

36. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

**GÉPI TANULÁSON ALAPULÓ TUMOROS SZÖVET
FELISMERÉS STIMULÁLT RAMAN-SZÓRÁS
MIKROSZKÓPI FELVÉTELEKBŐL**

Új jelölés mentes detektálási módszer a tumorbiológiában

Szócs Boróka

TTK, Biológia MSc

Eötvös Loránd Tudományegyetem

2023

Témavezetők:

Moni Róbert (BME VIK Doktorandusz)

Dr. Márialigeti Károly (ELTE)

TARTALOMJEGYZÉK

Ábra- és táblázatjegyzék.....	3
Rövidítésjegyzék	3
I. BEVEZETŐ	4
1. Mikroszkópia a diagnosztikában/patológiában.....	4
2. Jelölés és jelölés mentes eljárások – előnyök, hátrányok	6
3. Rákdiasztika, tumorbiológia, hasnyálmirigy rák	6
4. Az SRS mikroszkóp működési elve	7
5. Az SRS felhasználásának lehetőségei	8
6. Gépi tanulás	10
6.a. Gépi tanulás alapjai	10
6.b. Gépi látás	12
6.c. Gépi látás, mint orvos diagnosztikai eszköz	12
II. CÉLKITŰZÉS.....	15
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	16
1. Az általunk használt SRS mikroszkóp felépítése és tulajdonságai	16
2. Az SRS mikroszkóppal történő mérések menete	17
3. Szövetek meghatározása és osztályozása	19
4. Gépi Tanulás alkalmazása szövet felismerésre	21
4.1. Az adatok feldolgozása és előkészítése a tanításra.....	24
4.2. Modell architektúra.....	25
4.3. Tanítás	26
4.4. Metrikák.....	27
IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	29
1. Eredmények.....	29
2. Következtetések és összefoglaló	31
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	33
KIVONAT.....	34
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS.....	35
SZAKIRODALOM	37

Ábra- és táblázatjegyzék

1. ábra Spontán és stimulált Raman szórás közötti különbség (saját szerkesztésű ábra)	8
2. ábra Biológiai neuron és mesterséges neuron összehasonítása (saját szerkesztésű ábra)	10
3. ábra A mesterséges intelligencia rétegei (saját szerkesztésű ábra).....	11
4. ábra Célkitűzés szemléltetése (saját készítésű ábra)	15
5. ábra SRS mikroszkóp felépítése (Femtonics)	16
6. ábra Minta, terület és képcsempe léptékei (saját készítésű ábra)	18
7. ábra Hematoxin-eozin festés során készül minta mikroszkopikus képe, illetve az SRS mikroszkóppal készült képek (két különböző hullámszámon).....	18
8. ábra Virtuális H&E kép szemléltetése a két hullámszám együttes alkalmazása által.	19
9. ábra A tanítás fázisainak szemléltetése a neurális hálón keresztül (saját szerkesztésű).....	22
10. ábra Tanítási folyamat egyszerű szemléltetése (saját készítésű ábra)	24
11. ábra Adatbázis felosztási arányok (teljes adatbázis mellett a 3-3 al-adatbázis: tanító, validációs és teszt al-adatbázisok). Adatbázis felosztási arányok (teljes adatbázis mellett a 3-3 al-adatbázis: tanító, validációs és teszt al-adatbázisok).....	24
12. ábra Konvolúciós Neurális Hálózat architektúrájának elvi rajza	25
13. ábra Validációs adaton mért Pontosság értéke. Ordináta: pontosság mértéke 0-1 skálán ami a 0-100%-ot jelképezi. Abszcissza: tanítási lépések száma (step = epoch).....	29
14. ábra Tévesztési arány kimutatása saját adatok alapján.....	31
1. táblázat Szövetminta felvételek összehasonlítása	20
2. táblázat A neurális hálózat hyperparaméterei	26
3. táblázat Tévesztési mátrix	27
4. táblázat Tanítás folyamán elért validációs pontosság	30

Rövidítésjegyzék

CT = Computer tomográfia

DL = Mély tanulás (Deep learning)

F1 = Felidézés és a precizitás mértéke

FISH = Fluoreszcens technika

FN = Fals negatív (False Negative)

FP = Fals pozitív (False Positive)

GPU = Grafikai processzor

H&E = Hematoxin-eozin

IPMN = Intraduktális papilláris mucinózus neoplázia (Intraductal papillary mucinous neoplasms)

MCN = Mucinosus cysticus neoplasma (Pancreatic mucinous cystic neoplasm)

MI = **AI** = Mesterséges intelligencia (Artificial intelligence)

ML = Gépi tanulás (Machine learning)

MRI = Mágneses rezonancia

PanNET = Pancreatic neuroendocrine tumor

PCR = Polimeráz láncreakció

PET = Pozitron emissziós tomográfia

QR-kód = Kétdimenziós vonalkód (Quick Response-kód)

SPN = Pancreas solid pseudopapillary neoplasia

SRS = Stimulált Raman-szórás

TN = Igaz negatív (True Negative)

TP = Igaz pozitív (True Positive)

UH = Ultrahang

VLE = Volumetrikus lézer endomikroszkópia

WN = Hullámszám (Wavenumber)

I. BEVEZETŐ

1. Mikroszkópia a diagnosztikában/patológiában

A tumorok felismerésére különböző diagnosztikai eljárásokat alkalmaznak. Van, hogy laboratóriumi értékeket figyelnek (pl. vér, vizelet, széklet). A tüdő, gyomor és bél érintettség esetén gyakorta endoszkópiás módszert használnak, vagy biopsziát vesznek szövettani vizsgálatokhoz. Mindemellett képalkotói technikákat is alkalmaznak: mágneses rezonancia (MRI), ultrahang (UH), röntgen, komputer tomográf (CT), pozitron emissziós tomográfia (PET) vizsgálatokat.

Az orvosi diagnosztikában/patológiában hagyományos, bizonyos területeken egyben legalapvetőbb eljárás a mikroszkópos vizsgálat. A mikroszkópok fejlődésével a diagnosztika is fejlődött. Ma már különféle mikroszkópos eljárások léteznek, melyek folyamatos fejlődése jobbítja és fel is gyorsítja az orvoslást is. Schaff és Nagy (2007) rendszerzése alapján elkülönítjük a „klasszikus” illetve az újabban alkalmazott patológiai vizsgáló módszereket.

A „klasszikus” **patológiai diagnosztikai módszerek** első köre a **preoperatív diagnosztika**, amelynek során különböző módszerekkel vehetnek szövetmintát és folytathatnak diagnosztikai vizsgálatot, ami előzetes vizsgálatként szolgál. Pl. előzetes felmérésként szolgálhat egy nagyobb műtéti beavatkozás előtt. Ennek a diagnosztikának, a legismertebb eljárási formája a **citológiai eljárás**, amely az egyik legelterjedtebb a tumoros elváltozások vizsgálata esetén. Ilyenkor vagy levált/leválasztott sejteket vizsgálnak, vagy **aspirációs tűbiopsziát** alkalmaznak. Ez nagyon elterjedt módszer, amelynek során gyakorta képalkotó eszköz (CT, ultrahang) mellett, azzal irányítva végzik a vizsgálatot. A mintákból általában kenetet készítenek, amelyet különböző festési eljárások után mikroszkóposan vizsgálnak. A preoperatív diagnosztikának másik típusa a **core- vagy vastagtű-biopszia**, amely a citológiai eljáráshoz hasonló, azzal a különbséggel, hogy vastagabb tűt alkalmaznak. A preoperatív diagnosztika harmadik jellemző eljárása a **próbakimetszés**. Ennek során sebészeti beavatkozást hajtanak végre. Ilyen jellemző eljárás például az endoszkópos vizsgálat, mely során endoszkóp segítségével vesznek mintát (Schaff és Nagy, 2007).

A klasszikus patológiai diagnosztikai eljárások második csoportja az **intraoperatív diagnosztika**. Az eljárást műtét közben végzik, amíg a beteg altatás alatt van. Patológusok végzik az elemzést, mely viszonylag gyorsan zajlik (10 – 15 perc), gyorsfagyasztással, fixálás nélkül készítik a preparátumot. A klasszikus patológiai módszerek harmadik csoportja a

posztoperatív diagnosztika. Az eljárás során hagyományosan fénymikroszkópot alkalmaznak. Alaposan megtervezett módon elkészített metszete(ke)t vizsgálnak, amely olyan mintából készül, amelyet a műtét során távolítottak el a betegből. Ez a posztoperatív diagnosztika véglegesíti a patológiai diagnózist. Ennek a vizsgálatnak az a célja, hogy megfelelő kezelést írjanak elő a páciensnek, továbbá a kórlefolyás menetéről is képet adhat (Schaff és Nagy, 2007).

A prognózis pontos megállapítása végett további, kiegészítő módszereket is alkalmaznak. Ezek főként az **újabban alkalmazott patológiai módszerek**, melyek esetében négy fő eljárási csoport ismert: az immunhisztokémia, az elektronmikroszkópia, a citometria és a molekuláris patológia. Az **immunhisztokémia** során „in situ” vizsgálatot folytatnak, abban az értelemben, hogy az immunreakciók a szövetmintában történnek. Ez a tumorok diagnosztikájában a legelterjedtebb (rákos sejteredetek meghatározásában segíthet). Az immunhisztokémiai reakciók közül a leggyakrabban a következőket alkalmazzák: hormonok, hormonreceptorok kimutatása, limfoid-, hám-, és egyéb kötőszövet- minták elemzése, melanoma markerek vizsgálata. Az **elektronmikroszkópok** használata a patológiai diagnosztikában viszonylag háttérbe szorult, ez főként a nagy költsége és munkaigényessége miatt van. Nagyon ritka esetben alkalmaznak elektronmikroszkópos vizsgálatokat, ilyen például a vesebetegségek diagnosztikája. Ennél pedig még ritkább daganatok differenciálására való alkalmazása. A **citometria** során nagy mennyiségű izolált sejtet vizsgálnak áramlási citométeres műszer segítségével. A sejteket általában vérből, daganatokból, vagy csontvelőből izolálják. Legtöbbször leukémiás, illetve limfómás betegeknél alkalmazzák. A **molekuláris patológia** újabb kapukat nyitott a vizsgálati módszerek területén. Ezek a módszerek még pontosabb választ tudnak adni a daganatok osztályozására, eredetére a különböző genetikai és fehérje expressziós elemzések segítségével. Ezt az eszköztárat főként daganatok diagnosztikájára, „génhibák” kimutatására alkalmazzák. A molekuláris patológia során különböző módszereket alkalmazhatnak. Ilyen például a **citogenetika**, amely a sejtek örökítő anyaga szerveződésének jellemzését teszi lehetővé. A módszer által a kromoszómák szerkezetét és elrendezését figyelhetjük meg, pl. a klasszikus sávós festési eljárással, vagy újabban fluoreszcens módszerekkel. Egy másik molekuláris módszer az **in situ hibridizáció**, amely során mikroszkóp segítségével tárnak fel specifikus RNS szakaszokat. A jelölést ez esetben hibridizációs próbákban bevitt fluoreszcens technikával (FISH) érik el. A **polimeráz láncreakció (PCR)** szintén molekuláris módszer, amely mára az egyik legelterjedtebb a tumordiagnosztikában. További molekuláris módszerek a **szöveti chip technológia**, illetve a **DNS-chip (DNS array, microarray)**. Molekuláris módszereket leggyakrabban daganatok

vizsgálata során alkalmaznak (pl. tüdőrák, vese- és hólyagdaganatok, limfóma, leukémia, emlőrák, lágyszövetdaganatok, neuroblasztóma stb.) (Schaff és Nagy, 2007).

2. Jelölés és jelölés mentes eljárások – előnyök, hátrányok

A tumoros szövetek mikroszkópos vizsgálata előtt legtöbbször hematoxin-eozin festést alkalmaznak. Ez a szövettani festési módszer az egyik legrégebbi eljárás a szövettani vizsgálatokban. Széles körben használt és az egyik legjobb módszerként tartják számon. Előnye, hogy széleskörű áttekintést nyújt a metszetekről. Festés során kitűnően festődnek a sejtmagok, a citoplazma, illetve számos granulocita is eltérően kitűnik. Elmondható, hogy a festés általi vizsgálat teljes áttekintést ad a metszetről. Ez a kombinált festés tartalmaz bázikus festéket (hematoxin) és savas festéket (eozin) is. A hematoxin negatív töltésű molekulához kötődik (pl. fehérjék karboxil-csoportjához, nukleinsavakhoz), ezáltal a sejtmagot, az endoplazmatikus retikulumot, a riboszómákat lilás-kék színűre festi. Míg az eozin a fehérjék pozitív töltésű végéhez kötődik jól és ezáltal a citoplazmát, a kollagén rostokat, a mitokondriumokat vöröses-rózsaszínűre festi. A festés után általában lefedik a metszetet és így vizsgálják a szöveteket. Mindemellett előnyként említhető az is, hogy egyszerű és olcsó (Fischer és mtsai, 2008; Cardiff és mtsai, 2014). Hátránya, hogy időigényes és „tökéletes metszetek” szükségesek, hogy festés után szépen látható képet kapjunk a szövetekről.

Ezzel ellentétben a jelölés mentes („label free”) eljárások gyorsabbak, analízis idejük rövidebb, ezáltal pedig költséghatékonyak. Továbbá fontos szempont az is, hogy valós idejű meghatározásokat is lehetővé tesznek, ezáltal akár a sejtek működését is vizsgálhatjuk.

