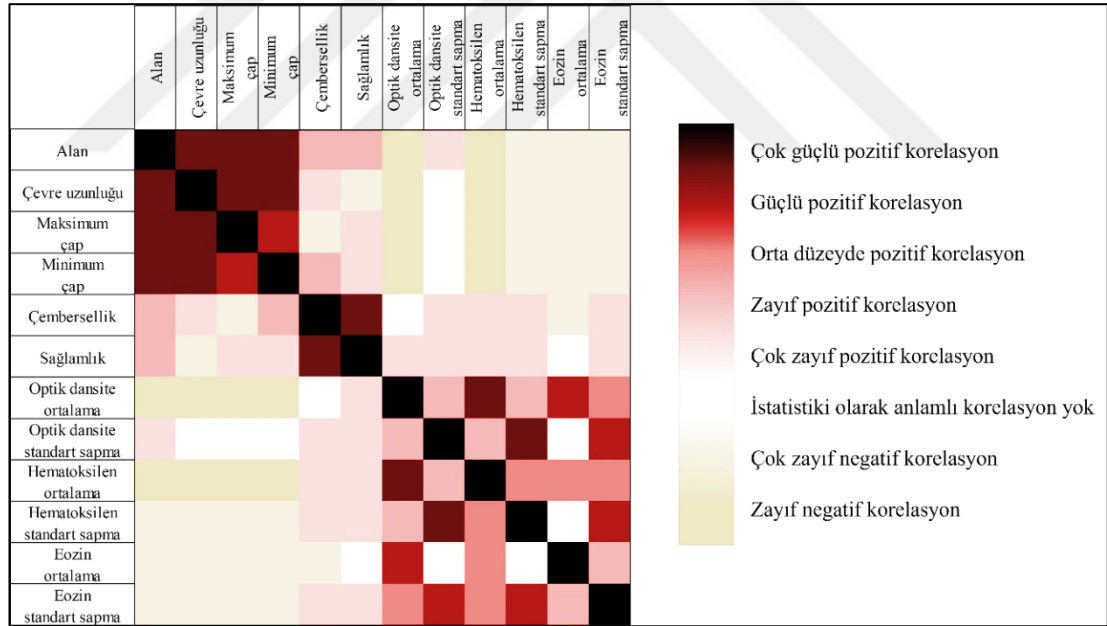
Şekil 8. Temel nükleer ölçümler için ortalamalar grafikleri.

Sütunlar sırasıyla *tümör dışı*, *tümör*, *epitel*, *mezenkim* ve *lökosit* sınıflarını belirtmektedir.



Şekil 9. Temel nükleer ölçümlerin ikili sınıflama performansları için ROC eğrileri.

Boyuta ilişkin ölçümler (alan, çevre uzunluğu, maksimum ve minimum çaplar), iki sınıfı ayırma başarısının en yüksek olduğu özelliklerdir.

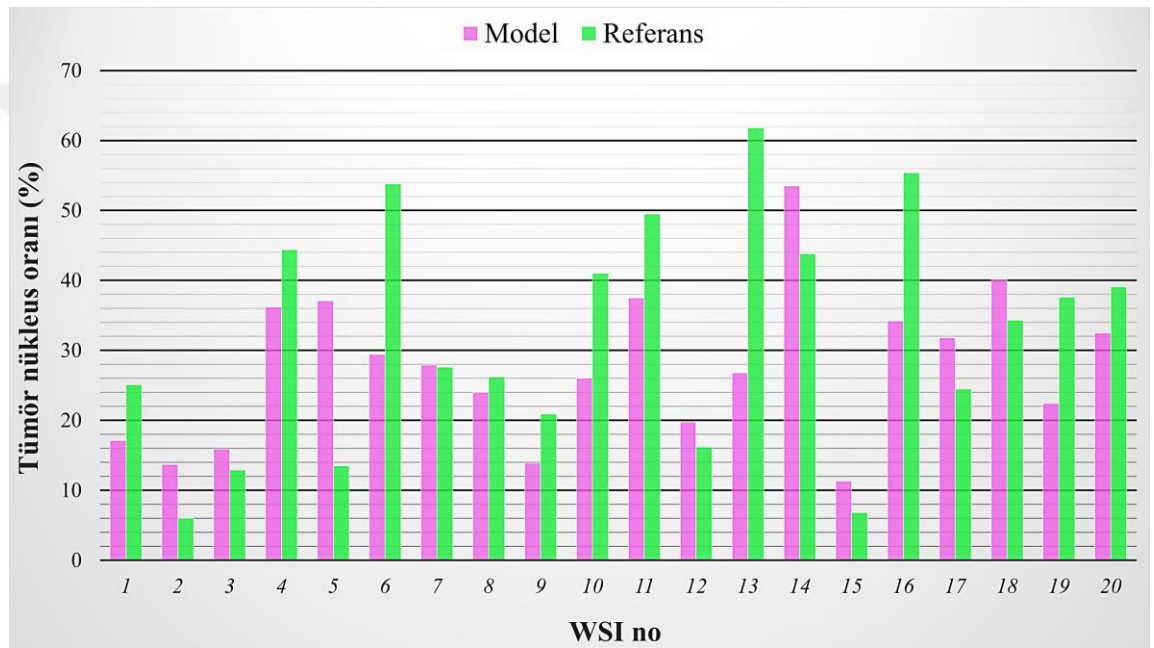


Şekil 10. Temel nükleer ölçümlerin korelasyon matrisi.

Renk kodları Pearson katsayılarına göre: >0,8 çok güçlü; 0,6 – 0,8 güçlü; 0,4 – 0,6 orta düzeyde; 0,2 – 0,4 zayıf; 0 – 0,2 çok zayıf olarak verilmiştir.

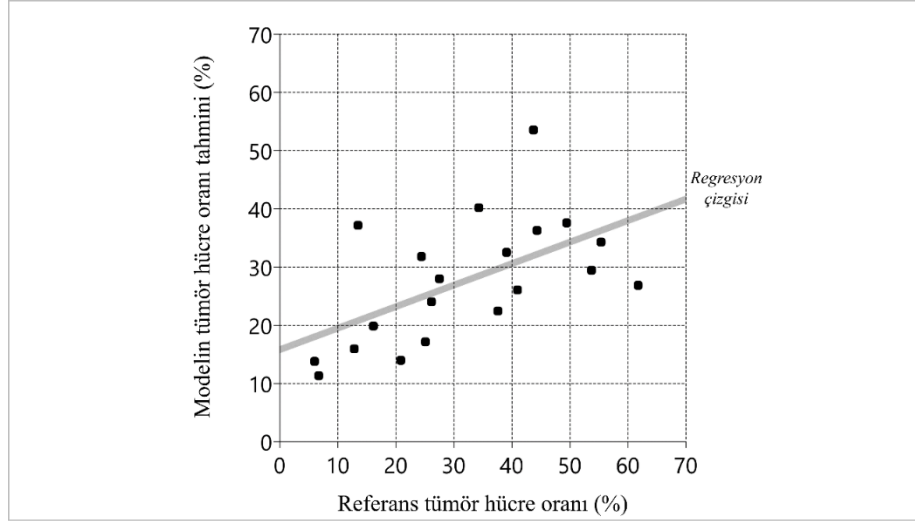
4.2 Model Başarısının Analiz Sonuçları

Geliştirilen modeller arasında test grubunda uygulanmak üzere seçilen modelin, sırasıyla eğitim ve validasyon setlerindeki hata matrislerine ilişkin metrikler şu şekildedir: Kesinlik %84 ve %65, sensitivite %68 ve %64, spesifite %95 ve %89, doğruluk %87 ve %83, F1 skoru 0,75 ve 0,65. Modelin test grubunda yer alan 20 WSI üzerindeki tümör hücre yüzdesi tahminleri ile referans tümör hücre yüzdeleri şekil 11’deki grafikte verilmiştir.



Şekil 11. Tümör hücre yüzdesi için model tahmini ve referans değerler.

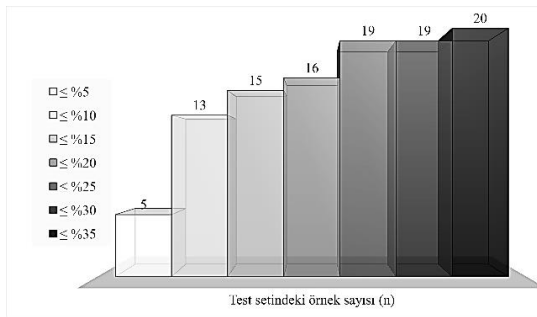
Tümör oranlarının ortalaması, referans standart için %32, modelin tahminleri için ise %27,56’dır. Referans tümör hücre yüzdeleri ile kıyas edildiğinde; modelin mutlak hatalarının ortanca değeri ($MdAE$) %7,9, ortalaması (MAE) %11, kareler ortalamasının karekökü ($RMSE$) ise %14’tür. Referans tümör yüzdesi ile model öngörüsünün korelasyonları incelendiğinde, Pearson katsayısı 0,573 ($p = 0,004$) ile orta derecede korelasyonu işaret etmiştir. Yüzdelere ait değerlerin dağılımı ve lineer regresyon hesabı şekil 12’deki grafikte verilmiştir.



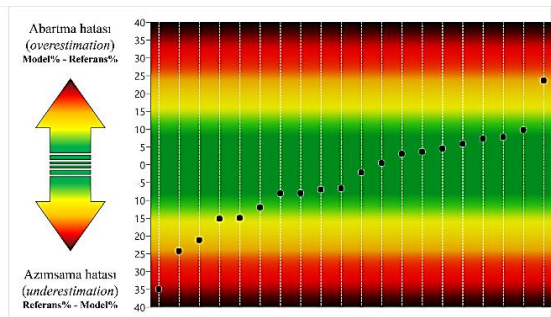
Şekil 12. Regresyon grafiği.

Burada, test olguları üzerinden hesaplanan lineer regresyon grafiği gösterilmiştir.

Modelin mutlak hatalarının beşi (%25) %5'in altında, sekizi (%40) %5-10 arasında, üçü (%15) %10-20 arasında, dördü (%20) ise %20'nin üzerindedir. Bu açıdan, modelin en isabetli tahminindeki (*WSI* 7) sapması %0,36, en hatalı tahminindeki (*WSI* 13) sapması ise %35'tir. Modelin %10'un üzerindeki mutlak hatalarının ($n=7$) biri hariç tümü, model tahmininin referans değerinin altında kalmasından kaynaklanmaktadır. Bunların istisnası olan tek örnekte (*WSI* 5), model tümör yüzdesini referans değerden %23,6 yüksek hesaplamıştır. Modelin aritmetik hataları şekil 13'te verilmiştir.

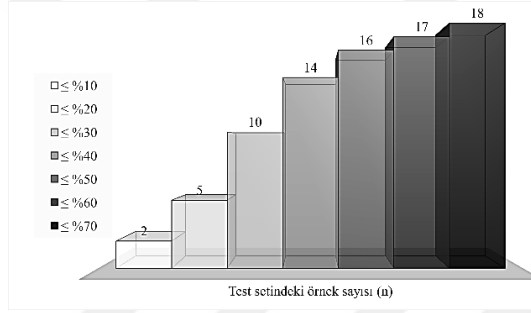


Şekil 13.1. Modelin mutlak hatalarının kümülatif dağılımı.



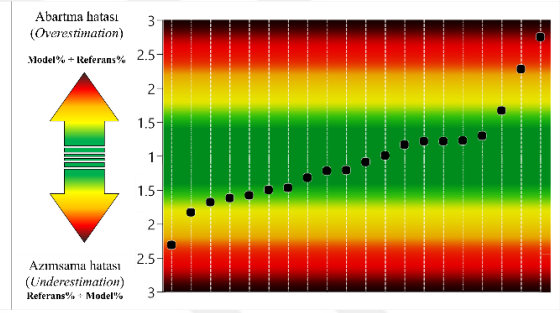
Şekil 13.2. Modelin mutlak hatalarının abartıma (overestimation) ve azımsama (underestimation) yönlerinde dağılımı.

