

Κεφάλαιο 2

Επιστημονική Στάθμιση Ανάλυσης Ιστοπαθολογικών Εικόνων

Σύνοψη

Αυτό το κεφάλαιο παρέχει μια ανασκόπηση των βιβλιογραφικών εργασιών που δημοσιεύτηκαν τα τελευταία χρόνια σχετικά με την ποσοτική μέτρηση της μη-αλκοολικής λιπώδους ηπατικής νόσου καθώς και μικροσκοπικών ευρημάτων που υποδηλώνουν τη χρόνια εξέλιξη της σε μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Έπειτα, παρουσιάζονται πειραματικές μελέτες που επικεντρώνονται στην ανάλυση της μη-αλκοολικής λιπώδους παγκρεατικής νόσου, αλλά και που περιορίζονται στην ημι-ποσοτική αξιολόγηση των ιστολογικών δειγμάτων. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση εστιάζει στην συνέχεια στην έρευνα που έχει γίνει για την αυτοματοποιημένη διάγνωση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος σε εικόνες βιοψίας, συμπεριλαμβανομένου του πιο συνηθισμένου τύπου του, του διαγοκυτταρικού νεφρικού καρκινώματος. Στην επόμενη ενότητα, περιγράφονται τα σύνολα δεδομένων που λειτούργησαν ως βάση για την εκπόνηση της διδακτορικής έρευνας, μαζί με το ιατρικό υπόβαθρο που αφορά τις εξεταζόμενες παθολογικές ανατομικές δομές.

2.1 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση Μεθοδολογιών Ανάλυσης Εικόνων Ιστοπαθολογίας

2.1.1 Μεθοδολογίες ανάλυσης της μη-αλκοολικής λιπώδους ηπατικής νόσου

Λόγω των περιορισμών της μεταβλητότητας μεταξύ του ενός παρατηρητή (intra-observer) και των πολλών παρατηρητών-ιατρών (inter-observer) στον ποσοτικό προσδιορισμό της μη-αλκοολικής λιπώδους ηπατικής νόσου (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD), η ερευνητική κοινότητα έχει αποδεχθεί τα τελευταία χρόνια την πρόκληση της ανάπτυξης αυτοματοποιημένων και αξιόπιστων λογισμικών για την ακριβή εκτίμηση του επιπολασμού της. Τα αναπτυσσόμενα εργαλεία χρησιμοποιούν τόσο παραδοσιακές όσο και σύγχρονες τεχνικές που βασίζονται στην ψηφιακή επεξεργασία εικόνων βιοψίας.

Οι Zaitoun et al. [15] ήταν από τους πρώτους που εφάρμοσαν στερεολογικές και μορφομετρικές μεθόδους για την ποσοτική αξιολόγηση της μικροφυσαλιδώδους και μακροφυσαλιδώδους στεάτωσης και επιπλέον της ιστολογικής ίνωσης. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε 118 δείγματα βιοψίας ήπατος, 86 από τα οποία είχαν ηπατίτιδα C (hepatitis virus C - HVC) και 32 αλκοολική ηπατική νόσο (alcoholic liver disease - ALD). Όσον αφορά τις στερεολογικές μεταβολές, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην στερεολογία της ίνωσης μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών ($p = 0.008$), ενώ η στερεολογία της στεάτωσης ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με ALD από ό,τι σε αυτούς με HVC ($p = 0.0002$). Τέλος, η αναλογία της μικροφυσαλιδώδους ήταν υψηλότερη στην HVC από ότι στην ALD ($p = 0.0003$), ενώ η αναλογία της μακροφυσαλιδώδους στεάτωσης ήταν υψηλότερη στην ALD από ότι στην HVC ($p = 0.0003$).

Στη μελέτη των Marsman et al. [16] διευρύνθηκαν οι ποσοτικές αποκλίσεις μεταξύ της αξιολόγησης της ηπατικής στεάτωσης από έναν παθολόγο και της αυτοματοποιημένης μέτρησης από ένα σύστημα ανάλυσης εικόνων. Για τα πειράματα, συλλέχθηκαν δείγματα βιοψίας αρουραίων και 49 δείγματα βιοψίας από αποθανόντες δότες. Η μέση εκτιμώμενη περιεκτικότητα σε λίπος των ανθρώπινων δειγμάτων ήταν 1.4 φορές μεγαλύτερη από αυτή που ελήφθη από το αυτοματοποιημένο λογισμικό. Στα δείγματα αρουραίων η μέση εκτίμηση του παθολόγου ήταν περίπου 2.0 φορές υψηλότερη από αυτή του αυτοματοποιημένου λογισμικού, το οποίο έδειξε υψηλή συσχέτιση Pearson ($r = 0.971$).