3. Rákdiasztika, tumorbiológia, hasnyálmirigy rák

A rákbetegségek a legelterjedtebb betegségek a világon, melyek évente több millió halálesetért felelősek. Például 2020-ban a jelentett adatok alapján kb. 10 millióan haltak meg rákbetegségben (Ferlay és mtsai, 2021). A rákbetegség számos fajtája között néhány ráktípus esetében már elérhető hatékony kezelés, de a legtöbb rákos megbetegedés tökéletes gyógy módját a mai napig nem tudjuk. Emiatt ezek a betegségek az orvostudomány számára még ma is komoly kihívást jelentenek (Hanahan, 2022). E területen komoly és nagyszámú kutatás zajlik napjainkban is, hiszen egy aktuális, komoly gond megoldását szeretnék elérni a

kutatók. Egyszerűen fogalmazva a betegség alapját az adja, hogy különböző genetikai mutációk, DNS-hibák - melyek a sejtciklus szabályozásában vesznek részt - kontrollálatlan növekedést eredményeznek, genetikai vagy környezeti tényezők következtében.

A dolgozatomban tárgyalt **hasnyálmirigy rák (pankreász karcinóma)** agresszív lefolyású, rosszindulatú daganat. Előfordulását tekintve többnyire idős korban (40-85 év között) fordul elő, túlnyomórészt férfiakban. A gyakorisága az elmúlt években folyamatosan növekedett. Az összes típusú rák közül ez a típus 2%-os gyakoriságot mutat, míg a rákos halálozások 5%-ért felelős. Ez a betegség az egyik leghalálosabb típusú rákok közé tartozik, mivel nehéz felismerni, nincsenek korai jelei, mindemellett gyorsan is terjed a környező szervekre. Tehát jellemzően hosszan tünetmentes és a világon első helyen áll a tünetmentes rákos megbetegedések között. Az esetek 90 %-a ismeretlen eredetű adenokarcinóma, illetve 10 %-ában családi hajlamú, örökletes. Tehát oka lehet örökletes, illetve szerzett (Goral, 2015).

A hasnyálmirigy ráknak több típusa ismert: Invasive Ductal Carcinoma, IPMN, MCN, Pancreatoblastoma, PanNET, SPN, melyek esetében különböző gének felelősek a kialakulásáért (pl. IPMN típusú rák esetében a következő géneknek lehet szerepe: KRAS, RNF43, GNAS, P16/CDKN2A, TP53, SMAD4, PIK3CA; Goral, 2015).

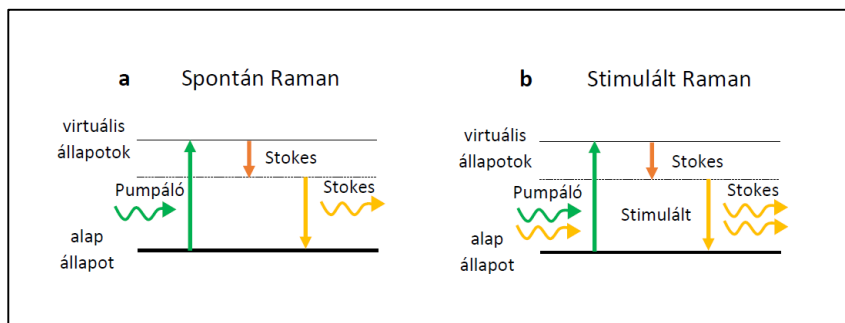
A rákos megbetegedések általános besorolásához hasonlóan a hasnyálmirigy rákra is négy stádium jellemző. Az első két stádiumban az elváltozás a hasnyálmirigyre lokalizálódik, mely általában 17 hónapig tart. A harmadik stádiumban az elváltozás az ereket összesűríti, betolakodik a szomszédos szervek állományába, tehát helyi áttérjedést mutat, ez 8-9 hónapig tart. A negyedik stádiumában távoli szervekre is áttétet képez, mely 4-6 hónapig tart.

4. Az SRS mikroszkóp működési elve

Az orvosi biotechnológia folyamatos fejlődést mutat. A különböző orvosi diagnosztikai, terápiás eszközök előállítás, fejlesztése - biotechnológiai módszerekkel - mind hozzájárulnak az orvoslás fejlődéséhez is. A **Stimulált Raman-szórás mikroszkópia (SRS, Stimulated Raman Scattering)** is biotechnológiának minősül, főként orvosi biotechnológiának, de alkalmazzák más biotechnológiai területeken is (Yasuyuki és mtsai, 2009; Zeng és mtsai, 2016; Hu és mtsai, 2019).

Az SRS mikroszkópia a Raman-szórás elvén alapul (**1. ábra**). A Raman-szórás esetén a szórt foton és a beeső foton energiája különbözik, tehát a közeg elemi gerjesztésén a fényszórás rugalmatlan. A gerjesztés lézerrel történik (monokromatikus fénnel). A lézerfény hullámhossztartományát a szórt fényből kiszűrjük. A Raman-spektroszkópia alkalmazása sokrétű, különböző területeken egyaránt alkalmazható a normálrezgésekkel kapcsolatos információk megállapítására (pl. izotópok jelenléte, kémiai reakciók követése, szerkezeti paraméterek megállapítása, ásványok azonosítása, hőmérsékletmérés, szennyező anyagok jelenlétének megállapítása, belső feszültség mérés és nem utolsó sorban biológiai minták elemzésénél is alkalmazható; Kukura és mtsai, 2006).

A stimulált Raman-szórás két foton egyidejű elnyelésekor jöhet létre, akár csak a spontán Raman szórás. Utóbbtól mégis különbözik, mivel ebben az esetben a vizsgált molekula optimális energiájú pumpáló és Stokes¹ foton egybeeső elnyelésével kerül gerjesztett állapotba. A folyamat a rezonancia miatt érzékenyebb, mint a spontán Raman szórás, mindemellett a két foton effektus² néhány előnyével is rendelkezik a rendszer (Berto és mtsai, 2014). Tehát a vizsgált minta csak a fókuszpont körül, egy kis térfogatban gerjesztődik, ugyanakkor akár mm-es behatolási mélység is elérhető. Ezzel a módszerrel képesek vagyunk például "label free" sejt azonosításra (Bae és mtsai, 2020).



1. ábra Spontán és stimulált Raman szórás közötti különbség (saját szerkesztésű ábra)

5. Az SRS felhasználásának lehetőségei

A mikroszkópok megjelenésével, fejlődésével együtt a diagnosztika is fejlődött. A különböző mikroszkópok (pl. binokuláris mikroszkóp, pásztázó alagútmikroszkóp, konfokális pásztázó mikroszkóp, polarizációs mikroszkóp, sztereo mikroszkóp, atomerő-mikroszkóp stb.)

¹ A spektrumban található **Stokes sávok**nak nevezik azokat a sávokat, amelyek a Rayleigh frekvenciánál kisebb frekvenciájúak. (Amelyek nagyobb frekvenciát mutatnak azokat anti-Stokes sávnak nevezik.)

² Két foton effektus = egy olyan jelenség, mely folyamán bizonyos festékmolekula a két foton egyidejű elnyelése által kerül gerjesztett állapotba.

feltalálásával új információkhoz, felfedezésekhez jutottunk a biológiai területeken is. A diagnosztikában mindig is fontos szerepet játszott a mikroszkópia. Viszonylag új jelölés mentes detektálási módszer a Stimulált Raman-szórás mikroszkópia (SRS), mely a kutatásunk során alapeszközként szolgált.

Az SRS mikroszkópokkal folytatott vizsgálatok a **rákkutatás** (Orringer és mtsai, 2017; Ji és mtsai, 2019; Hollon és mtsai, 2020), orvoslás (Freudiger és mtsai, 2008) egy új területének a feltárását, megoldását képezhetik. Ez a módszer egy **új rák diagnosztikai módszerként** szolgál, mely potenciálisan gyorsabb a hagyományos mikroszkópiánál, mivel nem kell megfesteni a mintákat, tehát jelölésmentes. Továbbá nincs szükség tartósításra, paraffinálásra, illetve a metszetek elkészítése sem igényes, mivel nincs szükség vékony, egyenletes vastagságú metszetekre. Ez a mikroszkóp a fénymikroszkóppal megegyező felbontással rendelkezik. Az [1.] képletben az Abbe képletet mutatjuk be, amelynek paraméterei a következők: d = feloldóképesség, λ_θ = a használt sugárzás vákuumbeli hullámhossza, n = az objektív frontlencse és a tárgy közötti közeg törésmutatója, θ = a frontlencse félnyílásszöge, $n \cdot \sin\theta$ = numerikus apertúra.

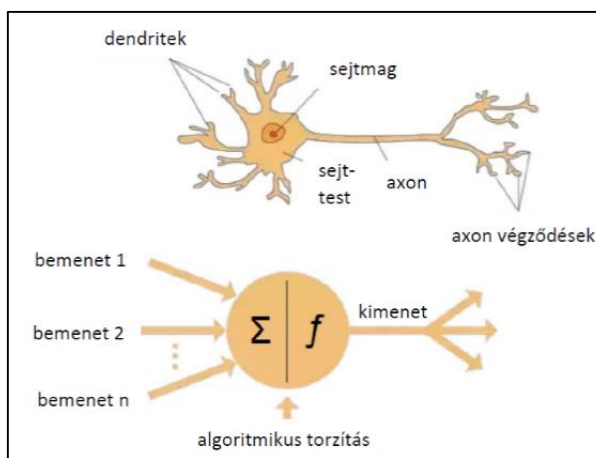
$$d = 0.61 \frac{\lambda_\theta}{n \cdot \sin \theta} \quad [1.]$$

Összességében elmondható, hogy az elmúlt évtizedben az SRS képalkotó technikát hatékony és erőteljes spektrális képalkotássá fejlesztették és mindez hozzájárult az élettudományokban zajló kutatások fejlődéséhez is. Az SRS mikroszkópok fejlesztése még mai napig fejlődés alatt áll, továbbá az SRS-el történő vizsgáló technikák módszerei is folyamatosan fejlődnek. Elmondható az is, hogy az SRS technika sokkal bonyolultabb, mint a hagyományos áteső fényű mikroszkópia. Nem csak a berendezések tervezésében, működésében, hanem az adatfeldolgozás terén is. Bár az SRS képek értelmezhetők hagyományos vizuális elemzéssel is, de sokféle adatfeldolgozási eljárás fejlesztése van folyamatban az SRS képek elemzésében (pl. különböző algoritmusok alkalmazása, főkomponens elemzések, többváltozós elemzések, spektrális vektor elemzés). Mindegyikhez nagyon nagy mennyiségű adat felvétele szükséges, ami viszont sok időt igényel. Az adatfeldolgozás tökéletes működéséhez egy erre szolgáló mesterséges intelligencia (MI) kifejlesztésére lenne szükség.

6. Gépi tanulás

6.a. Gépi tanulás alapjai

Napjainkban a gépi tanulás (machine learning - ML) nagyban hozzájárul a nagy mennyiségű adat feldolgozásához. Ennek az alkalmazása felgyorsítja és leegyszerűsíti esetünkben a klinikusok munkáját, azáltal, hogy a diagnosztika optimalizálását, pontosságát javítja. A gépi tanulás egyik részterülete (**3. ábra**) a mély tanulás (deep learning - DL), amelynek elve, hogy mesterséges neuron hálózatok halmozott összecsatolása segítségével bonyolult mintákat képesek felismerni így nagy adathalmazokon ellentétben a klasszikus gépi tanulás módszereivel. A működésük alapját azok a rendszerek képezik, amelyek adott mintázatokat, adatokat képek alapján képesek tanulni, akár önállóan, vagy emberi segítséggel. Ezek a rendszerek szabályokat ismernek fel, határoznak meg, szabályszerűségeket keresnek és ezekből általánosítanak. Tehát nem csak „megtanulják” az adatokat, hanem azokból általánosítva új ismeretlen adatokat is képesek majd nyerni. Ezek működését, pedig különféle algoritmusok teszik lehetővé. A minták azonosítása a tanulás algoritmusával valósul meg, melyekből adatmodell készül. Tehát a gépi tanulás különböző matematikai adatmodellekkel dolgozik és ezekből készít előrejelzéseket. Amint az ember is a gyakorlás mennyisége által fejlődik, éppúgy a gépi tanulás is a tapasztalat és az elemzett adatok mennyiségi növelésével válik pontosabbá. A számítógép „emberi jellegű gondolkodásának” tanítására például neurális hálózatokat alkalmaznak, melynek modellje az emberi idegsejtek, agy alapján készült (**2. ábra**).