Modelin mutlak yüzde hatalarının ortanca değeri (*MdAPE*) %30,9, ortalaması (*MAPE*) %41,8'dir. Buna göre model, olması gerekenden yüksek tahminlerinin (n=9) altısını, referans değer 1 ila 1,3 katı aralığında (referans değer 1'in en fazla %30'u kadar üzerinde) yapmıştır. Bu yöndeki en büyük hatası ise, bir önceki paragrafta sözü edilen yine “WSI 5” örneğindeki 2,75 katlık (referans değer 1'in %175'i kadar üzerinde) tahminidir. Olması gerekenden düşük tahminlerinin (n=11) altısında, referans değer 1 ila 0,67 katı aralığında (referans değer 1'in en fazla %30'u kadar altında) hesap yapmıştır. Referans değer 1'in yarısından az hesapladığı (x0,43) tek örnek ise, mutlak hatada en yüksek değerin görüldüğü “WSI 13” örneğidir. Modelin oransal hataları şekil 14'te verilmiştir.



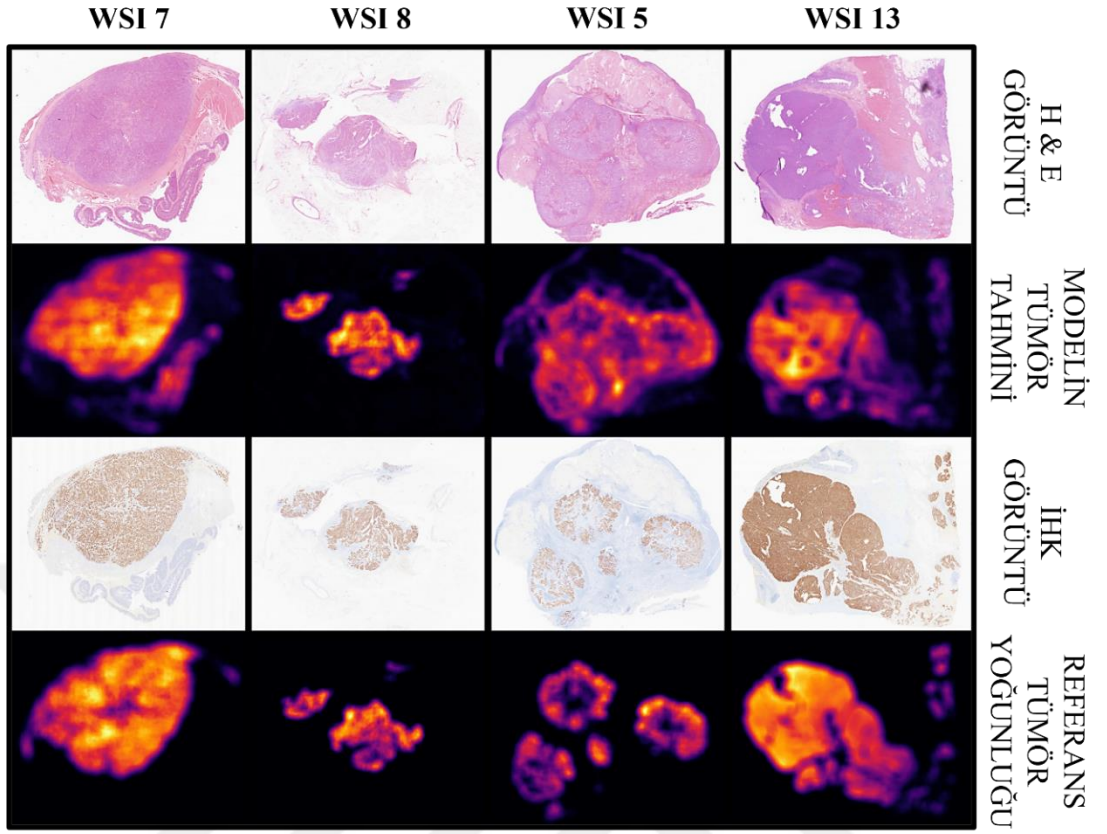
Şekil 14.1. Modelin mutlak yüzde hatalarının kümülatif dağılımı.

(%128 ve %175 oranlarında hata gösteren iki örnek grafikte yer almamaktadır.)



Şekil 14.2. Modelin oransal düzeydeki hatalarının abartma (overestimation) ve azımsama (underestimation) yönlerinde dağılımı.

Tümör nükleuslarının sayımları, gerçek pozitifler ile yalancı pozitifler ayrımı yapılamamakla birlikte, gözlemsel inceleme için kullanılan ısı haritalarının örnekleri Resim 10'da verilmiştir.



Resim 10. Isı haritaları.

Burada, modelin en başarılı iki tahminini yaptığı örnekler (sırasıyla WSI 7 ve WSI 8) ile tümör yüzdesini abartma (*overestimation*) ve azımsama (*underestimation*) hatalarını gösterdiği en uç örnekler (sırasıyla WSI 5 ve WSI 13) görülmektedir.

5 TARTIŞMA

Bu çalışma, 30 milyonun üzerinde nükleer tespit nesnesinin dahil edildiği bir çalışma olup, literatürde hematoksilin & eozin boyalı görüntülerde bu tür bir ikili sınıflama problemini irdeleyen en büyük örneklerden biri niteliğindedir. Elbette ki bunda, hücre nükleuslarının manuel olarak değil, tüm tespitlerinin nükleus olarak kabul edildiği bir yazılım kullanılarak saptanması ve referans standardın, kesitlerin İHK karşılığında pozitif (kahverengi kromojen ile boyanmış) nükleusların sayımına dayanmaktadır. Normal koşullarda, İHKsal biyobelirteçlerin otomatize sayımı başlı başına birçok görüntü analizi araştırmasının konusudur.⁶² Bu çalışmada ise, tümör hücre nükleuslarını, tümör dışı hücre nükleuslarından ayıracak biçimde ve difüz boyayan p53 ve PAX8 belirteçleri, tek bir boya kanalı (DAB) ile eşik değer belirlemek için yeterli olmuştur. Literatürdeki çalışmalarda geliştirilen sınıflama modellerin başarısı, büyük oranda nükleusların tek tek sayılması ile ölçülmektedir. Bunun WSI örneklerde yapılmasının imkânsız olduğu tahmin edilebilir. Bu nedenle geliştirilen modeller, validasyon ya da test görüntülerde başarısı gözlense dahi, gerçek dünyayı yansıtan WSI örneklerinde kullanımlarına dair bir çekince mevcuttur. Bu çalışmanın ilk önerisi, model başarısının WSI örneklerde değerlendirilmesi için tıpkı bu çalışmada olduğu gibi patolojca difüz pozitif boyandığı gösterilen biyobelirteçlerin denenmesidir.

Bu çalışmada algoritmanın eğitim sürecinde, başarı metrikleriyle değerlendirilen ön-modeller içerisinde test grubunda kullanılan model, bias-varyans dengesi gözetilerek seçilmiştir.⁵² Bias ve varyans kavramları, Ek-1 bölümünde yer alan bir karar ağacı ve rassal orman deneyi üzerinden gösterilmiştir. Bölüm 4.2'nin ilk paragrafında, modelin eğitildiği set ile validasyon setindeki başarı metriklerinin farkı görülebilir. Beklendiği üzere, model kendi eğitildiği sette validasyon setine kıyasla daha yüksek başarı sağlamıştır. Buna karşın, görüntü setlerinde gerçek tümör hücre oranı ile modelin tahmin ettiği hücre oranına bakıldığında, validasyon setindeki mutlak hata sadece %0,27 olup eğitim setindeki %5,54'lük orandan daha başarılı bir sonuç vermiştir. Modelin validasyon setinde, sınıflama metriklerindeki başarısının daha geride kalmasına rağmen tümör hücre yüzdesi hesabında daha başarılı olmasının

sebebi, bu çalışma ve tümör hücre yüzdesinin otomatize edilmesine yönelik başka çalışmalardaki⁶⁶ bir limitasyondan kaynaklanmaktadır. Bu bölümde, çalışma metodolojisinin yarattığı söz konusu limitasyonun bu ve benzer şekilde kurgulanan çalışmalarda nasıl yönetilebileceğine dair çıkarımlara ağırlık verilmiştir.

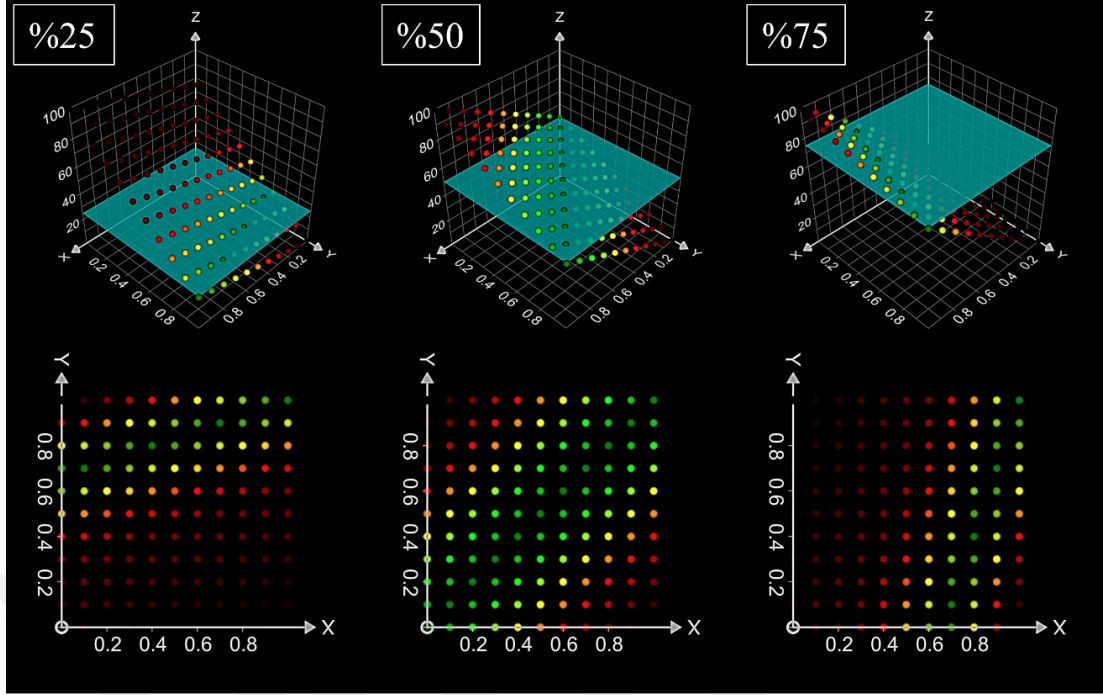
Öncelikle esas olarak sınıflama problemini konu alan mevcut çalışmada, model başarısının regresyon analizine ilişkin metrikler (MAE, RMSE vb.) haricinde değerlendirilemeyeceği söylenebilir. Bölüm 4.2’de verilen validasyon sürecine ilişkin metriklerde, eğitim setinde geliştirilen modelin validasyon setindeki başarısı görülebilir. Buna karşın, test setinde yer alan WSI örnekleri üzerinden hata matrisi metriklerine ilişkin yorum yapmak, metodolojinin doğası gereği mümkün olmamıştır. Bu tip çalışmalarda sadece korelasyonun değerlendirilmesi, beraberinde bazı olası yorumlama hataları getirebilir. Bu noktada, bu tez çalışmasının kapsamında bir istatistik tartışması gerekliliğinin olduğu düşünülmüştür. Bunun için öncelikle, gerçek ve modelin tahmin ettiği tümör hücre oranlarının hata matrisi üzerinden hesabı belirtilmelidir:

$$\text{Gerçek Tümör Hücre Oranı} = \frac{\text{GP} + \text{YN}}{\text{TOPLAM}} \quad \text{Model Tümör Hücre Oranı} = \frac{\text{GP} + \text{YP}}{\text{TOPLAM}}$$

Bu eşitliklerden yola çıkarak şu denklemi kurmak mümkündür:

$$\text{Model} = \text{Gerçek} \times \text{sensitivite} + (1 - \text{gerçek}) \times (1 - \text{spesifite})$$

Bu denklem göz önüne alındığında, bir algoritma üzerinden hesaplanacak tümör hücre oranının, gerçek tümör hücre oranı ve o örnekteki sensitivite/spesifiteleri ile ilişkisi gözlenebilir. Bu durumun çıktıları, Şekil 15’te verilen grafikler üzerinden yorumlanmıştır.