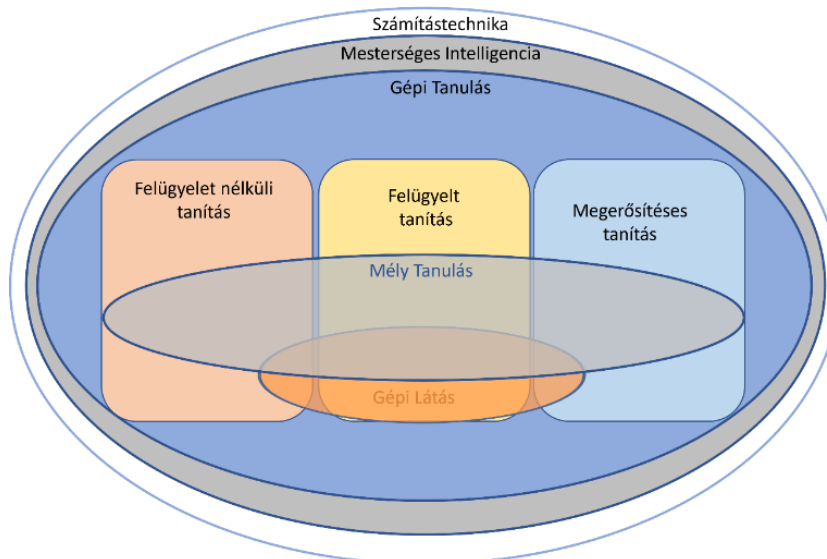


2. ábra Biológiai neuron és mesterséges neuron összehasonítása (saját szerkesztésű ábra)

A gépi tanulás számos előnnyel rendelkezik, emiatt egyre gyorsabb és széleskörű az elterjedése. A strukturált és a strukturálatlan adatok feldolgozását is lehetővé teszi. A különböző alkalmazási területek más-más előnyökkel járnak, például a folyamatok automatizálása által erőforrást és időt spórolhatunk. Előnyei közé tartozik a kockázatsökkentés, az adatbányászat megvalósítása, vagy éppen ügyfelek viselkedésének jóslása. Utóbbi esetére kiváló mindennapi

példa az internetes viselkedésmódok elemzése alapján történő termékjavaslatok megjelenése. („Ha ez és ez érdekli, akkor ez is érdekelni fogja...”)

A gépi tanulás esetében három technikát különítünk el: a felügyelt, a felügyelet nélküli, illetve a megerősítő tanulást. A **felügyelt tanulás** esetében adott struktúrával, címkékkel látjuk el az adatkészletet és ezáltal zajlik a gép betanítása, ez pedig lehetővé teszi, hogy gyorsabb és hatékonyabb előrejelzés, döntés szülessen. A **felügyelet nélküli tanulás** esetében az adatbázist nem látjuk el címkékkel és az algoritmusok feladata, hogy egy bizonyos struktúrát felfedezzen az adatok között, amelyekből utófeldolgozás során lehet következtetéseket levonni. A **megerősítő tanulás** próba-pontozás elven működik, amelyben egy „ágens” előre definiált metrikát igyekszik maximalizálni és a próbálkozásait kudarc esetén büntetjük, míg siker esetén jutalmazzuk. Ez tanulási forma hasonlít a legjobban az állatvilágban és az emberi társadalomban alkalmazott tanításhoz (**3. ábra**).



3. ábra A mesterséges intelligencia rétegei (saját szerkesztésű ábra)

A gépi tanulás működése több lépésből áll. Első lépésben az adatok összegyűjtése és előkészítése zajlik, ekkor a rendszer az adatforrások azonosítását követően lefordítja azok adatait. Ezek az adattípusok határozzák meg, hogy milyen gépi tanulást segítő algoritmusokat lehet használni. A rendszer az adatok áttekintésekor felismeri a szabálytalanságokat, furcsaságokat és kiépít egy struktúrát, emellett az adatintegritással összefüggő hibákat is megoldja. Második lépésben zajlik a modell tanítása, amikor az adatok egy betanítási (az adatok nagy része) és egy tesztelési készletre oszlanak. Harmadik lépésben a modell ellenőrzése következik, amikor kiértékelik a pontosságot és a teljesítményt a tesztelt adatkészlet esetében. Végül, negyedik lépésben, az eredmények értelmezésével zárul a folyamat. Ekkor - különböző

elemzésekkel - következtetéseket lehet levonni a tanulás eredményességére és megtervezhetők a kimenetek.

Használhatósága szempontjából a gépi tanulás szolgálhat értékek előre jelzésére (modell létrehozása regressziós algoritmusokból), struktúra keresésre (fürtözési algoritmusok), kategóriák előre jelzésére (besorolási algoritmusok), illetve szokatlan előfordulások azonosítására (anomália detektálási algoritmusok)

6.b. Gépi látás

A gépi látás a gépi tanulás azon területe, ahol az adatokat képek, esetleg kép szekvenciák jelentik és a tanuló algoritmusok feladata ezen adatokon megtanulni azon formai tulajdonságokat, amelyek egy elvárt kimentre optimálnak. Az adatkinyerés a képfeldolgozás által valósul meg. A gépi látás lehetővé teszi, hogy emberi látáshoz kapcsolódó feladatokat automatizáljanak, vagy éppen az emberi képességeket meghaladó feladatokat gépesítve lássanak el.

A gépi látást ma már széles körben alkalmazzák különböző területeken. Egyszerű példaként szolgál a képi kód felismerés, például: QR-kód, vonalkód stb. További példa a gyógyszerminőség-ellenőrzés, tárgyak modellezése, 3D rekonstrukció, jelenségek felismerése (pl. betegség-felismerés, képi diagnosztika, anyaghibák felederítése), térlátás és térérzékelés, a különböző jelenség- és minta elemzések (pl. önvezető autók közlekedési helyzet felmérése, csillagászati elemzések). Szintén ide tartozik a nyomkövetés, a távérzékelés vagy éppen a testbeszéden alapuló hazugságvizsgálók.

6.c. Gépi látás, mint orvos diagnosztikai eszköz

Magyarországon számos olyan kutatás zajlik, melyben gépi látás alapú számítógépes programokat alkalmaznak orvosdiagnosztikai kutatásokban. Lovász és mtsai (2020) gasztroenterológiai és az endoszkópiai vizsgálatokhoz hoztak létre olyan öntanuló, neurális hálózatokat, melyek az orvosi diagnosztikát segítik; pontosabban egy olyan program létrehozását célozták meg, mely precízen elkülöníti a vastagbélben megtalált és polipectomiával eltüntetett hiperplasztikus és adenomatosus szubcentrimetrikus polipokat.

Nyelőcső betegségek esetében is alkalmaznak gépi látás módszereket, főként a laphámrák és a Barrett-oesophagus felismerésében, dysplasia- és karcinómaszűrés során. Van der Sommen és mtsai (2016) Barrett-nyelőcső nyálkahártyát vizsgáltak: felszíni differencia és színbeli különbségvizsgálat alapján, melyre számítógépes algoritmust hoztak létre. Mindössze 44 betegről származó 100 endoszkópos képet használtak fel a számítógépes algoritmus fejlesztéséhez. Ezeket előzetesen 4 neves szakember validálta, úgy hogy nem volt előzetes ismeretük a betegekről.

Swager és mtsai (2017) kutatásukban volumetrikus lézer endomikroszkópiával (VLE) készítettek fényképeket a korai Barrett-nyelőcsőről, majd ezeket a képeket elemezték és hoztak létre számítógépes algoritmust. E számítógépes algoritmus és tapasztalt orvosok diagnosztikus pontosságát hasonlították össze. A mesterséges intelligencia eredményesen analizálta a betegséget. Bár a vizsgálat ex vivo zajlott, az eredmények azt mutatják, hogy a későbbiekben akár in vivo módon is alkalmazható lesz pl. endoszkópia közben, mely nagyban segítheti az orvosok munkáját.

Szintén nyelőcsőrák esetében végeztek gépi látáson alapuló vizsgálatokat Horie és mtsai 2019-ben. Ők egy számítógépes neurális hálón alapuló programot fejlesztettek ki, amely főként a korai nyelőcsőrák felismerésére szolgál. A program 95%-os szenzitivitással működött, így az elváltozások felismerésére megfelelő volt.

Vastagbéllel kapcsolatos betegségek esetében is alkalmaznak mesterséges intelligencián alapuló vizsgálatokat. A vastagbélrák gyakorisága és súlyossága miatt jelentős fontossággal bír, hogy a korai fázisban minél pontosabban felismerjék a problémát és mielőbb elkezdjék a kezelést. A szakember hiány viszont ezt nem teszi lehetővé minden esetben. A mesterséges intelligencia fel tudná gyorsítani a diagnózis fázisát, segítve az orvosok munkáját. Ma már különböző AI-rendszerek támogatják a tükrözések menetét. Pl. emberi hibalehetőséget csökkentenek (fel nem ismert polipok száma; Hassan és mtsai, 2019), vagy felismert polipok rendszerezésében segítenek (Mori és mtsai, 2018; Misawa és mtsai, 2018), továbbá szövettani vizsgálatokban is segítenek (Mori és mtsai, 2016; Maeda és mtsai, 2016).

Maeda és mtsai egy 2019-es kutatásukban a nem észlelt polipok mennyiségének csökkentésén dolgoztak. Hasonló módszert alkalmazva, mint amit mi is alkalmaztunk kutatásunk során. Az említett kutatásban hozzáértő endoszkóposok vastagbéltükrözésen készült videófelvevételeket elemezték utólagosan és bejelölték a polipokat mutató fényképeket. Ezt követően pedig egy számítógépes algoritmust hoztak létre, amely meg kellett határozza, hogy egy adott képen (strukturában) mekkora valószínűséggel fordul elő polip. Ezt pedig egy 1–

100%-ig terjedő skálán kellett megadni. A program sikerességét az mutatta, hogy 94%-ban megtalálta a polipokat.

Gyomorrák diagnosztikában is alkalmaznak már mesterséges intelligenciát, például stádium meghatározásánál (Yoon és mtsai, 2018) vagy a *Helicobacter pylori* fertőzés esetében (Huang és mtsai, 2004; Itoh és mtsai, 2018; Shichijo és mtsai, 2017).

A korai rákfelismerésnél (Kanesaka és mtsai, 2018; Miyaki és mtsai, 2015) is történt AI segítséggel való meghatározás. Ez utóbbi nagy lépés az orvoslás területén, hiszen segíti és gyorsítja a kezelés hatékonyságát, ezáltal pedig a halálozások számát csökkenti. A virtuális, új kromoendoszkópos technika, illetve AI közös alkalmazása lehetővé teszi a mielőbbi rákfelismerést.

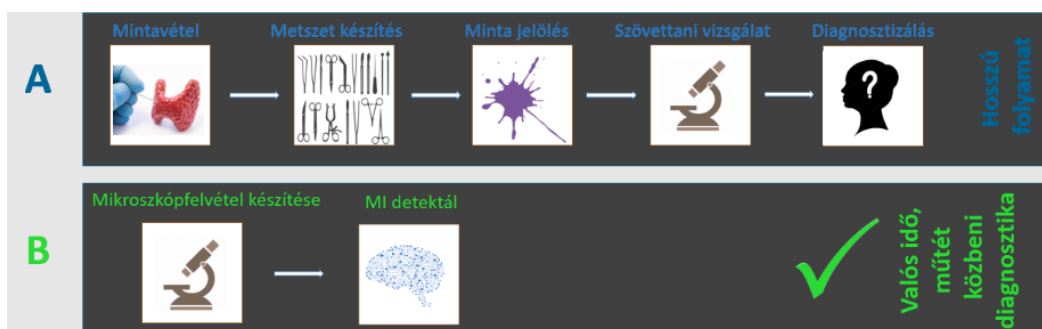
Egy másik kutatás során pedig a vérzés jelenlétét mutatták ki, a „normál” nyálkahártyával összehasonlítva, amely szintén képelemzési és tanulási algoritmusokon alapul, kapszulaendoszkópiát felhasználva (Aoki és mtsai, 2019).

II. CÉLKITŰZÉS

Dolgozatom célja egy új, jelölés mentes - tumorbiológiában alkalmazható - detektálási módszer tesztelése, mely gépi tanuláson alapuló rákos szövet felismerést tesz lehetővé Stimulált Raman-szórás mikroszkóp felvételekből. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk készített Stimulált Raman-szórás mikroszkóp felvételekből milyen információkat lehet kinyerni gépi tanulás által. Ezért a következő lépéseket tűztük ki célul:

- SRS mikroszkóppal történő mérések kivitelezése.
- SRS mikroszkóp által képfelvételek készítése a szövetekről.
- Szövetek elemzése, klasszifikálása és címkézése.
- Mesterséges neuronháló betanítása a minták osztályozására.
- Gépi látás modell pontosságának meghatározása, az eredmények értékelése.

Hosszútávú célként szolgálhat az, hogy a Stimulált Raman-szórás mikroszkópokat műtét közbeni diagnosztikai eszközként használjuk, ahol mesterséges intelligencia ismeri fel a rákos szöveteket. Ezáltal időt, pénzt és emberi erőforrást lehetne megspórolni. Ez a módszer gyors, jelölés mentes eljárás, ami lehetővé tenné azt, hogy műtét közben kiderüljön, vajon az adott szövet mutat-e tumoros elváltozást vagy sem. Ezáltal nem kellene több napos szövettani vizsgálatra elküldeni a mintát és szükség esetén egy újabb műtét végrehajtani a tumor eltávolítása érdekében. E módszer által egyből meg lehetne állapítani, illetve eltávolítani a rákos elváltozást. A dolgozatomban is vizsgált, hasnyálmirigy rák esetében amiatt is lehet előnyös ez az eljárás, mert rendkívül gyors lefolyású a betegség, ahol napok is meghatározóak lehetnek a betegség kimenete tekintetében. Egy ilyen diagnosztikai módszerrel pedig nagyobb esélyt adhatnánk a betegeknek.