Şekil 15. Tümör hücre yüzde modelleri.

Sensitivite x , spesifite y , modelin öngöreceği tümör hücre yüzdesi z koordinatları ile gösterilmiştir.

Üst sıradaki üç boyutlu grafikler, gerçek tümör hücre oranları sırasıyla %25, %50 ve %75 olan örneklerde, algoritmaların değişen sensitivite ve spesifite oranlarında öngöreceği tümör hücre yüzdeleri göstermektedir. Gerçek tümör oranıyla aynı tahminlerin bulunması gereken alan mavi düzlemler ile gösterilmiştir. Alt sıradaki iki boyutlu grafikler ise, sensitivite ve spesifite koordinatlarını içeren düzlemdeki izdüşümleri yansıtmaktadır. İsaletli tahminler yeşil noktalarla temsil edilmiş olup, çevreye saçılan noktalar artan mutlak hata ile ilişkilidir.

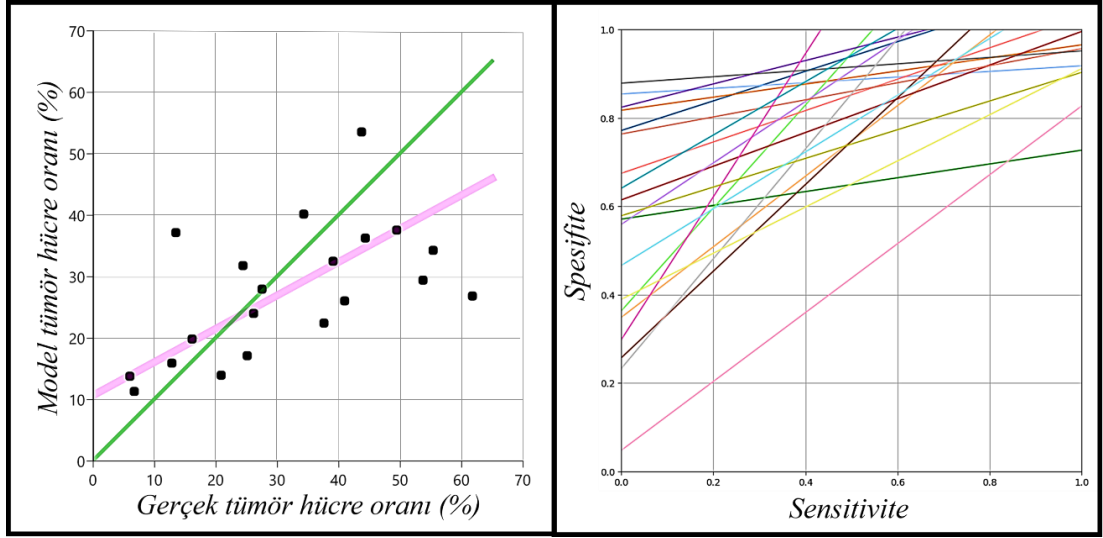
Bu denklem ve grafiklerden hareketle şu çıkarımlar yapılabilir:

- Gerçek tümör hücre oranının %50 veya civarında olduğu örneklerde, modelin başarılı tahmini için geniş bir tolerans aralığı mevcuttur. Öyle ki, sensitivite ve spesifitenin düşük, ancak birbirine yakın olduğu noktalarda dahi çok başarılı bir tahmin yapılabilir.
- Öte yandan gerçek tümör hücre oranı %50'den saptıkça isabetli tahmin için gerekli sensitivite ve spesifite değerleri, hem daha ufak bir alana sınırlanmakta hem de

aralarındaki makas arttıkça mutlak hatayı daha da belirgin şekilde derinleştirmektedir. Bu da gerçek tümör hücre oranının hangi yöne saptığına göre değişkenlik göstermektedir.

- Gerçek oran düştükçe (bkz. Şekil 15'teki %25 grafiği), başarılı tahmin için spesifite daha önemli hâl almaktadır. Sensitiviteyi karşılayamayan bir spesifite, modelin gerçekte olduğundan daha yüksek bir tümör hücre oranı öngörüsüyle sonuçlanacaktır.
- Gerçek oran yükseldikçe (bkz. Şekil 15'teki %75 grafiği), isabetli tahmin için sensitivite ön plana daha fazla çıkmaktadır. Spesifiteyi yakalayamayan bir sensitivitede, model tümör hücre oranını bu kez olduğundan daha düşük tahmin edecektir.

Bu değerlendirmelerin mevcut çalışma verileri üzerinden yorumlanması için Şekil 16'daki grafikler incelenebilir.



Şekil 16.1. İdeal model ve öngörülen model yüzdeleri.

Test grubundaki 20 WSI örneği, tümör hücre yüzdelerinin referans değerleri ile model tahminlerine göre konumlandırılmıştır. Kusursuz çalışan bir modelde noktalar yeşil çizgi üzerinde yerleşmelidir. Her bir örnekteki mutlak hata, noktaların bu çizgiye dikey eksenindeki mesafesinin ölçümüne dayanır. Grafikteki pembe çizgi ise, modelin validasyon setindeki sensitivite ve spesifite değerlerine göre, aynı morfolojide nükleuslar içerdiği varsayılan, farklı eşik değerlerinde tümör hücre yüzde ölçümlerinde model tahmininin bulunması gereken konumu göstermektedir. Bu çizgiden sapan noktalar için yapılabilecek öncelikli yorum, modelin eğitiminde kullanılan veri setinin bu test örneklerindeki nükleer morfolojiyi temsil etmek için yetersiz olduğudur.

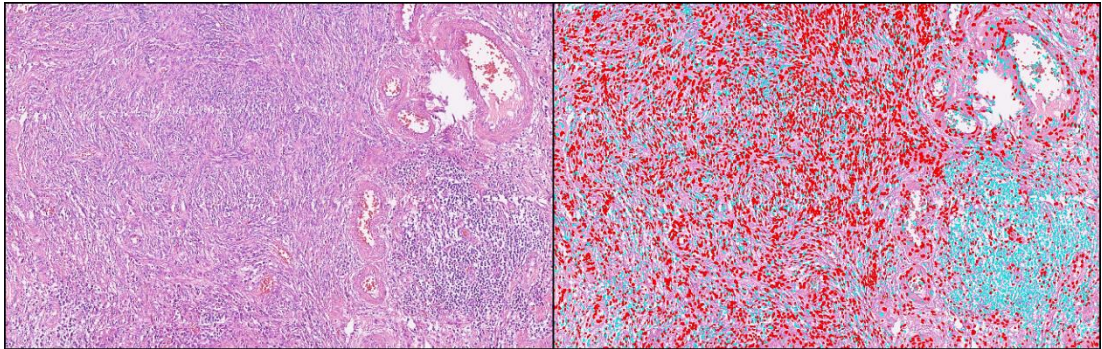
Şekil 16.2. Modelin test örneklerindeki olası sensitivite ve spesifite değerleri.

Bu grafik, test grubundaki her bir WSI örneğinde, referans değerler ile model tahminlerine göre, modelin ilgili test lamındaki tüm olası sensitivite ve spesifite değerlerini içermektedir. Spesifitenin alabileceği minimum değerlerin ortalaması 0,55 olup, örneklerin dört tanesinde (%20) bu değerler 0,8'in üzerindedir. Bunun tersi olarak sensitivitenin alabileceği maksimum değerlere bakıldığında, örneklerin sekiz tanesinde (%40) bu değerler 0,8'in altında kalmaktadır. Modelin spesifiteye eğiliminin, sensitiviteye göre daha fazla olduğu açıktır. Bu durum, validasyon sürecinde seçilen algoritmada, spesifitenin sensitiviteye göre öncelenmesi ile paralellik göstermektedir.

Moleküler patolojik incelemelerin öncesinde, tümör hücre oranını artırmak için sıklıkla makrodiseksiyon yapılmaktadır. Bu çalışmadaki test örneklerinin bir kısmı da moleküler çalışma öncesinde makrodiseksiyona tabi tutulmuştur. Ancak hem tümör hücre yüzdesi çeşitliliğini artırmak, hem de özellikle hatalı değerlendirmenin daha kritik sonuçlara yol açtığı düşük tümör hücre yüzdelerinin de temsil edilmesi adına çalışma WSI örneklerde yapılmıştır. Bunun yanı sıra, makrodiseksiyon için yapılan anotasyonlar da tıpkı tümör hücre yüzdesi tahminleri gibi patologlar arasında belirgin farklılıklar gösterebilmekte olduğu, literatürdeki diğer çalışmalarda gösterilmiştir.⁶⁷

Model başarılarının WSI seviyesindeki gibi büyük ölçeklerde değerlendirilmesi için, bir veri görselleştirme metodu olan “ısı haritaları” kullanılabilir.⁶⁸ Bulgular bölümünde verilen ısı haritaları (Resim 10), modelin başarısının iç yüzüne yönelik bir gözlem sağlamak amacıyla sunulmuştur. Bu haritaların kantitatif kıyaslanmasına yönelik algoritmalar mevcuttur⁶⁹, ancak bu kadar büyük çaptaki görüntülerde güvenilir bir veri sağlamak için ciddi bir uğraş gereklidir. Örneğin, hücreliliğin belirgin heterojenite gösterdiği WSI 8 gibi bir örnekte (bkz. Resim 10), modelin nükleer düzeydeki tahminlerinin doğruluğunu araştırmak, ancak yüksek çözünürlükte bir inceleme ile mümkündür. Bu çalışmadaki test seti, içerdiği yaklaşık 115 cm² boyutunda doku kesiti ile toplamda 166 milyarın üzerinde pikselden oluşmaktadır. Kimi nükleusun ise yalnızca birkaç piksellik alan kapladığı göz önüne alındığında, bu tip bir analizin, nükleus sayımına yönelik kullanımı, incelikli bir kalibrasyon ve hesaplamayı gerektirmektedir.

Bu çalışmanın eğitim ve validasyon sürecindeki görüntü korlarının seçiminde, nükleer çeşitliliğin azami düzeyde tutulması hedeflendiyse de test lamalarının bir kısmında bunun yeterli olmadığı aşikardır. Örneğin tümör oranının referansa kıyasla en fazla hesaplandığı WSI 5 (bkz. Resim 10), aynı zamanda ovaryan stromayı diğer tüm örneklerden çok daha fazla oranda içerdiği görülmektedir. (Resim 11)

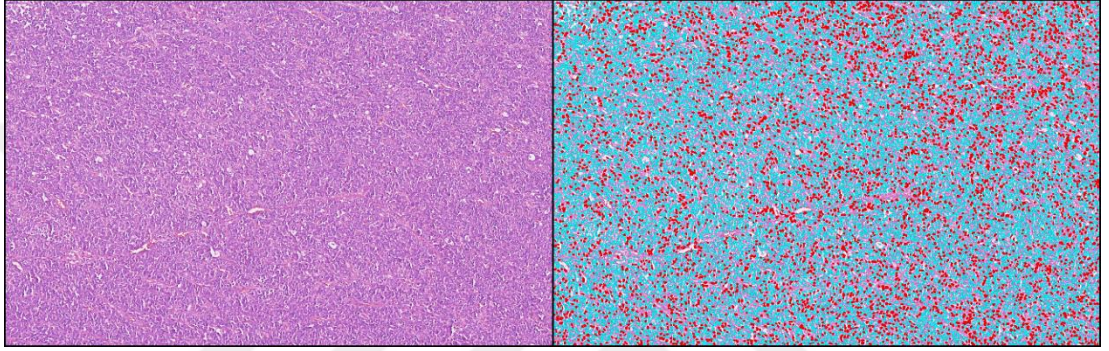


Resim 11. Abartma (*overestimation*) hatasının en yüksek olduğu örnek: WSI 5.