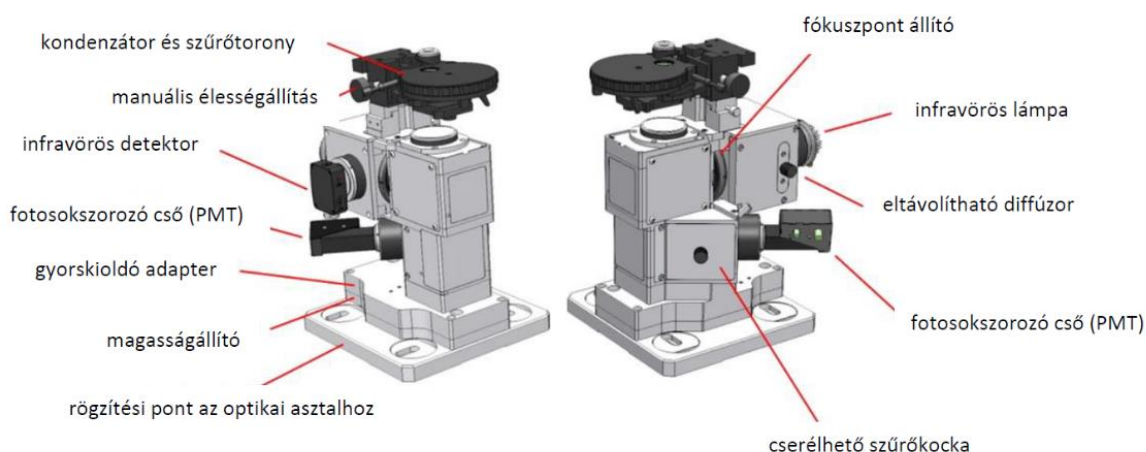
4. ábra Jelenlegi vizsgálómódszerek hosszas folyamata (A), Hosszútávú cél szemléltetése: valós időben történő, műtét közbeni diagnosztika (B) (saját készítésű ábra)

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálataink során Stimulált Raman-szórás mikroszkópiával dolgoztunk és rákos hasnyálmirigy szöveteket vizsgáltunk. Az SRS mikroszkóp segítségével fényképeket készítettünk a vizsgált szövetekről, majd ezeket a szöveteket elemeztük, határoztuk, illetve felcímkéztük, előkészítve a gépi tanulás fázisát. A felcímkézett képeket felhasználva, mesterséges intelligenciát alkalmaztunk, melynek fő célja a gépi tanulás alkalmazása a szövetek felismerésre. Tehát kutatásunk 4 fő lépésből állt: **SRS mikroszkópia és digitális képfelvétel; szövetek elemzése, határozása, osztályozása és címkézése; mesterséges neuronhálónak a betanítása a minták osztályozására; illetve analízis és gépi tanulás alkalmazásának tesztelése a szövetek felismerésére.**

1. Az általunk használt SRS mikroszkóp felépítése és tulajdonságai

Az SRS mikroszkópia a biológia tudományterületén még újdonságnak számít. E mikroszkópok folyamatos fejlesztés alatt állnak, illetve a módszerek tesztelése is zajlik. Az általunk használt SRS mikroszkópokat a Femtonics Kft. fejleszti. A módszer tesztelése, a mikroszkópi mérések kivitelezése a Femtoicsnál zajlott. Az általunk használt mikroszkóp felépítését az **5. ábrán** részletezem.



5. ábra SRS mikroszkóp felépítése (Femtonics)

2. Az SRS mikroszkóppal történő mérések menete

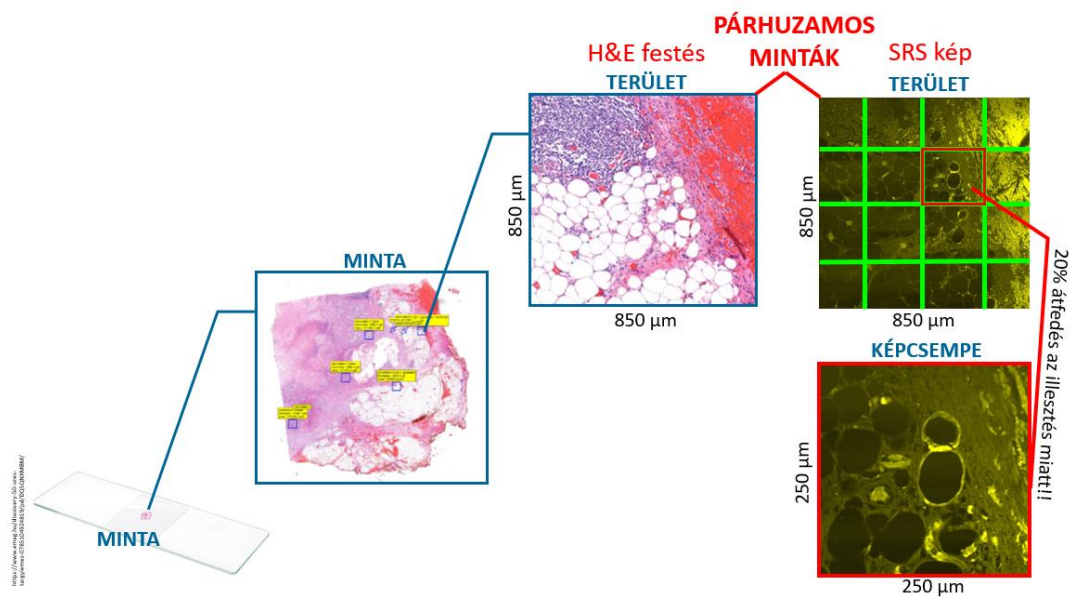
A felhasznált szövetminták:

A mérések során a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetből kaptunk, rákos hasnyálmirigy metszetekkel dolgoztunk. A kapott minták anonimak voltak, a klinikai patológusok által elkészített markerek pedig titkosak. Az Intézet semmilyen információt nem adott, emiatt a betegek számát, nemét, korát sem lehet tudni, illetve azt sem, hogy a minták mikor készültek. Csupán azt tudjuk, hogy a minták egy általuk korábban létrehozott paraffinált, fixált minta adatbázisból származnak. A rák típusáról pedig csak annyit tudtunk, hogy mirigyeket érintő rák volt.

Mi jelöletlen mintákat használtunk, hogy a mikroszkópiát ne zavarja a jelölés. Ugyanazon minták párhuzamos mintáival dolgoztak a patológusok, viszont ők jelölt mintákat használtak, hemotoxin-eozin festéssel. Ez azért volt lényeges, hogy az elemzések végén össze lehessen vetni az adatokat. Tehát ugyanazon a mintán történő párhuzamos vizsgálatot végeztünk mi az SRS mikroszkópiával, jelöletlen mintákon és a patológusok jelölt mintákkal dolgoztak, amik a hagyományos jelölés technikájával készültek.

A mintákat tárgylemezen kaptuk, amelyeket paraffin mentesítettek és a mérések előtt 1-2 nappal kerültek hozzánk, majd a mérés után vissza is juttattuk azokat. A kapott minták, olyan szövetek voltak, amelyet műtét során távolítottak el és fixáltak. Mivel kíváncsiak voltunk arra, hogy hogyan viszonyul a fixált metszeteken történő betanulás a való életben várható mintákhoz (pl. biopsziák) képest, emiatt egereken teszteltük e folyamatot (humán mintákon ez nem volt engedélyezve): összepréselt nem fixált és fixált egér mintákat vizsgáltunk. Sok különbség nem volt látható (valószínűleg az MI találna különbséget, de nagyon hasonló lenne az eredmény).

A minták átlagos vastagsága 4 μm volt, melyeken változó számú (2 és 7 között) 850x850 μm -es területeket jelöltek ki (pl. **6. ábra**). Azért dolgoztunk 850x850 μm -es területekkel, mert az SRS mikroszkópon folytatott munka során egy látómező megfelelő kivilágítottsága elég kicsi volt, kb 250x250 μm . Nagyobb „mozaik csempéknél” a kép szélei teljesen sötétek, információ hiányosak voltak. A mozaik jó átfedéséhez kellett a 20% átfedés a széleken, ezért lettek végül a 4 x 4 mátrixú fotó csempék, kb 850 x 850 μm (**6. ábra**). 25 mintát dolgoztunk fel, melyeken összesen 91 kijelölt területet vizsgáltunk.

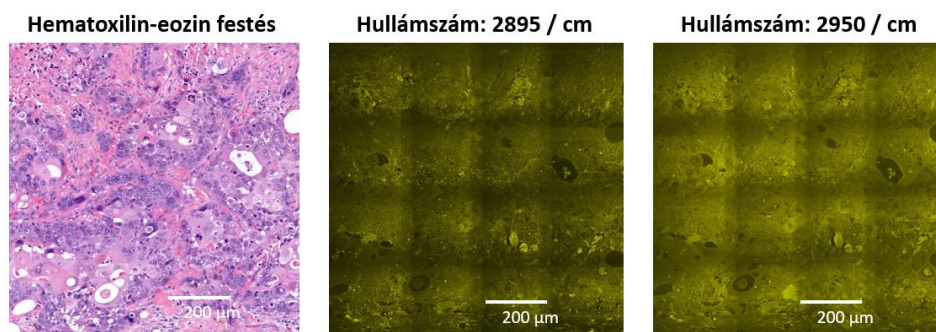


6. ábra Minta, terület és képcsempe léptékei (saját készítésű ábra)

Szövetvizsgálat az SRS mikroszkóppal:

Egy minta vizsgálata átlagosan 6-8 órát igényelt. A mikroszkóp fejlesztés alatt állt, emiatt folyamatos ellenőrzési eljárások is zajlottak a mérésekkel párhuzamosan, pl. napi szinten kalibrálni kellett az alapbeállításokat, hogy a két lézer nyalábja pontosan fedje egymást vagy folyamatosan történt az adatok rögzítése az optikusoknak, mérnököknek. Ezek a tényezők a szövetek tényleges vizsgálati idejét hosszabbították.

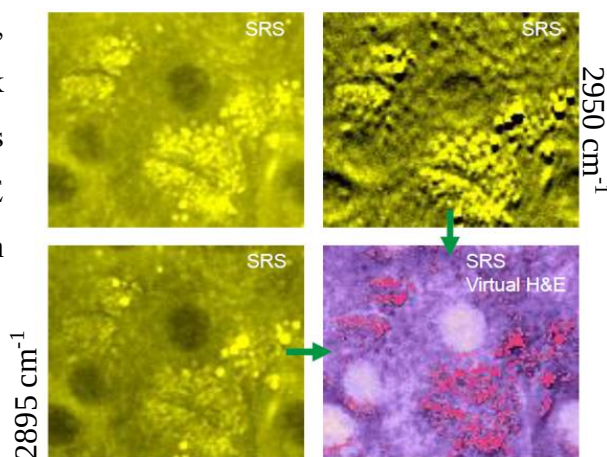
A berendezések bekapcsolása és a programok elindítása után, egy megadott mérési protokollt követve végeztük a mérési folyamatokat. Ellenőrzési eljárásaként először tárgylemezre helyezett 10 µm-es polisztirol fluoreszcens gyöngyöket használva hangoltuk be a mikroszkópot, illetve készítettünk ellenőrző képeket. Ezt követően eltávolítottuk a gyöngyökkel ellátott tárgylemezt és a rákos szöveteket helyeztük a tárgylemeztartóba. 20x, vízimmerziós objektívet használtunk, tehát desztillált vízzel immergáltunk, fedőlemezt nem használtunk.



7. ábra Hematoxin-eozin festés során készül minta mikroszkopikus képe, illetve az SRS mikroszkóppal készült képek (két különböző hullámszámon)

CaseViewer programot használtunk, ahol rendelkezésre álltak a patológia által fényképezett párhuzamos hematoxilin-eozin szövettani festési eljárás során készült képek. A mikroszkópon a kamera képet fókuszba hoztuk és megkerestük a patológia által kijelölt területeket, amelyeket két hullámszámon³ (WN⁴₁=2950, WN₂=2895) vettünk fel (7. ábra).

Azért ezt a két hullámszámot használtuk, mert 2950 cm⁻¹-en a fehérjék gerjesztődnek jobban, míg 2895 cm⁻¹-en a lipidek (Cheng és mtsai, 2016). Ez a duális jelölés jellemző a H&E festés során, ahol a hematoxilin a nukleinsavakat festi lilás-kék színűre, míg az eozin a fehérjéket festi rózsaszín-vöröses színűre. Tehát a két hullámszám együttes alkalmazásával egy **virtuális H&E jelölést** szeretnénk volna elérni (8. ábra).



8. ábra Virtuális H&E kép szemléltetése a két hullámszám együttes alkalmazása által.

Egy terület mérése kb. 20 percig futott. Az elkészült képmozaikokat automatizált, Fiji program segítségével illesztettük össze, majd mindent lementettünk egy mérési mappába. Ezekkel a képekkel dolgoztunk tovább az elemzések során.

3. Szövetek meghatározása és osztályozása

A gépi tanuláshoz elengedhetetlen a képek annotálása (felcímkézése), hiszen ez alapján tanítjuk be a gépet az önálló rákfelismerésre. Minden egyes képet jelöltünk az alapján, hogy található rákos elváltozás vagy sem. A határozást én végeztem, figyelve és elemezve az SRS, illetve a H&E képeket is. Ahol osztódásban lévő, nagyszámú sejtet láttam (sejtburjánzás), formájukban és méretükben variábilis sejtmaggal, azok az szöveteket rákosnak nyilvánítottam. Mindemellett a sejt karakterének változása, a tipikus szövetelrendezés, -szerveződés felbomlása, illetve a szövethatárok elmosódása is a tumoros jellegre utalt, így ezeket is rákosnak nyilvánítottam. Excel 2016-os táblázatkezelő programban dolgoztam: azokat a képeket, melyeken találtam rákos elváltozás 1-es számmal láttam el, míg azok a képek melyeken nem volt észlelhető rákos elváltozás 0-ás számot kaptak.

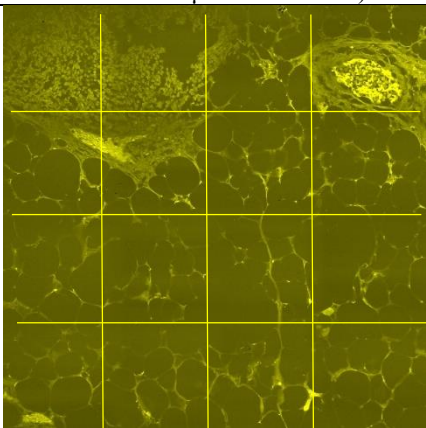
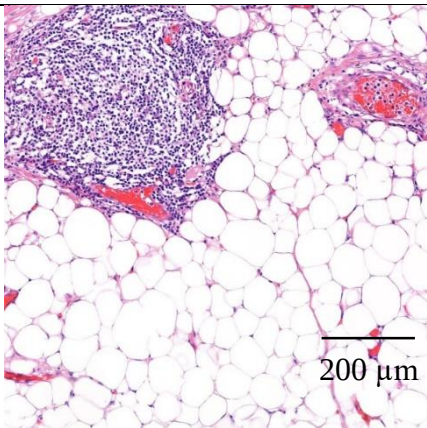
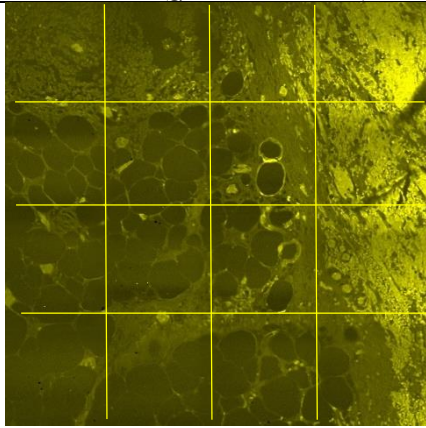
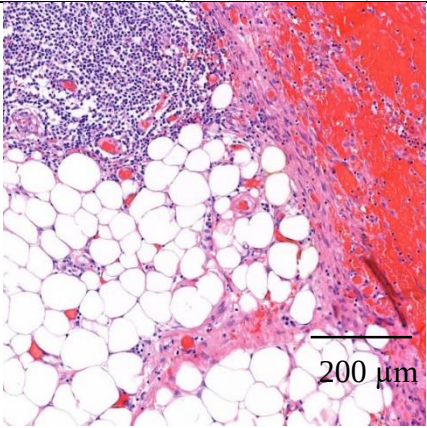
³ Hullámszám = egy hullámtulajdonság, ami a hullámhossz reciprokával jellemző.

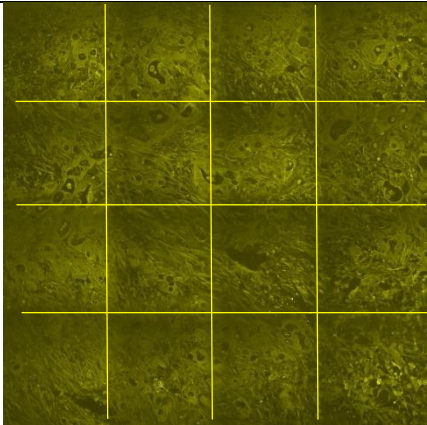
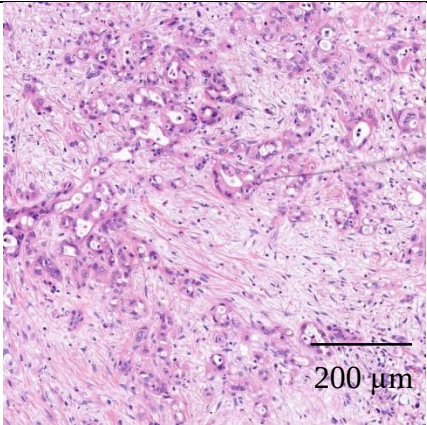
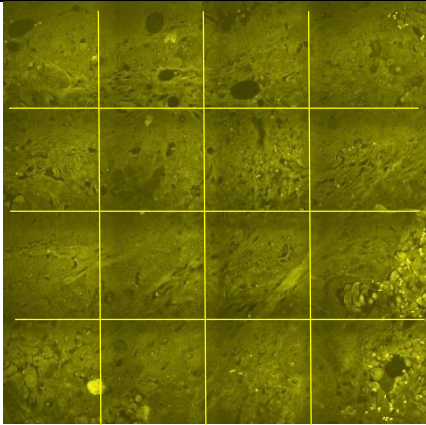
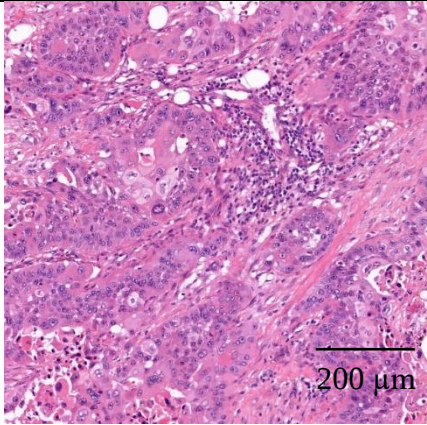
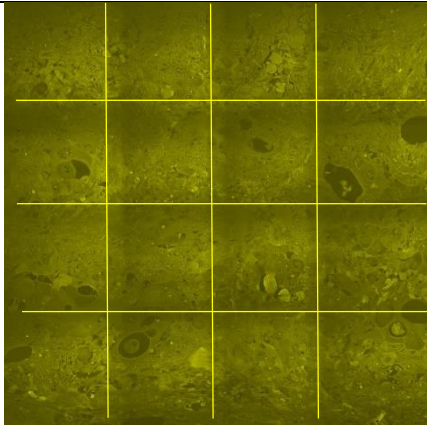
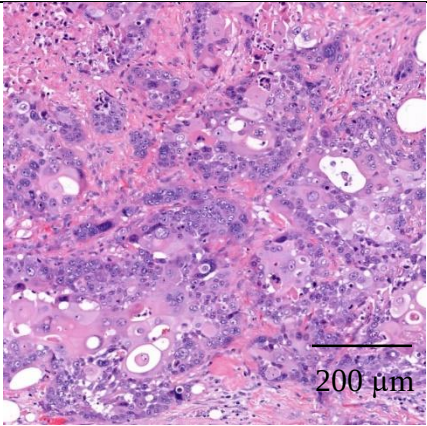
⁴ WN = Wavenumber = hullámszám

A 91 kijelölt terület összesen 1 456 képből állt (91 x 16), melyből 1 424 képet sikerült kiértékelni. (A kiértékeletlen képeket figyelmen kívül hagytuk és nem használtuk fel az adatelemzés során.) Mivel minden képet két hullámszámon (2895, 2950) vettünk fel, ezért összesen 2 848 képpel dolgoztunk.

A szövetek meghatározását szakirodalmi kutatómunka előzte meg, illetve tumorbiológiai, szövettani kurzusok elvégzése is hozzájárult a szövetek felismerésének és elemzésének sikerességéhez. A meghatározást segítette az is, hogy a mintákat lefényképezték a patológusok, hematoxin-eozin festés után is. Tehát a meghatározásnál az SRS és a hematoxin-eozinos festett képeket összehasonlítva határoztam, amint azt az **1. táblázat** is mutatja.

1. táblázat Szövetminta felvételek összehasonlítása (bal oldalon az általunk készített SRS mikroszkópi képek, jobb oldalon a párhuzamos minták a H&E festési technikával).

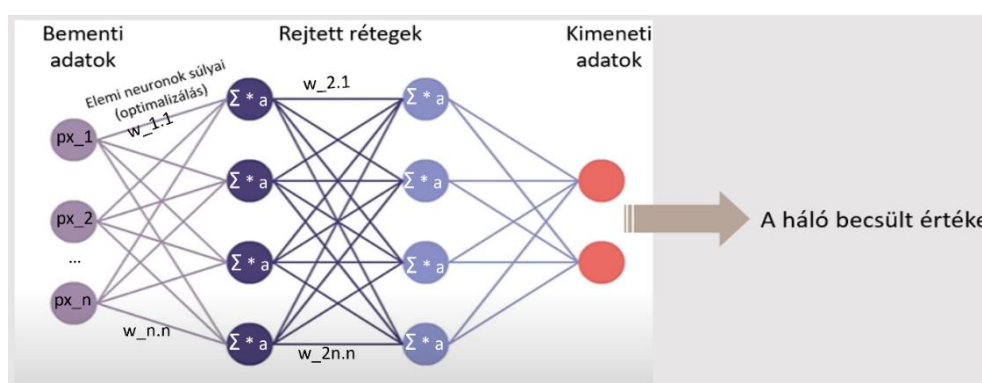
Osztályozás	SRS mikroszkópos felvétel (szkenelési hullámszám: 2950; 850 x 850 µm-es területek)	Patológia (850 x 850 µm-es területek)
Fals (Negatív kontroll minta)	 <i>Nem rákos (gyulladás és zsírszövet)</i>	 <i>Nem rákos (gyulladás és zsírszövet)</i>
Fals (Negatív kontroll minta)	 <i>Nem rákos (zsír + gyulladás + bevérzés)</i>	 <i>Nem rákos (zsír + gyulladás + bevérzés)</i>

Pozitív	 <i>Tumor</i>	 <i>Tumor</i>
Pozitív	 <i>Tumor</i>	 <i>Tumor</i>
Pozitív	 <i>Tumor</i>	 <i>Tumor</i>

4. Gépi Tanulás alkalmazása szövet felismerésre

Ezen munka során a gépi tanulást, mint eszközt alkalmaztam a minták automatizált osztályzásának eléréséhez. Ezen dolgozatnak nem célja a Gépi Tanulás eszköztárának részletes bemutatása. A kísérletek folyamán alkalmazott neurális hálózat, a tanítási módszerek, a tanítás során elért hiperparaméterek bemutatása informatív jellegű.

Az adatfeldolgozáshoz szükséges alaptudást a Deep Learning a gyakorlatban Python és LUA alapon (BME VIK TMIT) tantárgy⁵ keretén belül sajátítottam el. Szabadon, ingyenesen és nyílt forráskóddal elérhető neurális hálózatot használtunk, amelyek a PyTorch⁶ és a Torchvision⁷ gépi tanulás keretrendszerekből elérhetőek. (A PyTorch napjaink egyik széles körben elterjedt gépi tanulás keretrendszere, amely támogatja valamennyi alkalmazási területen (pl. gépi látás, természetes nyelv feldolgozás, megerősítéssel tanítás) a mély neurális hálózatok tanítását. A Torchvision egy könyvtár, ahol a valaha létrehozott és szabványosított gépi látásra alkalmazott mély neurális modell architektúrák elérhetőek.) Előzetes felmérésként 11 modellt (AlexNet, ConvNet, EfficientNet, GoogLeNet, Inception V3, Regnet, ResNet18, ResNet50, ResNet101, SqueezeNet, VGG) próbáltunk ki a Torchvision könyvtárból. Adatainkon való tanuláskor a **ResNet18** architektúra mutatta a legjobb eredményt, így ezzel a modellel dolgoztunk. Ez az architektúra alapjáraton elterjedt rákos szövetek elemzésében (Bukhari és mtsai, 2021; Sarwinda és mtsai, 2021; Vasu és mtsai, 2022; Wong és mtsai, 2022).



9. ábra A tanítás fázisainak szemléltetése a neurális hálón keresztül (saját szerkesztésű ábra)

A tanítás fázisa négy lépésből állt, amelyet a (9. ábra) is szemléltet. Ezt a négy lépést megelőzte egy **előfeldolgozás** (12. ábra), mely 3 lépésben zajlott: első lépésként **skálázást** hajtottunk végre, amikor a képek eredeti méretét (1000 x 1000 pixel) lekicsinyítettük 244 x 244-es pixelméretre. (A kicsinyítéssel természetesen jár némi adatvesztés, de az nem befolyásolja számottevően a modell eredményét.) A második lépés a **véltelenszerű elfordítás** volt, melynek célja az adatdúsítás. (Mivel a gépi tanuló modell feladata a képek osztályozása, ezért fontos, hogy ugyanazt a mintát több szemszögből is lássa.) Az elfordítás horizontális vagy vertikális irányba történt. Harmadik lépésben a **normalizálás** következett. Ennek a lépésnek a

⁵ <http://smartlab.tmit.bme.hu/oktatas-deep-learning>

⁶ <https://pytorch.org/>

⁷ <https://pytorch.org/vision/stable/index.html>

lényege, hogy a pixel értékeket normalizáljuk egy adott tartományba. A normalizálás során megváltoztatjuk a pixelintenzitás értékek tartományát, úgy hogy egy adatszetten mérve normál eloszlást kapjunk. Ez a folyamat egy alap módszer a gépi látás területén, mert szignifikánsan felgyorsítja a tanítási műveletet és jobb eredményhez is vezet.