H&E görüntüsü verilen ve tümör içermeyen bu ovaryan stroma alanında, modelin önemli miktarda stromal hücreyi tümör olarak sınıfladığı (kırmızı renkli nükleuslar) izlenmektedir.

Makine öğrenmesi algoritmalarının geliştirilmesinin temelinde, çeşitli varyasyonları içeren durumlara karşı gösterebildiği adaptasyonu artırma hedefi yatmaktadır. Bu çalışmaya eğitim, validasyon ve test süreci için dahil edilen örnekler;

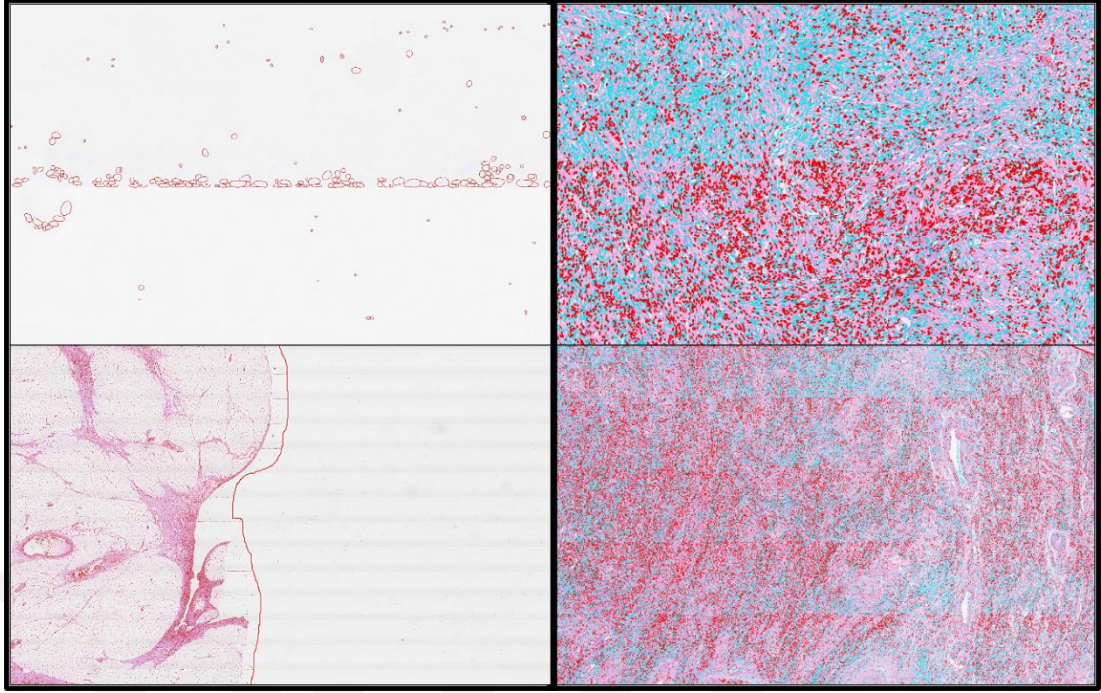
doku takibi, kesit ve boyama prosedürlerinin standardize olduğu Acıbadem Patoloji Laboratuvarlarından kompleksine aittir. Bunun tek istisnası olan WSI 13, doku takibi dış merkezli bir başka laboratuvarda yapılmış ve konsültasyon amacıyla gönderilen parafin blokların, kesit ve boyaması laboratuvarımızda yapılan örneklerinden elde edilmiştir. Modelin, tümör oranını gerçeğe kıyasla düşük hesaplamasının en aşırı örneğini oluşturan WSI 13, aynı zamanda test lamaları içindeki en yüksek (%35) mutlak hatanın görüldüğü örnektir. (Resim 12)



Resim 12. Azımsama (*underestimation*) hatasının en yüksek olduğu örnek: WSI 13.

H&E görüntüsü verilen ve hücreliliği yüksek bu tümör alanında, modelin önemli sayıda tümör hücrelerini tümör dışı olarak sınıfladığı (mavi renkli nükleuslar) izlenmektedir.

Doku takip, boyama ve dijitalizasyon işlemlerindeki değişimler, görüntü analizi açısından önemli farklılıklar yaratabilir.^{44, 55, 56} Farklı laboratuvarlar arasındaki doku takip ve boyama prosedürlerinin ölçümsel düzeyde ne kadar büyük farklılıklar yaratabileceğine ilişkin gözlemler literatürde yer almaktadır.⁷⁰ Meme kanseri üzerine yaptıkları çalışmada Beck ve ark., eğitimi sadece kendi enstitülerindeki dokular üzerinden gerçekleştirdikleri takdirde, bağımsız bir başka hastanedeki örnekler üzerinde çalıştırılan modellerinin, anlamlı derecede başarısızlık gösterdiğini bildirmiştir.⁷⁰ H&E boya yoğunluklarının ve artefaktların derin öğrenme modellerinin başarısını ne denli etkileyebileceğini araştırdıkları bir başka çalışmada, Schömig-Merkiefka ve ark., prostat kanserini tanımak üzerine eğittikleri modelin başarısının, görüntüler üzerinde yapay olarak oluşturdıkları varyasyonlarla belirgin ölçüde azaldığını göstermiştir.⁷¹ Mevcut çalışmada da dijital artefaktların görüntü analizi için yaratabileceği problemler gözlenmiş olup Resim 13'te örneklenmiştir.



Resim 13.1. Dijital artefakt kaynaklı nükleer tespit hatası.

Üstteki görüntüde nükleer tespit yazılımının boş bir zeminde çok sayıda -sözde- nükleus tespitleri görülmektedir. Daha küçük büyütme incelendiğinde ise, bu nükleer tespit hatalarının dijital cihazın taramasından kaynaklı bir artefakta bağlı olduğu görülebilir.

Resim 13.2. Dijital artefakt kaynaklı nükleer sınıflama hatası.

Tümör hücresi içermeyen myometriuma ait bu görüntülerde, modelin çok sayıda nükleusu hatalı şekilde tümör olarak sınıfladığı görülebilir. Dijital artefaktın bu kez de nükleer sınıflama sonuçlarına etkidiği, kırmızı nükleus yoğunluklarının keskin çizgilerle değişmesinden anlaşılabılır.

Yukarıdaki şekillerde görülen tespit ve sınıflama kusurları, optik dansite ilişkili değerlerin artefakt kaynaklı varyasyonlarıyla açıklanabilir. Bu hataların yorumlanabilmesi için, yapay zekâ algoritmalarının önemli bir bileşeni olan “özellikler” kavramına dönülmelidir. Bölüm 2.3, Şekil 2’de detaylıca açıklanan nesne düzeyindeki özelliklerin önemli bir kısmı, mevcut çalışmadaki rassal orman algoritmasının eğitiminde yer almıştır. Her bir nükleus için hesaplanan, toplamda 78 özelliğin arasında, boyutsal ve biçimsel temel birkaç özelliğin haricindeki çoğu özellik, nesnelerin içerdiği piksellerin spesifik boya veya yoğunluk kanallarındaki değerlerine dayanmaktadır.

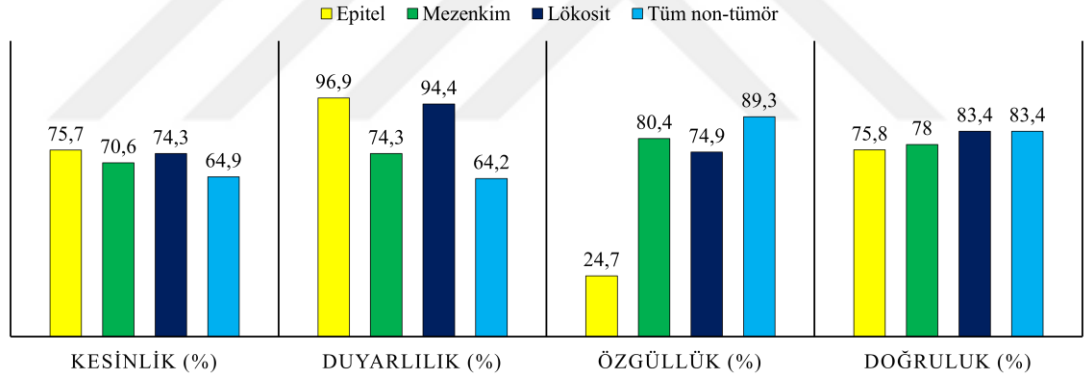
Bu özelliklerin, nükleer içerikle biyokimyasal düzeyde bir ilişkisi olduğu düşünülebilir. Söz gelimi, bir hücredeki kromatin içeriğinin artışı sonucu gözlenen bazofilinin dijital patolojideki karşılığı, mavi renk kanalındaki veya bu çalışmada

olduğu gibi renk dekonvolüsyonu ile oluşturulan hematoksilen kanalındaki piksel değerlerinin yüksek olduğudur. Buradan yola çıkılarak, bir lenfositteki “kaba kromatin” tanımının hematoksilen kanalındaki ortalama değer artışıyla ya da bir tümör hücresindeki “nükleer düzensizliğin” optik kanallardaki standart sapma yüksekliğiyle sonuçlanacağı öngörülebilir. Nitekim Şekil 8’de tüm nükleus sınıfları içerisinde en yüksek hematoksilen ortalamasının lökositlerde olduğu veya yine benzer şekilde, tümör nükleuslarının her üç kanaldaki standart sapma değerlerinin epitel nükleuslarına göre yüksek olduğu görülebilir.

Doku ve hücrelerin ölçümsel düzeydeki bu karmaşıklığı, görselleri işlemeye yönelik özelliklerin, bir kısmı alakasız ve işlem sürecini aksatacak özellikleri de içeren geniş bir veri seti içerisinde seçme problemini doğurmaktadır. Buna dijital patolojideki veri yükünün devasa hacmi de eklendiğinde, sınıflama problemlerinin verimliliğini örseleyen bir kavram olan “boyutsallık lanetini (*curse of dimensionality*)” de beraberinde getirmektedir.^{7, 53} Bu çalışmada her bir nükleus için hesaplanan 78 özellik, bu sınıflama probleminin 78 boyutlu bir uzayda ele alındığı anlamına gelir.

Mevcut çalışmada, algoritmanın eğitimi için nükleuslar üzerinden hesaplanan tüm özellikler, herhangi bir ayıklama yapılmaksızın kullanılmıştır. Bunun bir sebebi, herhangi bir özellik ekstraksiyonu yöntemi ile seçilecek özelliklerin gündelik patoloji pratiği üzerinden yorumlanmasının güçlüğüdür. Bölüm 4.1’de paylaşılan bulgular, histopatolojideki karşılıkları en yorumlanabilir 12 özelliğe aittir. Alan, çevre uzunluğu, maksimum ve minimum çap gibi boyut ölçümlerinde tümör nükleuslarının belirgin şekilde yüksek değerlere sahip olması, seröz karsinom nükleuslarının pleomorfizmi düşünüldüğünde kolaylıkla açıklanabilir bulgulardır. Öte yandan yine beklendiği üzere bu ölçümler kendi aralarında da korelasyon göstermektedir. Dolayısıyla bu ve diğer tüm ölçümlerin, nükleus sınıflamasında bir veri gürültüsü yaratıp yaratmadığı ve içlerinden bazı özelliklerin çıkarılmasının sınıflayıcının performansını artırıp artırmayacağı, bu çalışmanın dışında tutulan ileri bir araştırmanın konusudur. Özellik seçimi için ek bir uğraş gösterilmemesinin ikinci sebebi ise, bu çalışmada sınıflama için kullanılan rassal orman algoritmasının, veri gürültüsü ve yüksek veri boyutunun yaratabileceği problemlere dirençli şekilde tasarlanmış olmasıdır.⁵²

Bu çalışma, esas olarak tümör ile tümör dışı hücre nükleuslarını sınıflandırma problemini konu etmektedir. Dijital patolojideki sınıflandırma çalışmalarının önemli bölümüne hâkim olan bu ikili sınıflama çabası, işlevsellik hedeflerine uygunluk göstermekle beraber, histopatoloji bilimindeki karmaşık içeriğin oldukça indirgenmiş bir formunu yansıtmaktadır.⁷² Tüm histoteknik ve dijital süreçlerin evrensel olarak standardize edildiği -şimdilik- ütöpik bir senaryoda dahi, insan hücrelerinin sınırsız morfolojik çeşitliliği, sınıflama problemi için başlı başına bir güçlük oluşturmaktadır. Bu nedenle literatürdeki çalışmalar, genellikle tek bir organ ya da doku düzeyindeki spesifik problemleri konu etmektedir.⁷³ Mevcut çalışmada bu tutum kısmen aşılıarak, sınıflama problemi bu dual yaklaşımın ötesinde de irdelenmiştir. Şekil 17’de, validasyon sürecindeki hiperparametrelere ek ayar yapılmaksızın, tümör dışı alt sınıfları filtrelenerek oluşturulan alternatif modellerin tümör ile ilgili alt sınıfı ayırma başarıları gösterilmiştir.

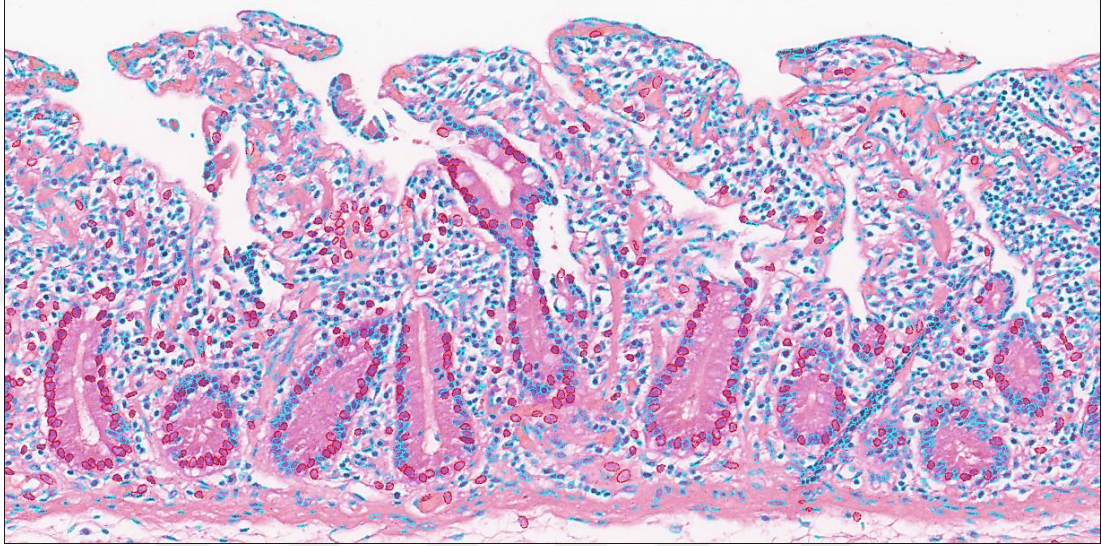


Şekil 17. Tümör dışı hücre alt sınıflarına yönelik alternatif modeller.

Grafikteki açık mavi (son) sütunlar, test lamalarına uygulanmak üzere seçilen modelin; öteki sütunlar ise, tümör ile sadece ilgili tümör dışı alt sınıfı hesaba katılarak oluşturulan modellerin validasyon setindeki başarı metriklerini göstermektedir.

Bu grafik, birçok ölçüm düzeyinde birbirinden keskin farklar gösteren (bkz. Tablo 1 ve Şekil 8) epitel, mezenkim ve lökosit sınıflarının tek bir “tümör dışı” sınıfında toplanmasının problematik sonuçlarını yansıtmaktadır. Örneğin, yukarıdaki grafikte kolaylıkla göze çarpacağı üzere, tümör ile epitel sınıflamasında, yanlış pozitif hatasının oldukça yüksek olduğu görülebilir. Burada parantez açılarak, bu sınıflama sonuçlarının veri hacimleri arasındaki fark ile de ilişkili olduğu not düşülmelidir. Yine de genel patoloji pratiğinde, non-neoplastik epitel hücrelerinin karsinom hücreleri ile

benzerliği bilindik bir konudur. Örneğin kolorektal adenokarsinomlarda tümör hücre yüzdesinin otomatize hesaplanmasına yönelik çalışmalarında, Viray ve ark. non-neoplastik epiteli bu sebeple çalışma dışı bırakmıştır.⁶⁶ Bu çalışmada da benzer gözlemler yapılmış olup, bir örneği Resim 14'te görölebilir.



Resim 14. Tümör dışı epitel hücrelerinde yanlış pozitif hatası.

Modelin en yüksek başarısını gösterdiği WSI 7 lamina ait bu görüntüde, yalancı pozitif hataların özellikle intestinal epitel hücrelerini seçtiği dikkati çekmektedir.

Dijitalize doku örneklerinin multisistemik ve kapsamlı morfofonksiyonel sınıflandırılmalarına yönelik veri setleri oluşturma çalışmalarına, dokulara ait görüntü yamalarının 7 ana grup ve 3 hiyerarşik seviyede sınıflandığı *Dijital Patoloji Atlası*⁶⁸ ve nükleusların piksel düzeyinde 5 ana grup ve 3 hiyerarşik seviyede sınıflandığı *PanNuke*⁷³ veri setleri örnek gösterilebilir. Nükleer sınıflama probleminin 4'lü şekilde ele alındığı çalışmalar için ise kolorektal karsinom görüntülerinde *epitel*, *inflatuvar hücre*, *fibroblast* ve *diğer* şeklinde sınıflandığı bir başka çalışma örnek verilebilir.⁷⁴ Ancak tüm bu çalışmalar, histopatolojideki geniş görünüm çeşitliliğinin çok küçük bir dilimini oluşturmaktadır. Seröz karsinom gibi malignitelerin birçoğunda izlenen pleomorfizm bir yana, non-neoplastik hücre sınıfları da kendi aralarında değişen ölçülerde morfolojik varyasyonlar gösterebilmektedir. Dijitalize görüntülerin, dokuları genellikle 2 boyutlu olarak temsil etmesi bu görünüm çeşitliliğini daha da pekiştirmektedir. Görüntü düzlemine farklı açılarla düşen nükleuslar, dijital görüntü

perspektifinde gerçekte olduklarına göre daha büyük ölçümsel farklılıklar gösterebilir. Bu durum kısmen, Z-yığın (*Z-stack*) yöntemiyle aşılabiliyor olsa da⁴⁹, geleceğe yönelik hedefler 3D patoloji ve radyoloji-patoloji füzyonu gibi yöntemlerin edinilmesine sinyal vermektedir.⁷⁵

Bu çalışmadaki en önemli limitasyonun, sınıflama performansı sonuçlarının test setinde ancak regresyon metrikleri ile değerlendirilebilmesi olduğu düşünülmüştür. Tümör hücre yüzdesinin hesaplanmasına ilişkin otomatize modellerin başarılarının daha sağlıklı biçimde incelenmesi ve hata kaynaklarının daha kolay saptanabilmesi için, ilgili modelin farklı eşik değerlerde tümör hücre yüzdesi içeren örneklerde denenmesi ve karşılaştırılması gereklidir. Bu konuda ve ayrıca çoklu sınıflama problemleri konusunda, mevcut olan ya da geliştirilebilecek olan istatistiki metotların tartışması, bu tezin kapsamının fazlaca ötesinde kalmaktadır.

Histopatolojide teknik ve dijital artefaktlar dahil, görüntü analizinde problem yaratan çeşitli hata kaynaklarının giderilmesine yönelik birkaç literatür önerisi şu şekilde sıralanabilir: Veri setlerinde sentetik artefaktlar oluşturarak model başarısının incelenmesi ve buna uygun stratejiler geliştirilmesi için kalite kontrol stres testlerinin yapılması⁷¹; modellerin çalışma prensiplerinin derinlemesine incelenmesi için deterministik sınıflamaların yanı sıra, modelin atadığı sınıfta ne kadar kararlı ya da kararsız olduğunun ayrıca ölçülmesi⁷⁶; laboratuvarların dijital patoloji çalışma akışına entegre edilmesi için üretilen dijital kalite kontrol aygıtları⁷⁷. İnsan eliyle veya makine öğrenmesiyle yapılan ve makine öğrenmesi için sıklıkla ön koşul olarak konulan renk normalizasyonlarının ise, sınıflama performansını -genel kabulün aksine- her zaman olumlu etkilemeyebileceğine yönelik gözlemler de buraya not düşülmelidir.⁷⁸

Veri boyutsallığının yaratacağı problemleri aşmak için yapılması gereken *özellik seçimi* ya da *ekstraksiyonu* için önerilen çeşitli metotlar arasında şunlar sayılabilir: Yapılacak sınıflamanın geçerliliğini esas alarak veri setine özellik ekleyen ya da veri setinden özellik çıkaran “ileri ardışık ayıklama (*SFS*)” ve “geri ardışık ayıklama (*SBS*)” gibi *sezgisel algoritmalar*; “esas bileşen analizi (*PCA*)”, “bağımsız

bileşen analizi (ICA)” ve “lineer diskriminant analizi (LDA)” gibi *lineer boyutsallık indirgeme* metotları; yine veri boyutsallığını azaltmaya yönelik, ancak boyutların geometrik yapısını koruyan “grafik yerleştirme” gibi non-lineer *manifold öğrenme metotları* sayılabilir.⁷

Mevcut çalışmanın kendisi de dahil olmak üzere, görüntü analizi ve yapay öğrenme yöntemlerinin geliştirilmesi, kıyaslanması ya da genelleştirilmesi, mümkün olduğunca fazla çeşitte işlenebilir veriyi içeren görüntü kaynaklarını gerektiren bir uğraşı temelinde olmaktadır. Bu da beraberinde, etiketlenmiş (anote edilmiş) geniş görüntü setlerinin varlığını gerektirmektedir ki bu tür kaynakların patoloji içerisindeki erişime açık örnekleri oldukça az sayıdadır. Bu durum patolojide yapay zekâ üzerine olan literatürde, üzerinde en sık durulan limitasyon konusudur.^{60, 72}

Bugün histopatolojide de altın standart kabul edilen ve bu alanda bir devrim noktası olarak atfedilen evrimsel sinir ağı tabanlı patern tanıma çalışması⁷⁹ ve daha birçok başkası, “meydan okuma” adı altında görüntü analizi konusunda periyodik yarışmaların düzenlenmesi için sunulan ImageNet⁸⁰ gibi geniş görüntü veri tabanları zemininde başarılmıştır.⁸¹ Bunun dijital patolojideki karşılığına, anote edilmiş 13 binden fazla nükleus içeren veri seti⁸² üzerinden yapılan çok-organlı nükleus segmentasyon yarışması (MoNuSeg) örnek gösterilebilir.⁴⁴ Makine öğrenmesi metotlarının geliştirilmesine dayanak oluşturacak bu kapsamlı veri setlerinin hazırlanmasında, derin öğrenme metotlarının kullanılmıştır. Derin öğrenme, anotasyon ya da etiketlemeyi gerektirmemesi itibarıyla, veri setleri oluşturmada insan uğraş ve zamanını tasarrufa götürecek cazip bir alternatif olarak görünmektedir.⁶⁰ Bu yöntemlere yönelik en önde gelen eleştiri ise, yapay zeka algoritmalarının açıklanabilirliğe karşı opak oluşudur.^{49, 56} Bu duruma gönderme olarak söylenegelen yapay zekanın *kara kutusu* (*black box*) bazı yeni yaklaşımlarda yerini “açıklanabilir yapay zeka”nın *cam kutusuna* (*glass box*) bırakmıştır.⁸³ Son olarak, insan değerlendirmesinin tıp dünyası başta olmak üzere hala birçok noktada altın standart oluşu, insan bilincini saf dışı bırakan “artificial intelligence” kavramının bazı noktalarda yerini “intelligence augmentation” kavramına bırakmaktadır.⁸³

6 SONUÇLAR

 Bu çalışmada toplam 100 hastaya ait YDSK içeren lamaların dijital görüntüleri kullanılmıştır. 80 hastaya ait görüntüler, eğitim (n=40) ve validasyon (n=40) setlerinde yer almış olup, bu setlerde toplam 11.454 nükleus tümör (YDSK) ve tümör dışı olarak sınıflandırılmıştır. Sınıflama, rassal orman algoritmasının eğitimi için kullanılmış ve algoritmanın hiperparametrelerine ayar yapılarak çok sayıda ön model geliştirilmiştir.