A tanítás fázisainak **(9. ábra) első lépésben** - az előfeldolgozás után - a bementi adatokat (képek: pixel értékei ($px_1, px_2 \dots px_n$)) betöltöttük a tanítási ciklusban.

Második lépésben a kimeneti eredmények számítása következett. A számítógépes programban a képek számtani ábrázolásként vannak értelmezve (pixel értékek). A fenti ábrán **(9. ábra)** szemléltetett csomópontokat neuron csomópontoknak nevezzük, amelyek számításokat végeznek, összeadnak és szoroznak a következők szerint [2.]:

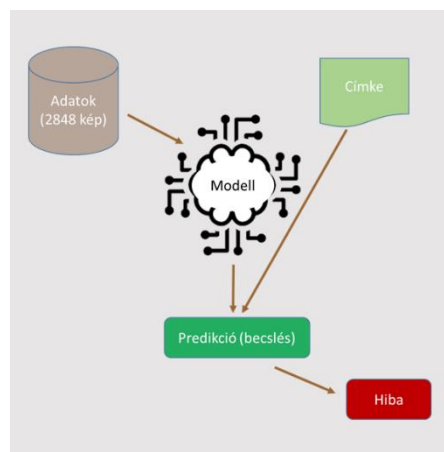
$$y = \sum (px_n * w_n) * a \quad [2.]$$

, ahol y a neuron kimenete, a px_n egy korábbi rétegből származó érték (pl. bemeneti rétegből származó pixel érték), a w_n a neuronok összeköttetését súlyozó érték, az a pedig az aktivációs függvény. (Tehát egy neuronnak a csomópont kimenete egyenlő a beérkező (előző) csomópontok súlyozással való szorzatának összegével, majd pedig ezt az összeget még megszorozzuk az aktivációs függvénnyel.) Fontos megjegyezni, hogy a súlyok a tanítás kezdetén teljesen véletlenszerű értéket vesznek fel, de ezek az elemek képezik a tanítás lényegét, mert a tanítási ciklus ezen értékek módosításán alapszik. Tehát a súlyozások tárolják azokat az információkat, melyek megadják, hogy mennyire fontos egy bementi pixel értéke a kimeneti eredmény előállításához. Miután az összes csomóponton elvégződtek a számítások, megkapjuk a kimeneti értékeket. Mivel a kezdeti ciklusokban a véletlenszerű súlykiosztások miatt a háló kimenetén nem az elvárt értéket kapjuk (lásd 0, ha negatív és 1, ha pozitív a beadott mintánk osztályozása) így valójában egy hibát kapunk, ami mérhető az elvárt kimenethez.

Harmadik lépésben történt a hibafüggvény kiszámítása. Ez matematikailag egy deriválást jelent, lánc szabállyal, ami gradienseket térít vissza. Tulajdonképpen ez azt jelenti, hogy visszamérjük az egységnyi w_n súlyok mekkora mértékben járultak hozzá a kimeneti hiba eredményéhez.

Negyedik lépésben történt a kimeneti hibából számított gradiensek visszafejtése az egységnyi súlyokba. Ez maga a tanítás lényege, melynek cél, hogy a súlyokat olyan értékekre módosítsuk, amelyek a hibafüggvényt minimalizálják. Ez a négy lépés több milliószor ismétlődött, amíg a tanítás sikeressé vált.

Egyszerűen szemléltetve (**10. ábra**) a tanítás úgy zajlott, hogy a 2848 képet bevittük az általunk választott modellbe, mely a tanítás fázisai után kimutatott egy becsült értéket (predikció). Ezt az értéket összevetette az általunk megadott értékkel (címkézés értéke). Ebből pedig kiszámolta a hiba faktort.

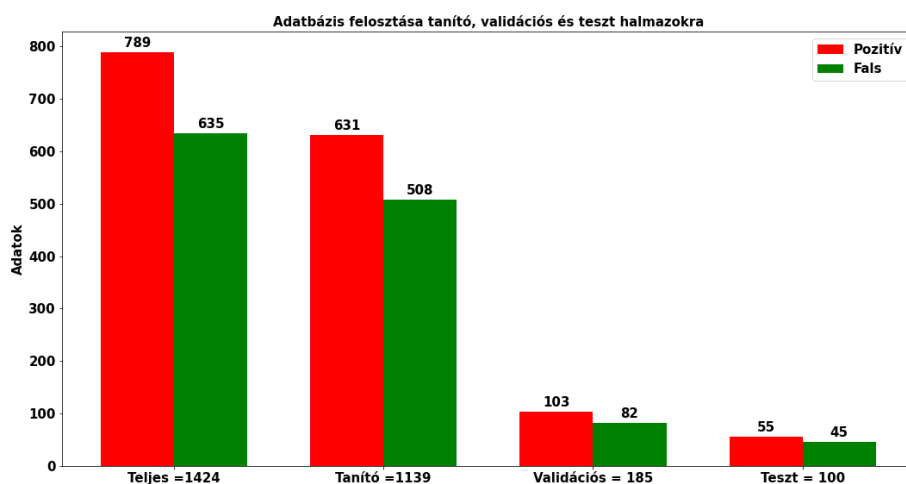


10. ábra Tanítási folyamat egyszerű szemléltetése (saját készítésű ábra)

Az algoritmusunk formák, színek, alakzatok alapján egy úgynevezett mintát, más néven összefüggést tanult meg az adatokból (képekből). Ezt az összefüggést - szabályrendszer alapján – a bemeneti képek számtani feldolgozása által kapta meg, melynek a kimenete egy osztályba történő becslési érték kimutatása.

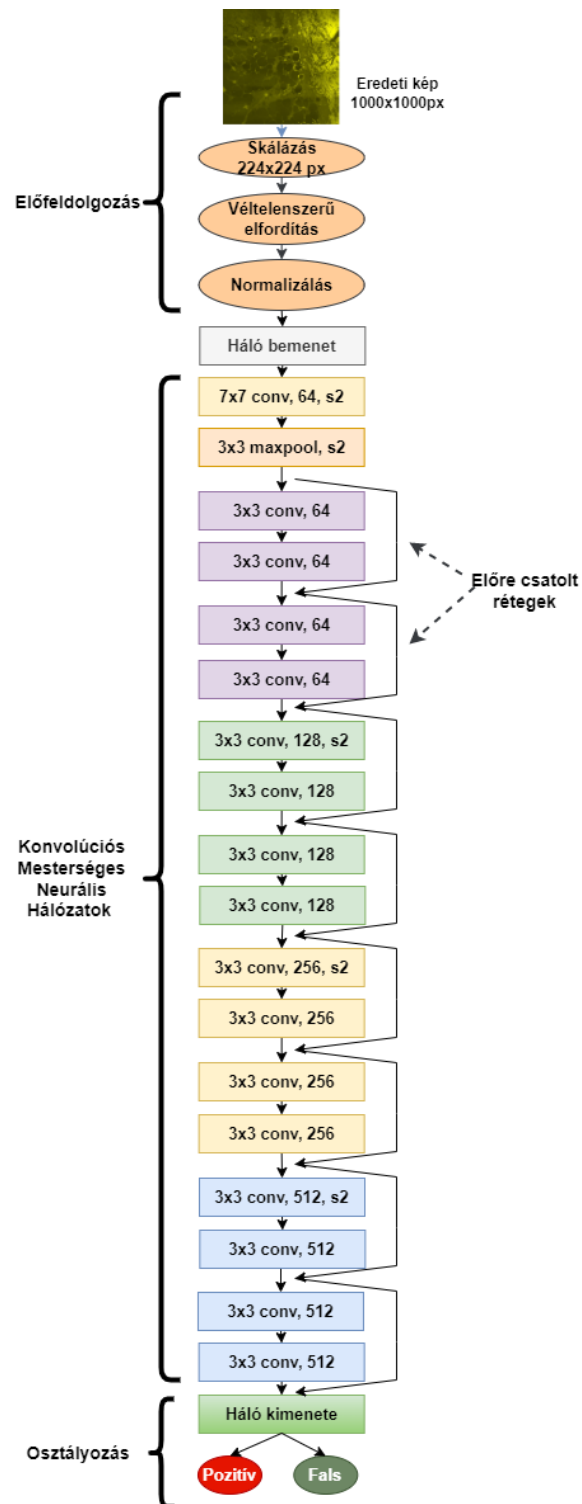
4.1. Az adatok feldolgozása és előkészítése a tanításra

A két hullámszámon (WN1=2950, WN2=2895) rögzített adatokat két fő adatbázisra osztottuk. Ezek után mindkét adatbázist 3-3 al-adatbázisra osztottuk le: tanító, validációs és teszt al-adatbázisokra. A tanító adatokat a tanítás fő fázisában használtuk fel. A validációs adatokat - a tanítás egy szekunder fázisában - használtuk az időbeni eredmények mérésére, illetve a tanítás hiperparamétereinek hangolására. A teszt adatbázist a betanult háló kiértékelésére használtuk és ebből vontuk le a fő következtetéseket. Ezeket az al-adatbázisokat úgy hoztuk létre, hogy a minták arányai megegyezzenek, ahogy azt a **11. ábra** is szemlélteti.



11. ábra Adatbázis felosztási arányok (teljes adatbázis mellett a 3-3 al-adatbázis: tanító, validációs és teszt al-adatbázisok). Adatbázis felosztási arányok (teljes adatbázis mellett a 3-3 al-adatbázis: tanító, validációs és teszt al-adatbázisok).

4.2. Modell architektúra



12. ábra Konvolúciós Neurális Hálózat architektúrájának elvi rajza

A **12. ábra** szemlélteti az alkalmazott neurális hálózat elvi rajzát. Az architektúrát (He, 2015) munkája alapján definiáltam és a ResNet18 nevet viseli, mert a modell 18 tanuló réteget tartalmaz. Az adatok mielőtt a mesterséges neurális hálózat bemenetére kerültek előbb három előfeldolgozási lépésen mentek keresztül (lásd: Gépi Tanulás alkalmazása szöveg felismerésre fejezet).

4.3. Tanítás

A tanítást Linux operációs környezetben hajtottuk végre és minden kódrészletet Python programnyelven írtunk. A tanításhoz egy Nvidia Titan V100-as grafikai processzor (GPU) állt rendelkezésünkre. A tanítás folyamán kategorikus kereszt-entrópia veszteség függvényt alkalmaztunk. Működési elve, hogy a módszer összehasonlítja a predikciók eloszlását a valós eloszlással és a valós osztály valószínűségét 1-re, a többi osztályét pedig 0-ra állítja.

A neurális háló felépítésében egy Python programozói nyelven írt és nyílt forráskódú PyTorch⁸ gépi tanulás keretrendszert alkalmaztunk, amelynek célja a kutatások gyorsítása a programozási feladatok minimalizálása által.

2. táblázat A neurális hálózat hyperparaméterei

Hiperparaméter	Érték
veszteség függvény	kategorikus kereszt-entrópia
neurális rétegek aktivációs függvényei	ReLU
optimizer (optimalizáló algoritmus)	SGD
Learning rate (tanulási faktor)	0.001
momentum	0.9
batch méret (tanítás során összekötegetett bementei minták száma)	128
epoch (ciklusok száma)	10000
neurális hálózat model	ResNet18 ⁹

A tanítás folyamán a tanító (optimizer) fő feladata a költség függvény (loss = „categorical crossentropy”) minimalizálása volt. Egy tanítás körülbelül 3 órát vett igénybe a megfelelő hiperparaméterek megtalálása után, amelyeket a **2. táblázat** foglal össze.

⁸ <https://pytorch.org/>

⁹ <https://pytorch.org/vision/main/models/generated/torchvision.models.resnet18.html>

4.4. Metrikák

A modell tanítása folyamán a validációs halmazon rendszeresen végeztünk méréseket a konfúziós mátrix értékei alapján, amelyet a **3. táblázat** mutat be. A táblázatban a rövidítések az angolszász rövidítéseknek felelnek meg.

3. táblázat Tévesztési mátrix

		Valós érték	
		Pozitív	Negatív
Becsült/Prediktált érték	Pozitív	TP (igaz pozitív)	FP (fals pozitív)
	Negatív	FN (fals negatív)	TN (igaz negatív)

A táblázat egyes elemei a következőképpen értelmezendők:

- **TP (igaz pozitív)** - az osztályozási modell által helyesen prediktált pozitív esetek számának felel meg.
- **FP (fals pozitív)** - azon negatív esetek számának felel meg, amelyeket az osztályozási modell tévesen pozitívként prediktál.
- **FN (fals negatív)** - azon pozitív esetek számának felel meg, amelyeket az osztályozási modell tévesen negatívként prediktál.
- **TN (igaz negatív)** - az osztályozási modell által helyesen prediktált negatív esetek számának felel meg.