 Çapraz validasyon temelinde değerlendirilen ön modeller arasında, başta F1 ve F0.5 metrikleri olmak üzere ikili sınıflama başarı metrikleri doğrultusunda en başarılı bulunan ön model test grubuna uygulanmak üzere seçilmiştir. Test grubu 20 hastaya ait tümör içeren WSI lamalarından oluşmuştur. Geliştirilen model YDSK içeren 20 WSI örneğinde tümör hücre yüzdesinin hesaplanması için test edilmiştir. Modelin test örneklerindeki mutlak hatalarının ortanca değeri %7,9, ortalaması ise %11'dir. Bu oranlar, literatürde çeşitli tümörlerdeki tümör hücre yüzdesi hesaplanmasında patolojik gözlemleriyle kıyaslandığında kabul edilebilir düzeyde olmakla beraber, bazı örneklerde %35'e ulaşan büyük sapmalar, algoritmanın eğitim süreci için daha fazla nükleus kullanılması gerektiğini göstermiştir.

 Tümör hücre yüzdesinin ve diğer kantitatif incelemelerin, gerçek hayat tecrübesini yansıtmaları açısından WSI lamalarında kullanılabilmesi için, hedef nükleus grubunu immünohistokimyasal yöntemle ayırt etmek bir çözüm sağlayabilir. Buna ek olarak ısı haritaları gözlemsel veri sağlamak için kullanılabilir.

 Bu tür yaklaşımlarda, güvenli bir başarı ölçümü sağlamak için kullanılan metriklerin titizlikle seçilmesi gereklidir. Ayrıca, sonuçlar mutlak hatalar temelinde değerlendirildiği takdirde, test edilen örneklerin olabildiğince farklı eşik değerlerde incelenmesi model başarısına güveni artıracaktır.

🧠 Nükleer ölçümlerin gruplar içinde ve gruplar arasında belirgin varyasyonlar göstermesi, dijital patoloji ve görüntü analizinde kullanılan sınıflama problemini, ikili sınıflamanın ötesinde daha sık tartışılması gerekliliğini düşündürmüştür.

🧠 Daha evrensel algoritmaların üretilebilmesinin önünde, dijital ve doku takip ilişkili artefaktlar bir sorun olarak durmaktadır; bunun çözümü için daha fazla görüntü işleme araştırmalarına ihtiyaç vardır.

🧠 Erişime açık örnekleri, hala az sayıda olan dijital görüntü kaynakları artırılmalıdır. Buna ilave olarak standardize nükleer ölçümlerin de bu türden geniş veri setlerine eşlik etmesi, sınıflama problemi için daha pratik yaklaşımlar getirebilir.

7 KAYNAKLAR

1. Hajdu SI, Darvishian F. A note from history: landmarks in history of cancer, part 5. *Cancer*. 2013 Apr 15;119(8):1450-66. doi: 10.1002/cncr.27889. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23288652.
2. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol*. 2018 Nov 13;9:1300. doi: 10.3389/fphar.2018.01300. PMID: 30483135; PMCID: PMC6243123.
3. Stern M, Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Apr;54(1):11-29. doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.10.011. PMID: 15780905.
4. Carrasco-Ramiro F, Peiró-Pastor R, Aguado B. Human genomics projects and precision medicine. *Gene Ther*. 2017 Sep;24(9):551-561. doi: 10.1038/gt.2017.77. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28805797.
5. Shen D, Wu G, Suk HI. Deep Learning in Medical Image Analysis. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017 Jun 21;19:221-248. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044442. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28301734; PMCID: PMC5479722.
6. Weinstein RS, Graham AR, Lian F, Brauhut BL, Barker GR, Krupinski EA, Bhattacharyya AK. Reconciliation of diverse telepathology system designs. Historic issues and implications for emerging markets and new applications. *APMIS*. 2012 Apr;120(4):256-75. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02866.x. PMID: 22429209.
7. Gurcan MN, Boucheron LE, Can A, Madabhushi A, Rajpoot NM, Yener B. Histopathological image analysis: a review. *IEEE Rev Biomed Eng*. 2009;2:147-71. doi: 10.1109/RBME.2009.2034865. Epub 2009 Oct 30. PMID: 20671804; PMCID: PMC2910932.
8. Viray H, Li K, Long TA, Vasalos P, Bridge JA, Jennings LJ, Halling KC, Hameed M, Rimm DL. A prospective, multi-institutional diagnostic trial to determine pathologist accuracy in estimation of percentage of malignant cells. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Nov;137(11):1545-9. doi: 10.5858/arpa.2012-0561-CP. PMID: 24168492.
9. Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*. 2009 Sep;16(5):267-82. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa. PMID: 19700937; PMCID: PMC2745605.
10. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
11. <https://www.cancer.org/cancer/types/ovarian-cancer/about.html>
12. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jul;68(4):284-296. doi: 10.3322/caac.21456. Epub 2018 May 29. PMID: 29809280; PMCID: PMC6621554.

13. Salvador S, Gilks B, Köbel M, Huntsman D, Rosen B, Miller D. The fallopian tube: primary site of most pelvic high-grade serous carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2009 Jan;19(1):58-64. doi: 10.1111/IGC.0b013e318199009c. PMID: 19258943.
14. Vang R, Levine DA, Soslow RA, Zaloudek C, Shih IeM, Kurman RJ. Molecular Alterations of TP53 are a Defining Feature of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma: A Rereview of Cases Lacking TP53 Mutations in The Cancer Genome Atlas Ovarian Study. *Int J Gynecol Pathol*. 2016 Jan;35(1):48-55. doi: 10.1097/PGP.0000000000000207. PMID: 26166714; PMCID: PMC4696053.
15. Kuhn E, Kurman RJ, Vang R, Sehdev AS, Han G, Soslow R, Wang TL, Shih IeM. TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma--evidence supporting the clonal relationship of the two lesions. *J Pathol*. 2012 Feb;226(3):421-6. doi: 10.1002/path.3023. Epub 2011 Dec 23. PMID: 21990067; PMCID: PMC4782784.
16. Prat J; FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*. 2014 Jan;124(1):1-5. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.10.001. Epub 2013 Oct 22. PMID: 24219974.
17. Seidman, J.D., Ronnett, B.M., Shih, IM., Cho, K.R., Kurman, R.J. (2019). Epithelial Tumors of the Ovary. In: Kurman, R., Hedrick Ellenson, L., Ronnett, B. (eds) *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46334-6_14
18. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983 Feb;15(1):10-7. doi: 10.1016/0090-8258(83)90111-7. PMID: 6822361.
19. Hamilton CA, Cheung MK, Osann K, Chen L, Teng NN, Longacre TA, Powell MA, Hendrickson MR, Kapp DS, Chan JK. Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. *Br J Cancer*. 2006 Mar 13;94(5):642-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6603012. PMID: 16495918; PMCID: PMC2361201.
20. Zheng W, Xiang L, Fadare O, Kong B. A proposed model for endometrial serous carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*. 2011 Jan;35(1):e1-e14. doi: 10.1097/PAS.0b013e318202772e. PMID: 21164282.
21. Cancer Genome Atlas Research Network; Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013 May 2;497(7447):67-73. doi: 10.1038/nature12113. Erratum in: *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):242. PMID: 23636398; PMCID: PMC3704730.
22. Murali R, Delair DF, Bean SM, Abu-Rustum NR, Soslow RA. Evolving Roles of Histologic Evaluation and Molecular/Genomic Profiling in the Management of Endometrial Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018 Feb;16(2):201-209. doi: 10.6004/jnccn.2017.7066. PMID: 29439179; PMCID: PMC6639790.
23. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, Yang W, Senz J, Boyd N, Karnezis AN, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN. A clinically applicable molecular-based

- classification for endometrial cancers. *Br J Cancer*. 2015 Jul 14;113(2):299-310. doi: 10.1038/bjc.2015.190. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26172027; PMCID: PMC4506381.
24. León-Castillo A, de Boer SM, Powell ME, Mileschkin LR, Mackay HJ, Leary A, Nijman HW, Singh N, Pollock PM, Bessette P, Fyles A, Haie-Meder C, Smit VTHBM, Edmondson RJ, Putter H, Kitchener HC, Crosbie EJ, de Bruyn M, Nout RA, Horeweg N, Creutzberg CL, Bosse T; TransPORTEC consortium. Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy. *J Clin Oncol*. 2020 Oct 10;38(29):3388-3397. doi: 10.1200/JCO.20.00549. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32749941; PMCID: PMC7527156.
 25. Fader AN, Roque DM, Siegel E, Buza N, Hui P, Abdelghany O, Chambers SK, Secord AA, Havrilesky L, O'Malley DM, Backes F, Nevadunsky N, Edraki B, Pikaart D, Lowery W, ElSahwi KS, Celano P, Bellone S, Azodi M, Litkouhi B, Ratner E, Silasi DA, Schwartz PE, Santin AD. Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Versus Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Uterine Serous Carcinomas That Overexpress Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neu. *J Clin Oncol*. 2018 Jul 10;36(20):2044-2051. doi: 10.1200/JCO.2017.76.5966. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29584549.
 26. Armstrong DK, Alvarez RD, Backes FJ, Bakkum-Gamez JN, Barroilhet L, Behbakht K, Berchuck A, Chen LM, Chitiyo VC, Cristea M, DeRosa M, Eisenhauer EL, Gershenson DM, Gray HJ, Grisham R, Hakam A, Jain A, Karam A, Konecny GE, Leath CA III, Leiserowitz G, Liu J, Martin L, Matei D, McHale M, McLean K, Miller DS, Percac-Lima S, Remmenga SW, Schorge J, Stewart D, Thaker PH, Vargas R, Hendrickson AW, Werner TL, Zsiros E, Dwyer MA, Hang L. NCCN Guidelines® Insights: Ovarian Cancer, Version 3.2022. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022 Sep;20(9):972-980. doi: 10.6004/jnccn.2022.0047. PMID: 36075393.
 27. Sobel ME, Bagg A, Caliendo AM, Ladanyi M, Zehnbauser B. The evolution of molecular genetic pathology: advancing 20th-century diagnostic methods into potent tools for the new millennium. *J Mol Diagn*. 2008 Nov;10(6):480-3. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080113. Epub 2008 Oct 10. PMID: 18849354; PMCID: PMC2570629.
 28. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996 Mar;14(3):737-44. doi: 10.1200/JCO.1996.14.3.737. PMID: 8622019.
 29. Sainati L, Stella M, Montaldi A, Bolcato S, Guercini N, Bonan F, Ninfo V, Zanesco L, Basso G. Value of cytogenetics in the differential diagnosis of the small round cell tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol*. 1992;20(2):130-5. doi: 10.1002/mpo.2950200208. PMID: 1734218.
 30. Schlegel J, Bocker T, Zirngibl H, Hofstädter F, Rüschhoff J. Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a non-radioactive PCR-based screening technique. *Virchows Arch*. 1995;426(3):223-7. doi: 10.1007/BF00191358. PMID: 7773500.

31. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54. doi: 10.1038/nature00766. Epub 2002 Jun 9. PMID: 12068308.
32. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004 May 20;350(21):2129-39. doi: 10.1056/NEJMoa040938. Epub 2004 Apr 29. PMID: 15118073.
33. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*. 2005 Jan;2(1):e17. doi: 10.1371/journal.pmed.0020017. Epub 2005 Jan 25. PMID: 15696205; PMCID: PMC545207.
34. Dietel M, Sers C. Personalized medicine and development of targeted therapies: The upcoming challenge for diagnostic molecular pathology. A review. *Virchows Arch*. 2006 Jun;448(6):744-55. doi: 10.1007/s00428-006-0189-2. Epub 2006 Apr 22. PMID: 16736190.
35. Dijkstra JR, Heideman DA, Meijer GA, Boers JE, 't Hart NA, Diebold J, Hirschmann A, Hoefler G, Winter G, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Richman SD, Quirke P, Rouleau EL, Guinebretiere JM, Tejpar S, Biesmans B, van Krieken JH. KRAS mutation analysis on low percentage of colon cancer cells: the importance of quality assurance. *Virchows Arch*. 2013 Jan;462(1):39-46. doi: 10.1007/s00428-012-1356-2. Epub 2012 Dec 15. PMID: 23242173.
36. Lewandowska MA, Jóźwicki W, Żurawski B. KRAS and BRAF mutation analysis in colorectal adenocarcinoma specimens with a low percentage of tumor cells. *Mol Diagn Ther*. 2013 Jun;17(3):193-203. doi: 10.1007/s40291-013-0025-8. PMID: 23606169; PMCID: PMC3663254.
37. Boissière-Michot F, Lopez-Crapez E, Frugier H, Berthe ML, Ho-Pun-Cheung A, Assenat E, Maudelonde T, Lamy PJ, Bibeau F. KRAS genotyping in rectal adenocarcinoma specimens with low tumor cellularity after neoadjuvant treatment. *Mod Pathol*. 2012 May;25(5):731-9. doi: 10.1038/modpathol.2011.210. Epub 2012 Jan 27. PMID: 22282307.
38. Tol J, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Nagtegaal ID, Punt CJ, Van Krieken JH, Ligtenberg MJ. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *J Cell Mol Med*. 2010 Aug;14(8):2122-31. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00788.x. Epub 2010 May 13. PMID: 19453520; PMCID: PMC3823003.
39. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of

- KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn*. 2010 Jul;12(4):425-32. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090188. Epub 2010 Apr 29. PMID: 20431034; PMCID: PMC2893626.
40. Smits AJ, Kummer JA, de Bruin PC, Bol M, van den Tweel JG, Seldenrijk KA, Willems SM, Offerhaus GJ, de Weger RA, van Diest PJ, Vink A. The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Mod Pathol*. 2014 Feb;27(2):168-74. doi: 10.1038/modpathol.2013.134. Epub 2013 Jul 26. PMID: 23887293.
 41. Lhermitte B, Egele C, Weingertner N, Ambrosetti D, Dadone B, Kubiniek V, Burel-Vandenbos F, Coyne J, Michiels JF, Chenard MP, Rouleau E, Sabourin JC, Bellocq JP. Adequately defining tumor cell proportion in tissue samples for molecular testing improves interobserver reproducibility of its assessment. *Virchows Arch*. 2017 Jan;470(1):21-27. doi: 10.1007/s00428-016-2042-6. Epub 2016 Nov 16. PMID: 27853865.
 42. Dufraing K, De Hertogh G, Tack V, Keppens C, Dequeker EMC, van Krieken JH. External Quality Assessment Identifies Training Needs to Determine the Neoplastic Cell Content for Biomarker Testing. *J Mol Diagn*. 2018 Jul;20(4):455-464. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.03.003. Epub 2018 Apr 3. PMID: 29625250.
 43. Madabhushi A. Digital pathology image analysis: opportunities and challenges. *Imaging Med*. 2009;1(1):7-10. doi: 10.2217/IIM.09.9. PMID: 30147749; PMCID: PMC6107089.
 44. N. Kumar et al., "A Multi-Organ Nucleus Segmentation Challenge," in *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 39, no. 5, pp. 1380-1391, May 2020, doi: 10.1109/TMI.2019.2947628.
 45. Barold SS. Willem Einthoven and the birth of clinical electrocardiography a hundred years ago. *Card Electrophysiol Rev*. 2003 Jan;7(1):99-104. doi: 10.1023/a:1023667812925. PMID: 12766530.
 46. Goharinejad S, Hajesmaeel-Gohari S, Jannati N, Goharinejad S, Bahaadinbeigy K. Review of Systematic Reviews in the Field of Telemedicine. *Med J Islam Repub Iran*. 2021 Dec 29;35:184. doi: 10.47176/mjiri.35.184. PMID: 36042824; PMCID: PMC9391764.
 47. Bouabida K, Lebouché B, Pomey MP. Telehealth and COVID-19 Pandemic: An Overview of the Telehealth Use, Advantages, Challenges, and Opportunities during COVID-19 Pandemic. *Healthcare (Basel)*. 2022 Nov 16;10(11):2293. doi: 10.3390/healthcare10112293. PMID: 36421617; PMCID: PMC9690761.
 48. Park S, Parwani AV, Aller RD, Banach L, Becich MJ, Borkenfeld S, Carter AB, Friedman BA, Rojo MG, Georgiou A, Kayser G, Kayser K, Legg M, Naugler C, Sawai T, Weiner H, Winsten D, Pantanowitz L. The history of pathology informatics: A global perspective. *J Pathol Inform*. 2013 May 30;4:7. doi: 10.4103/2153-3539.112689. PMID: 23869286; PMCID: PMC3714902.
 49. Jahn SW, Plass M, Moinfar F. Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives. *J Clin Med*. 2020 Nov 18;9(11):3697. doi: 10.3390/jcm9113697. PMID: 33217963; PMCID: PMC7698715.
 50. https://qupath.readthedocs.io/en/0.5/docs/concepts/processing_and_analysis.html
 51. Smith, A.R. (1995). A Pixel Is Not A Little Square , A Pixel Is Not A Little Square , A Pixel Is Not A Little Square ! (And a Voxel is Not a Little Cube) 1 Technical Memo 6.

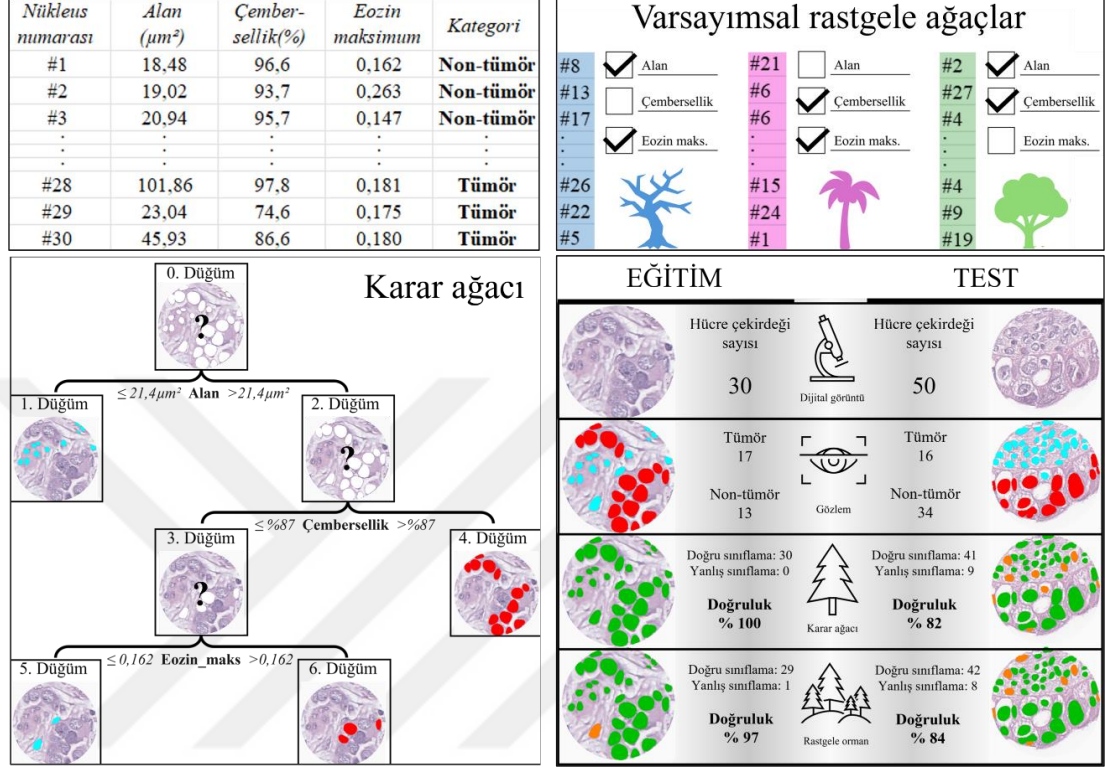
52. Rashidi HH, Tran NK, Betts EV, Howell LP, Green R. Artificial Intelligence and Machine Learning in Pathology: The Present Landscape of Supervised Methods. *Acad Pathol.* 2019 Sep 3;6:2374289519873088. doi: 10.1177/2374289519873088. PMID: 31523704; PMCID: PMC6727099.
53. Bhargava R, Madabhushi A. Emerging Themes in Image Informatics and Molecular Analysis for Digital Pathology. *Annu Rev Biomed Eng.* 2016 Jul 11;18:387-412. doi: 10.1146/annurev-bioeng-112415-114722. PMID: 27420575; PMCID: PMC5533658.
54. Boucheron LE. PhD Thesis. 2008. Object- and Spatial-Level Quantitative Analysis of Multispectral Histopathology Images for Detection and Characterization of Cancer.
55. Irshad H, Veillard A, Roux L, Racocanu D. Methods for nuclei detection, segmentation, and classification in digital histopathology: a review-current status and future potential. *IEEE Rev Biomed Eng.* 2014;7:97-114. doi: 10.1109/RBME.2013.2295804. PMID: 24802905.
56. Komura D, Ishikawa S. Machine Learning Methods for Histopathological Image Analysis. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018 Feb 9;16:34-42. doi: 10.1016/j.csbj.2018.01.001. PMID: 30275936; PMCID: PMC6158771.
57. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001 Aug;23(4):291-9. PMID: 11531144.
58. Xing F, Yang L. Robust Nucleus/Cell Detection and Segmentation in Digital Pathology and Microscopy Images: A Comprehensive Review. *IEEE Rev Biomed Eng.* 2016;9:234-63. doi: 10.1109/RBME.2016.2515127. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26742143; PMCID: PMC5233461.
59. Litjens G, Kooi T, Bejnordi BE, Setio AAA, Ciompi F, Ghafoorian M, van der Laak JAWM, van Ginneken B, Sánchez CI. A survey on deep learning in medical image analysis. *Med Image Anal.* 2017 Dec;42:60-88. doi: 10.1016/j.media.2017.07.005. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28778026.
60. McAlpine ED, Michelow P, Celik T. The Utility of Unsupervised Machine Learning in Anatomic Pathology. *Am J Clin Pathol.* 2022 Jan 6;157(1):5-14. doi: 10.1093/ajcp/aqab085. PMID: 34302331.
61. Faust K, Roohi A, Leon AJ, Leroux E, Dent A, Evans AJ, Pugh TJ, Kalimuthu SN, Djuric U, Diamandis P. Unsupervised Resolution of Histomorphologic Heterogeneity in Renal Cell Carcinoma Using a Brain Tumor-Educated Neural Network. *JCO Clin Cancer Inform.* 2020 Sep;4:811-821. doi: 10.1200/CCI.20.00035. PMID: 32946287; PMCID: PMC7529524.
62. Serag A, Ion-Margineanu A, Qureshi H, McMillan R, Saint Martin MJ, Diamond J, O'Reilly P, Hamilton P. Translational AI and Deep Learning in Diagnostic Pathology. *Front Med (Lausanne).* 2019 Oct 1;6:185. doi: 10.3389/fmed.2019.00185. PMID: 31632973; PMCID: PMC6779702.
63. Rainio O, Teuvo J, Klén R. Evaluation metrics and statistical tests for machine learning. *Sci Rep.* 2024 Mar 13;14(1):6086. doi: 10.1038/s41598-024-56706-x. PMID: 38480847; PMCID: PMC10937649.
64. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source