A tévesztési mátrixból származtatjuk az alábbi metrikákat:

- **Pontosság** = $\frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN}$, ez az érték fejezi ki, hogy mennyire közelíti meg valamely észlelés eredménye a jelenség valódi értékét. Abban az esetben nyújt fontos információt, amikor a valódi érték nem észlelhető teljes bizonyossággal, de becsülhető az elért pontossággal.
- **Precizitás** = $\frac{TP}{TP+FP}$, azon minták hányadát határozza meg, amelyek ténylegesen pozitívak az osztályozó által pozitív besorolásúként meghatározott halmazban. Minél magasabb a precizitás (0-tól 100%-ig terjedő skálán), annál alacsonyabb az osztályozó által elkövetett FP (fals pozitív) hibák száma.
- **Felidézés** = $\frac{TP}{TP+FN}$, az osztályozó modell által helyesen prediktált pozitív esetek hányadát méri. Minél magasabb a felidézés (0-tól 100%-ig terjedő skálán), annál

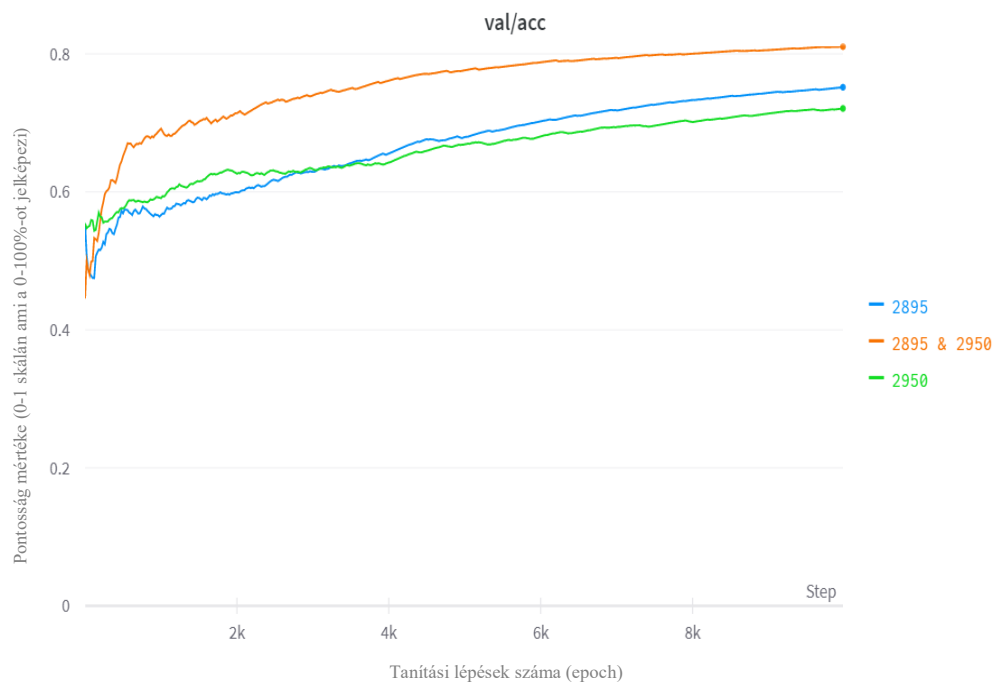
alacsonyabb az osztályozó által elkövetett pozitív minta hamisnak történő becslése. A felidézés értéke ekvivalens a TP (igaz pozitív) becslések arányával.

- $F1 = \frac{2}{\frac{1}{\text{Felidézés}} + \frac{1}{\text{Precizitás}}}$, a felidézés és a precizitás mértékét foglalja össze egyetlen értékbe. Ha az F1 mértéke nagy, az a precizitás és a felidézés egyaránt meglehetősen nagy mértékét jelenti.

IV. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. Eredmények

Dolgozatomban az eredmények kiszámítása a tévesztési mátrixból számított értékek alapján értelmezhető. Ebből az általunk kiválasztott legfontosabb érték a Pontosság mértéke, mivel arra voltunk kíváncsiak, hogy mennyire közelítette meg az észlelés eredménye a jelenség valódi értékét. Az az milyen pontossággal tudja elkülöníteni az MI a rákos és nem rákos szöveteket. Mivel jelen munka során az adatokat két osztályra címkéztük (pozitív vagy fals) ezért a többi metrika mind a Pontosság változásával korrelál, így azokat a dolgozat nem taglalja külön.



13. ábra Validációs adaton mért Pontosság értéke. Ordináta: pontosság mértéke 0-1 skálán ami a 0-100%-ot jelképezi. Abszcissa: tanítási lépések száma (step = epoch)

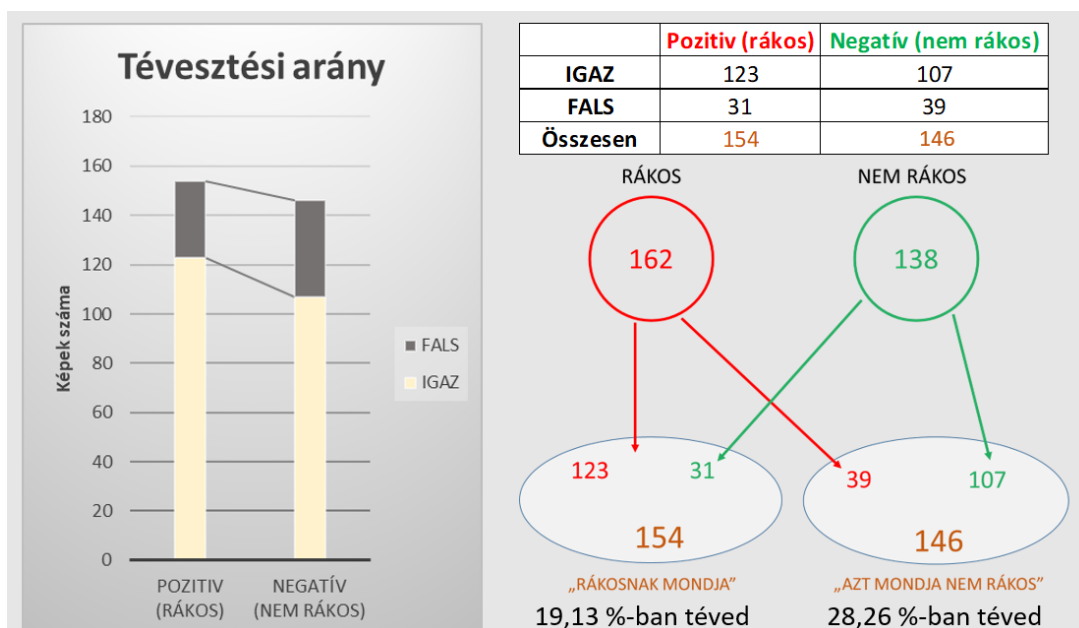
Összesen három tanítási eredmény került összehasonlításra: a 2895 cm⁻¹ és 2950 cm⁻¹ hullámszámmal készített mintákról külön-külön végzett tanításokról, illetve egy harmadik tanítás, ahol az adatokat összevontuk. E tanítások folyamatát a **13. ábra** szemlélteti, ahol jól követhető, hogy minél több a tanítási lépések száma (step = epoch), annál nagyobb a pontosság. Ugyanakkor a tanítási folyamat előrehaladtával a neurális hálózat „beáll” egy adott pontosságra.

A tanítás során elért legjobb egzakt Pontosságokat a **4. táblázat** foglalja össze. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a neurális hálózat jobb pontosságot volt képes elérni a 2895 cm⁻¹ hullámszámmal készített mintákon. Ez azt is mutatja, hogy az MI a lipideket nagyobb pontossággal fel tudja ismerni, a fehérjékkel szemben. Továbbá az összevont adatbázison mért tanításokon sikerült a legjobb pontosságot elérni, aminek az egyszerű magyarázata az, hogy minél több adatunk áll rendelkezésre annál jobb általánosításra, azaz tanulásra képes a hálózat.

4. táblázat Tanítás folyamán elért validációs pontosság

Adatbázis	Pontosság
2895 cm ⁻¹	75.17 %
2950 cm ⁻¹	72.09 %
2895 & 2950 cm ⁻¹	81.07 %

Egy tesztelés során kimutattuk a tévesztési arányt is. Vettünk összesen 300 képet az adatbázisunkból - melyből 162 kép rákos volt és 138 kép nem volt rákos – és megfigyeltük, hogy ez alapján milyen eredményt kapunk. Az MI a 162 rákos képből 123 képre mondta azt, hogy rákos, míg 39 képet átsorolt a „nem rákos” kimenet közé. A nem rákos képek közül 107 képet jól ismert fel és 31 képet átsorolt a „rákos” kimenet közé. Ez alapján elmondható, hogy az MI nagyobb hibával (28,26 %-ban téved) téveszti a nem rákos szöveteket, mint a rákos szöveteket (19,13 %-ban téved) (**14. ábra**).



14. ábra Tévesztési arány kimutatása saját adatok alapján

2. Következtetések és összefoglaló

Összességében elmondható, hogy a kitűzött célok mind teljesültek: az SRS mikroszkóppal történő mérések, képfelvételek kivitelezése sikeresnek mondható. A szövetek elemzését, klasszifikálását és címkézését is sikerült elvégezni, illetve a mesterséges neuronháló betanítása - a minták osztályozására – is sikeres volt. A gépi látás modell pontosságának (81%) meghatározása azt mutatja, hogy a tanítás eredményes volt. Az eredmények pozitívak, viszont még csak iránymutató jelleggel bírnak. E téma nagy potenciált jelent a jövőre nézve. A pontosabb munkához viszont több adatra lenne szükség, illetve a bináris osztályozást ki kellene bővíteni, amihez további szakértői szem szükséges.

Elmondható tehát, hogy a tesztelés sikeres volt, a kidolgozott módszer (kezdve a mikroszkopizálástól, a szövetek határozásán keresztül, az MI betanításáig) azt mutatja, hogy a jövőben hasonló módszerek által megvalósulhat a műtét közbeni diagnosztika. Ehhez viszont még nagyon sok kutatómunka (pl. MI betanítása különböző – nem csak hasnyálmirigy - ráktípusok felismerésére) és fejlesztés (pl. mikroszkóp fejlesztése) szükséges.

Dolgozatom további lépéseként, például lehetne növelni a pontosságot azáltal, hogy szakembert is bevonunk a szövetek határozására, ugyanis a 19% pontatlanság abból is adódhat, hogy a szövetek határozásában történt hiba a jelenlegi vizsgálat során.

Érdemes lenne azt is megvizsgálni, hogy az osztályozott tulajdonságok között van-e szignifikáns különbség a két (pozitív és negatív) csoport között, illetve azt is megnézni, hogy milyen tulajdonságok esetén található szignifikáns különbség.

A módszert a jövőben még úgy is fejleszthetnénk, hogy a szövetek részletesebb elemzésére is betanítjuk a gépet. Ehhez például a meglévő képeken konkrétan berajzoljuk a rákos részeket és ez alapján címkézünk. Mindemellett a különböző szövettípusokat is külön lehetne berajzolni és címkézni. Így azt is meg tudnánk nézni, hogy az MI milyen szövet típussal téveszti jobban a rákos szöveteket. Tehát nem csak kettős adatokkal dolgozni, hanem konkrétan berajzolni, majd címkézni a különböző szövettípusokat (pl. zsír-, kötő-, idegszövet stb.).

Akár prognózist is lehetne előre jelezni pozitív képekből. Ehhez is az szükséges, hogy ne csak bináris adatokkal dolgozzunk, hanem egy progresszív skálát hozzunk létre a súlyosságról (pl. milyen sokat változik a struktúra enyhén és nagyon súlyos állapotok között).

A tanítást értelemszerűen a minél több adatbevitel segítené, ehhez pedig még több képre lenne szükség. Sokkal nagyobb szórásra és mintára volna szükség egy reprezentatív munkához. (Pl. 20.000-30.000 kép).

E kutatás megerősíti, hogy az SRS mikroszkópia lehetővé teszi a jelölés mentes vizsgálatokat. Előnye, – mindamelllett, hogy valós időben, élő sejtek vizsgálatát is lehetővé teszi - hogy el lehet kerülni a metszetek tartósítását, parafinba ágyazását, igényes elkészítését (pl. vékony, egyenletes vastagság), hosszadalmas festését. Az MI alkalmazásának sikeressége pedig azt erősíti meg, hogy a biológia és orvosi tudományterületeken is rendkívül hasznos lehet ezek alkalmazása a különböző adatfeldolgozásokban, elemzésekben, de még a diagnosztikában is. Mivel az MI képes betanulni bizonyos munkafolyamatokat, ezáltal pl. az orvostudományban, egészségügyben emberi feladatokat tudunk gépesíteni, automatizálni.

Zárógondolatként kijelenthetjük, hogy az eredményeink azt mutatják, hogy az SRS mikroszkópi módszer alkalmazása, illetve a mesterséges intelligencia közös alkalmazása távoli célként szolgálhat a mikroszkóp általi **műtét közbeni, valós időben történő, kevesebb lépésből álló diagnosztika** kifejlesztésére. Ezzel a rákdiagnosztikai módszerrel el lehetne kerülni a több napos szövettani vizsgálatokat, ami rendkívül felgyorsítaná (a jelenlegi módszerekhez képest) a vizsgálati időt. Továbbá a műtéti beavatkozások számát is csökkentené, azáltal, hogy műtét közben zajlana a diagnosztika és nem kellene megvárni a szövettani elemzés eredményét, majd újabb műtétet végrehajtani. Ennek köszönhetően egyrészt a betegek túlélési arányát növelhetjük, másrészt pedig a korlátozott számú szakértők munkáját segíthetjük, helyettesíthetjük.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Sok embernek köszönhetem, hogy ez a dolgozat elkészült. Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Márialigeti Károlynak (ELTE, Budapest) és Moni Róbertnek (BME VIK Doktorandusz).