- software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017 Dec 4;7(1):16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5. PMID: 29203879; PMCID: PMC5715110.
65. Schmidt, Uwe & Weigert, Martin & Broaddus, Coleman & Myers, Gene. (2018). Cell Detection with Star-Convex Polygons: 21st International Conference, Granada, Spain, September 16–20, 2018, Proceedings, Part II. 10.1007/978-3-030-00934-2_30.
 66. Viray H, Coulter M, Li K, Lane K, Madan A, Mitchell K, Schalper K, Hoyt C, Rimm DL. Automated objective determination of percentage of malignant nuclei for mutation testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014 May-Jun;22(5):363-71. doi: 10.1097/PAI.0b013e318299a1f6. PMID: 24162261; PMCID: PMC3999345.
 67. Hamilton PW, Wang Y, Boyd C, James JA, Loughrey MB, Houghton JP, Boyle DP, Kelly P, Maxwell P, McCleary D, Diamond J, McArt DG, Tunstall J, Bankhead P, Salto-Tellez M. Automated tumor analysis for molecular profiling in lung cancer. *Oncotarget.* 2015 Sep 29;6(29):27938-52. doi: 10.18632/oncotarget.4391. PMID: 26317646; PMCID: PMC4695036.
 68. M. S. Hosseini et al., "Atlas of Digital Pathology: A Generalized Hierarchical Histological Tissue Type-Annotated Database for Deep Learning," 2019 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), Long Beach, CA, USA, 2019, pp. 11739-11748, doi: 10.1109/CVPR.2019.01202.
 69. https://docs.deepchecks.com/0.11/checks_gallery/vision/train_test_validation/plot_heatmap_comparison.html
 70. Beck AH, Sangoi AR, Leung S, Marinelli RJ, Nielsen TO, van de Vijver MJ, West RB, van de Rijn M, Koller D. Systematic analysis of breast cancer morphology uncovers stromal features associated with survival. *Sci Transl Med.* 2011 Nov 9;3(108):108ra113. doi: 10.1126/scitranslmed.3002564. PMID: 22072638.
 71. Schömig-Markiefka B, Pryalukhin A, Hulla W, Bychkov A, Fukuoka J, Madabhushi A, Achter V, Nieroda L, Büttner R, Quaas A, Tolkach Y. Quality control stress test for deep learning-based diagnostic model in digital pathology. *Mod Pathol.* 2021 Dec;34(12):2098-2108. doi: 10.1038/s41379-021-00859-x. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34168282; PMCID: PMC8592835.
 72. Tizhoosh HR, Pantanowitz L. Artificial Intelligence and Digital Pathology: Challenges and Opportunities. *J Pathol Inform.* 2018 Nov 14;9:38. doi: 10.4103/jpi.jpi_53_18. PMID: 30607305; PMCID: PMC6289004.
 73. Gamper, Jevgenij & Koohbanani, Navid & Graham, Simon & Jahanifar, Mostafa & Khurram, Syed Ali & Azam, Ayesha & Hewitt, Katherine & Rajpoot, Nasir. (2020). PanNuke Dataset Extension, Insights and Baselines.
 74. Sirinukunwattana K, Ahmed Raza SE, Yee-Wah Tsang, Snead DR, Cree IA, Rajpoot NM. Locality Sensitive Deep Learning for Detection and Classification of Nuclei in Routine Colon Cancer Histology Images. *IEEE Trans Med Imaging.* 2016 May;35(5):1196-1206. doi: 10.1109/TMI.2016.2525803. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26863654.

75. Liu JTC, Glaser AK, Bera K, True LD, Reder NP, Eliceiri KW, Madabhushi A. Harnessing non-destructive 3D pathology. *Nat Biomed Eng.* 2021 Mar;5(3):203-218. doi: 10.1038/s41551-020-00681-x. Epub 2021 Feb 15. PMID: 33589781; PMCID: PMC8118147.
76. Ianni JD, Soans RE, Sankarapandian S, Chamarthi RV, Ayyagari D, Olsen TG, Bonham MJ, Stavish CC, Motaparathi K, Cockerell CJ, Feeser TA, Lee JB. Tailored for Real-World: A Whole Slide Image Classification System Validated on Uncurated Multi-Site Data Emulating the Prospective Pathology Workload. *Sci Rep.* 2020 Feb 21;10(1):3217. doi: 10.1038/s41598-020-59985-2. PMID: 32081956; PMCID: PMC7035316.
77. Janowczyk A, Zuo R, Gilmore H, Feldman M, Madabhushi A. HistoQC: An Open-Source Quality Control Tool for Digital Pathology Slides. *JCO Clin Cancer Inform.* 2019 Apr;3:1-7. doi: 10.1200/CCI.18.00157. PMID: 30990737; PMCID: PMC6552675.
78. Tellez, David & Litjens, Geert & Bándi, Péter & Bulten, Wouter & Bokhorst, John-Melle & Ciompi, Francesco & van der Laak, Jeroen. (2019). Quantifying the effects of data augmentation and stain color normalization in convolutional neural networks for computational pathology. *Medical Image Analysis.* 58. 101544. 10.1016/j.media.2019.101544.
79. Alex Krizhevsky, Ilya Sutskever, and Geoffrey E. Hinton. 2017. ImageNet classification with deep convolutional neural networks. *Commun. ACM* 60, 6 (June 2017), 84–90. <https://doi.org/10.1145/3065386>
80. J. Deng, W. Dong, R. Socher, L. -J. Li, Kai Li and Li Fei-Fei, "ImageNet: A large-scale hierarchical image database," 2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, Miami, FL, USA, 2009, pp. 248-255, doi: 10.1109/CVPR.2009.5206848.
81. Russakovsky, O., Deng, J., Su, H. et al. ImageNet Large Scale Visual Recognition Challenge. *Int J Comput Vis* 115, 211–252 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11263-015-0816-y>
82. Kumar N, Verma R, Sharma S, Bhargava S, Vahadane A, Sethi A. A Dataset and a Technique for Generalized Nuclear Segmentation for Computational Pathology. *IEEE Trans Med Imaging.* 2017 Jul;36(7):1550-1560. doi: 10.1109/TMI.2017.2677499. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28287963.
83. Holzinger, Andreas. (2018). From Machine Learning to Explainable AI. 55-66. 10.1109/DISA.2018.8490530.

8 EKLER

EK-1. Karar Ağacı ve Rassal Orman Deneyi



Burada, veri seti içerisinde alınan bir görüntü korunda, karar ağacı ve rassal orman algoritmalarının çalışma prensiplerinin açıklanmasına yönelik bir deney gösterilmektedir. (Sol üst) Görüntü korunda yer alan 30 nükleusa ait kategoriler ve seçilmiş 3 parametreyi (*alan*, *çembersellik*, *maksimum eozin değerleri*) içeren tablo özeti. (Sol alt) Nükleusların kategorilere göre sınıflanması için verileri SPSS programında oluşturulan karar ağacı. Kök düğüm 0 no ile, karar düğümleri 2 ve 3 no'lar ile, yaprak düğümleri 1, 4, 5 ve 6 no'lar ile, tümör nükleusları kırmızı maskeler ile, tümör dışı nükleuslar mavi maskeler ile gösterilmiştir. Sınıflama probleminde karar ağaçları, tanımlanan düğüm ayırma kriterlerine ve yaprak (terminal) düğümlerdeki saflık hedeflerine göre optimal ağacı üretir. (Sağ üst) Rassal orman algoritması ise; örneklemden rastgele veri setleri oluşturur (*bootstrapping*), her bir set için rastgele parametreler seçer ve bağımsız karar ağaçları oluşturur. Yeni bir veri kümesi algoritmaya sunulduğunda, her bir karar ağacının veri seti üzerindeki kararları toplanır (*aggregating*) ve en yüksek oy alan sınıf seçilir. (Sağ alt) Rassal orman algoritmasının makine öğrenmesinde en öne çıkan özelliklerinden biri “aşırı uyum” sorununu azaltmasıdır. Sol alt şeklindeki karar ağacı, kendi eğitim gördüğü görüntüde %100 doğruluğa ulaşmaktayken, tanımadığı bir görüntüde bu oran %82’dir. *Modellerin isabetli tahminleri yeşil, hatalı tahminleri turuncu ile gösterilmiştir*. QuPath uygulaması ile aynı parametreler üzerinden çalıştırılan rassal orman algoritması ise, eğitim gördüğü kordaki başarıyı %97’ye düşürmekle birlikte (biasta artış), test görüntüsündeki başarıyı %84’e çıkarmıştır (varyansta düşüş).

EK-2. Etik Kurul Onayı



SAYI: ATADEK-2023/20

14.12.2023

KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr. Asiye Işın Doğan Ekici, Prof. Dr. Ümit İnce, Doç. Dr. Fatma Tokat,

Sorumluluğunu yürüttüğünüz **“MOLEKÜLER PATOLOJİ TETKİKLERİNDE TÜMÖR YÜZDESİ BELİRLEMEDE YAPAY ZEKA TABANLI DİJİTAL PATOLOJİ ALGORİTMASI GELİŞTİRİLMESİ”** başlıklı proje 14 Aralık 2023 tarih 2023/20 sayılı ATADEK toplantısında görüşülmüş olup 2023-20/693 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Murat BAŞ

ATADEK Başkanı

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU (ATADEK)

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın başlığı:

MOLEKÜLER PATOLOJİ TETKİKLERİNDE TÜMÖR YÜZDESİ BELİRLEMEDE
YAPAY ZEKA TABANLI DİJİTAL PATOLOJİ ALGORİTMASI GELİŞTİRİLMESİ

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın yürütücüsü (sorumlusu):

Prof. Dr. Asiye Işın Doğan Ekici, Prof. Dr. Ümit İnce, Doç. Dr. Fatma Tokat

Karar:

Kabul (Etik olarak uygun) (X)

Revizyon ()*

Etik olarak uygun değil ()**

Toplantı Tarihi: 14.12.2023

Karar Numarası: 2023-20/693

		Karara	Karara
Kurul Üyesi-Unvan Ad-Soyad	İmza	Katılıyorum	Katılmıyorum***
Prof. Dr. Murat BAŞ (Başkan)			
Prof. Dr. Şeyda TÜRK (Başkan Yardımcısı)			
Prof. Dr. Yasemin ALANAY			
Prof. Dr. A. Yiğit ÇAKIROĞLU			
Doç. Dr. Figen DEMİR			
Doç. Dr. Erman AYTAÇ			
Doç. Dr. Fatih ARTVİNLİ			
Doç. Dr. Esra UĞUR			
Dr. Öğr. Üyesi Zekiye Kübra YILMAZ			
Dr. Öğr. Üyesi Ceren Gülser İLİKAN RASİMOĞLU			
Dr. Öğr. Üyesi Nazlı KESKİN TOKLU			