Köszönöm a segítséget Dr. Barkóczy Balázsnak (Femtonics, Budapest), Dr. Szalay Gergelynek (Femtonics, Budapest), Farkas Mihálynak (Femtonics, Budapest), Bolla Róbertnek (Femtonics, Budapest), Dr. Tompa Tamásnak (Femtonics, Budapest), és Dr. Karácsony Orsolyának (Femtonics, Budapest).

Nem utolsó sorban, pedig nagy köszönettel tartozom családomnak és páromnak, Vizeli Gergőnek a rengeteg támogatásért.

KIVONAT

A rákbetegségek kezelése az orvostudomány számára még ma is komoly kihívást jelent. E területen nagyszámú kutatás zajlik, hiszen aktuális probléma megoldását szeretnék elérni a kutatók. A rákdiagnosztikában mindig is fontos szerepet játszott a mikroszkópia. A különböző mikroszkópok fejlődésével a diagnosztika is fejlődött. A hagyományos mikroszkópos diagnosztikai módszerek legtöbbször körülményes festési technikákat igényelnek, ami lassítja a diagnózis felállítását. Dolgozatomban egy új jelölésmentes detektálási módszert, a Stimulált Raman-szórás mikroszkópia (SRS) eljárását használtam rákos szövetek vizsgálatára. Ez egy új és hatékonyabb rákdiagnosztikai módszerként szolgálhat, amely potenciálisan gyorsabb az eddigieknél, köszönhetően annak, hogy jelölésmentes. Nincs szükség tartósításra, paraffinálásra és a metszetek elkészítése sem igényes, mivel nem igényel vékony, egyenletes vastagságú metszeteket, ez pedig a korábbiaknál gyorsabb diagnosztikai eljárást biztosíthat. Rákos hasnyálmirigy szöveteket vizsgáltunk és ezekről fényképeket készítettünk, melyeket gépi tanuláson alapuló programmal elemeztünk. A mesterséges intelligencia (AI) alkalmazása is fejlődő tudományterület, amely szintén újdonságot jelent, hiszen ezáltal történt az adatfeldolgozás. A biológia területén is egyre elterjedtebb. Napjainkban ugyanis egyre több adat és tudományos eredmény keletkezik a képalkotási módszerek terjedésével, illetve a nagy áteresztőképességű korszerű vizsgálati eljárások révén. Viszont egyre kevesebb a szakértő, akik ezeket elemezhetik, illetve az időhiány is korlátozza e nagymennyiségű adat feldolgozását. A folyamatosan bővülő kutatási eredmények feldolgozásában az AI nagy segítséget nyújthat, segítheti a klinikusok munkáját, a diagnózisok gyorsaságát és pontosságát. Az eredmények azt mutatják, hogy az SRS mikroszkópi módszer alkalmazása, illetve a mesterséges intelligencia bevonása távoli célként szolgálhat a mikroszkópos műtét közbeni diagnosztika kifejlesztésére.

Kulcsszavak: *Stimulált Raman-szórás mikroszkópia, gépi tanulás, rákdiagnosztika, hasnyálmirigy (pancreas)*

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Szócs Boróka** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **Gépi tanuláson alapuló tumoros szövet felismerés Stimulált Raman-szórás mikroszkópi felvételekből** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
<i>SRS mikroszkóppal történő mérések kivitelezése, képfelvételek készítése.</i>	4
<i>Szövetek elemzése, klasszifikálása és címkézése.</i>	5
<i>MI modell tanítása: Mesterséges neuronhálónak a betanítása a minták osztályozására.</i>	3
<i>Gépi látás modell pontosságának meghatározása, az eredmények értékelése.</i>	4

Kelt: Budapest, 2023. 01. 22.



.....

Pályamunkát benyújtó hallgató

Szócs Boróka aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



.....

Témavezető **Moni Robert** (BME, Budapest)

aláírása

NYILATKOZAT

Alulírott **Szócs Boróka** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **Gépi tanuláson alapuló tumoros szövet felismerés Stimulált Raman-szórás mikroszkópi felvételekből** című dolgozattal korábban nem vettem részt Országos Tudományos Diákköri Konferencián (OTDK). Ezzel a dolgozattal eddig csak az ELTE Biológus TDK-án (2022. november 26.) vettem részt, ahol 1. helyezést értem el és ezáltal továbbjutást szereztem a 36. OTDK-ra.

Nyilatkozom továbbá azt is, hogy a 36. OTDK-án egy másik dolgozattal is részt veszek, melynek címe **Háziméhek (*Apis mellifera*) testfelszíni gombaflóra összetételének vizsgálata**. (Továbbjutást 2021-ben a XXIV. Reál és humántudományi ETDK-án szereztem.) A két dolgozat kutatási témája teljesen független egymástól.

Nyilatkozom továbbá azt is, hogy 2019-ben a 34. Országos Tudományos Diákköri Konferencián (OTDK), biológia szekcióban különdíjat kaptam a **Hol és mikor híznak a méhek? Környezet- és korfüggő zsírfelhalmozás méheknél** című dolgozatomért. A két dolgozat kutatási témája teljesen független egymástól.

SZAKIRODALOM

- Aoki, T., Yamada, A., Kato, Y., Saito, H., Tsuboi, A., Nakada, A., ... & Tada, T. (2020). Automatic detection of blood content in capsule endoscopy images based on a deep convolutional neural network. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 35(7), 1196-1200.
- Bae, K., Zheng, W., & Huang, Z. (2020). Spatial light-modulated stimulated Raman scattering (SLM-SRS) microscopy for rapid multiplexed vibrational imaging. *Theranostics*, 10(1), 312.
- Berto, P., Andresen, E. R., & Rigneault, H. (2014). Background-free stimulated Raman spectroscopy and microscopy. *Physical review letters*, 112(5), 053905.
- Bukhari, S. U. K., Syed, A., Khalid, S. S., & Shah, S. S. H. (2021, December). The histological diagnosis of breast cancer by employing scale invariant ResNet 18 with spatial supervised technique. In *Proceedings of the 14th IEEE/ACM International Conference on Utility and Cloud Computing Companion* (pp. 1-6).
- Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(6), pdb-prot073411.
- Cheng, J. X., & Xie, X. S. (Eds.). (2016). *Coherent Raman scattering microscopy*. CRC press.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149(4), 778-789.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold spring harbor protocols*, 2008(5), pdb-prot4986.
- Freudiger, C. W., Min, W., Saar, B. G., Lu, S., Holtom, G. R., He, C., ... & Xie, X. S. (2008). Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science*, 322(5909), 1857-1861.
- Goral, V. (2015). Pancreatic cancer: pathogenesis and diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(14), 5619-5624.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.

- Hassan, C., Eelbode, T., & Bisschops, R. (2019). Equivalence between low adenoma detection and high miss rates: Is AI the ultimate response?. *Endoscopy International Open*, 7(11), E1355-E1356.
- Hollon, T. C., Pandian, B., Adapa, A. R., Urias, E., Save, A. V., Khalsa, S. S. S., ... & Orringer, D. A. (2020). Near real-time intraoperative brain tumor diagnosis using stimulated Raman histology and deep neural networks. *Nature medicine*, 26(1), 52-58.
- Horie, Y., Yoshio, T., Aoyama, K., Yoshimizu, S., Horiuchi, Y., Ishiyama, A., ... & Tada, T. (2019). Diagnostic outcomes of esophageal cancer by artificial intelligence using convolutional neural networks. *Gastrointestinal endoscopy*, 89(1), 25-32.
- Hu, F., Shi, L., & Min, W. (2019). Biological imaging of chemical bonds by stimulated Raman scattering microscopy. *Nature methods*, 16(9), 830-842.
- Huang, C. R., Sheu, B. S., Chung, P. C., & Yang, H. B. (2004). Computerized diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and associated gastric inflammation from endoscopic images by refined feature selection using a neural network. *Endoscopy*, 36(07), 601-608.
- Itoh, T., Kawahira, H., Nakashima, H., & Yata, N. (2018). Deep learning analyzes *Helicobacter pylori* infection by upper gastrointestinal endoscopy images. *Endoscopy international open*, 6(02), E139-E144.
- Ji, M., Orringer, D. A., Freudiger, C. W., Ramkissoon, S., Liu, X., Lau, D., ... & Xie, X. S. (2013). Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy. *Science translational medicine*, 5(201), 201ra119-201ra119.
- Kanesaka, T., Lee, T. C., Uedo, N., Lin, K. P., Chen, H. Z., Lee, J. Y., ... & Chang, H. T. (2018). Computer-aided diagnosis for identifying and delineating early gastric cancers in magnifying narrow-band imaging. *Gastrointestinal endoscopy*, 87(5), 1339-1344.
- Kukura, P., Yoon, S., & Mathies, R. A. (2006). Femtosecond stimulated Raman spectroscopy.
- Lovász, B. D., Finta, Á., Zsobrák, K., Szalai, M., Bajor, J., Gyökeres, T., & Madácsy, L. (2020). Mesterséges intelligencia alkalmazásának lehetőségei a gasztroenterológiában és az endoszkópiában: Összefoglaló közlemény és saját eredményeink bemutatása= Use of artificial intelligence in gastroenterology and endoscopy: Review and our first clinical experiences. *GASZTROENTEROLÓGIAI ÉS HEPATOLÓGIAI SZEMLE*=

- Maeda, Y., Kudo, S. E., Mori, Y., Misawa, M., Ogata, N., Sasanuma, S., ... & Ohtsuka, K. (2019). Fully automated diagnostic system with artificial intelligence using endocytoscopy to identify the presence of histologic inflammation associated with ulcerative colitis (with video). *Gastrointestinal endoscopy*, 89(2), 408-415.
- Maeda, Y., Kudo, T., Hayashi, T., Wakamura, K., Miyachi, H., Katagiri, A., ... & Mori, K. (2016). Characterization of colorectal lesions using a computer-aided diagnostic system for narrow-band imaging endocytoscopy. *Gastroenterology*, 1, 2.
- Misawa, M., Kudo, S. E., Mori, Y., Cho, T., Kataoka, S., Yamauchi, A., ... & Mori, K. (2018). Artificial intelligence-assisted polyp detection for colonoscopy: initial experience. *Gastroenterology*, 154(8), 2027-2029.
- Miyaki, R., Yoshida, S., Tanaka, S., Kominami, Y., Sanomura, Y., Matsuo, T., ... & Chayama, K. (2015). A computer system to be used with laser-based endoscopy for quantitative diagnosis of early gastric cancer. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 49(2), 108-115.
- Mori, Y., Kudo, S. E., Chiu, P. W. Y., Singh, R., Misawa, M., Wakamura, K., ... & Mori, K. (2016). Impact of an automated system for endocytoscopic diagnosis of small colorectal lesions: an international web-based study. *Endoscopy*, 48(12), 1110-1118.
- Mori, Y., Kudo, S. E., Misawa, M., Saito, Y., Ikematsu, H., Hotta, K., ... & Mori, K. (2018). Real-time use of artificial intelligence in identification of diminutive polyps during colonoscopy: a prospective study. *Annals of internal medicine*, 169(6), 357-366.
- Orringer, D. A., Pandian, B., Niknafs, Y. S., Hollon, T. C., Boyle, J., Lewis, S., ... & Camelo-Piragua, S. (2017). Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy. *Nature biomedical engineering*, 1(2), 1-13.
- Sarwinda, D., Paradisa, R. H., Bustamam, A., & Anggia, P. (2021). Deep learning in image classification using residual network (ResNet) variants for detection of colorectal cancer. *Procedia Computer Science*, 179, 423-431.

- Shichijo, S., Nomura, S., Aoyama, K., Nishikawa, Y., Miura, M., Shinagawa, T., ... & Tada, T. (2017). Application of convolutional neural networks in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection based on endoscopic images. *EBioMedicine*, 25, 106-111.
- Swager, A. F., van der Sommen, F., Klomp, S. R., Zinger, S., Meijer, S. L., Schoon, E. J., ... & Curvers, W. L. (2017). Computer-aided detection of early Barrett's neoplasia using volumetric laser endomicroscopy. *Gastrointestinal endoscopy*, 86(5), 839-846.
- van der Sommen, F., Zinger, S., Curvers, W. L., Bisschops, R., Pech, O., Weusten, B. L., ... & Schoon, E. J. (2016). Computer-aided detection of early neoplastic lesions in Barrett's esophagus. *Endoscopy*, 48(07), 617-624.
- Vasu, K. (2022). Effective Classification of Colon Cancer using Resnet-18 in Comparison with Squeezenet. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 1413-1421
- Wong, A. N. N., He, Z., Leung, K. L., To, C. C. K., Wong, C. Y., Wong, S. C. C., ... & Yeung, M. H. Y. (2022). Current Developments of Artificial Intelligence in Digital Pathology and Its Future Clinical Applications in Gastrointestinal Cancers. *Cancers*, 14(15), 3780.
- Yoon, H. J., Kim, S., Kim, J. H., Keum, J. S., Jo, J., Cha, J. H., ... & Park, H. (2018). Sa1235 application of artificial intelligence for prediction of invasion depth in early gastric cancer: preliminary study. *Gastrointestinal Endoscopy*, 87(6), AB176.
- Zeng, Y., Yarbrough, J. M., Mittal, A., Tucker, M. P., Vinzant, T. B., Decker, S. R., & Himmel, M. E. (2016). In situ label-free imaging of hemicellulose in plant cell walls using stimulated Raman scattering microscopy. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 1-16.
- Zsuzsa, S., & Péter, N. (2007). Modern vizsgáló módszerek a patológiai diagnosztikában. *Magyar Tudomány*, 8, 979.