Οι Roullier et al. [17] εφάρμοσαν τον ασαφή αλγόριθμο Fuzzy c-Means για την ανίχνευση λιποκυττάρων που χαρακτηρίζονται από ομοιογενή υφή λόγω υψηλών τιμών έντασης εικονοστοιχείων και στρογγυλού σχήματος, καθώς και για τον αποκλεισμό ιστολογικών

τεχνουργημάτων από τις ποσοτικοποιήσεις στεάτωσης. Στις δοκιμές υποβλήθηκαν 37 εικόνες βιοψίας με δυνατότητα μεγέθυνσης $400\times$ και τα ευρήματα έδειξαν καλή συσχέτιση με την οπτική αξιολόγηση ενός παθολόγου ($r^2 = 0.85$, $p < 0.05$).

Οι El-Badry et al. [18] επικεντρώθηκαν στη συσχέτιση μεταξύ της υπολογιστικής μέτρησης της στεάτωσης και των οπτικών ερμηνειών από τέσσερις παθολόγους σε 46 δείγματα βιοψίας από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εκτομή. Τα μεθοδολογικά βήματα περιλάμβαναν ψηφιοποιημένες εικόνες σε μεγέθυνση $40\times$ και αποσκοπούσαν στην αποκάλυψη λευκών λιποκυττάρων σε ξεχωριστά κανάλια του χρωματικού χώρου RGB. Οι αξιολογήσεις λογισμικού συσχετίστηκαν σημαντικά με αυτές του ενός από τους κλινικούς, με συντελεστή Spearman ($r_s = 0.82$), ενώ με τους άλλους τρεις υπήρξε χαμηλή συσχέτιση ($r_s = 0.22$, 0.28 , 0.38). Οι διακυμάνσεις, σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα, οφείλονται στα χαμηλότερα ποσοστά περιεκτικότητας σε λίπος από αυτά των παθολόγων, ως αποτέλεσμα εκτενούς ανάλυσης και εξάλειψης των ψευδώς θετικών δομών στεάτωσης.

Ο στόχος της μελέτης των Liquori et al. [19] ήταν η αυτοματοποιημένη βαθμολόγηση της συσσώρευσης λίπους σε δείγματα βιοψίας από παχύσαρκους ασθενείς και αρουραίους χρησιμοποιώντας διάφορες ιστολογικές χρώσεις, όπως του υπερωδικού οξέος Schiff (Periodic Acid-Schiff - PAS) και της μπλε τολουιδίνης (Toluidine Blue - TB), ψηφιοποιημένα με δυνατότητα μεγέθυνσης $400\times$. Οι κύριες τεχνικές για τον εντοπισμό δομών στεάτωσης και την εξάλειψη μη-κυκλικών τεχνουργημάτων βασίστηκαν στην ομοιομορφία χρώματος και το κυκλικό σχήμα των φυσαλίδων λίπους με τη εφαρμογή μορφολογικών τελεστών. Στα αποτελέσματα δεν βρέθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις στους υπολογισμούς της συνολικής λιπώδους περιοχής μεταξύ των εικόνων διαφόρων χρώσεων.

Οι Turlin et al. [20] εξέτασαν τη συσχέτιση μεταξύ του πλήθους των λιπιδίων και του μεγέθους τους με παράγοντες όπως η αναλογία στεάτωσης και ο δείκτης μάζας σώματος (body mass index - BMS) εξετάζοντας 108 δείγματα βιοψίας σε μεγέθυνση $10\times$. Ακολουθώντας πρώτα διαφορετικές τεχνικές βελτίωσης εικόνας, όπως η μείωση θορύβου και η βελτιστοποίηση αντίθεσης, οι φυσαλίδες λίπους αναγνωρίστηκαν μετά σύμφωνα με κριτήρια που σχετίζονται με τον αριθμό εικονοστοιχείων, το λευκό χρώμα και το κυκλικό σχήμα. Αυτά είχαν ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό μεγάλων ινωδών περιοχών και ιστολογικών τεχνουργημάτων, όπως τα κολποειδή, τα χολαγγεία και τα αιμοφόρα αγγεία. Τα ευρήματα αποκάλυψαν μια μέτρια συσχέτιση Spearman μεταξύ του μεγέθους των λιπιδίων και του δείκτη μάζας σώματος ($r_s = 0.35$, $p = 0.0003$) και μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των ανιχνευόμενων λιπιδίων και του εκτιμώμενου ποσοστού στεάτωσης ($r_s = 0.93$, $p < 0.01$).

Στη μελέτη των Kong et al. [21] παρουσιάστηκε μια μεθοδολογία για την ποσόστωση της στεάτωσης και στη συνέχεια η απόδοσή της συγκρίθηκε με άλλες μεθόδους μέτρησης, συμπεριλαμβανομένης της μικροσκοπικής ανθρώπινης βαθμολόγησης και της ραδιολογίας.

Για τις δοκιμές διατέθηκαν 10 δείγματα και τμήματα από το καθένα ψηφιοποιήθηκαν με μεγέθυνση 200×. Μετά τη δυαδοποίηση εικόνων της γκριζας κλίμακας μέσω κατωφλίωσης, πραγματοποιήθηκε κατάτμηση των ασθενικών δομών ενδιαφέροντος με μια παραλλαγή των ελλειπτικών καμπύλων και με εφαρμογή του μετασχηματισμού λεκάνης απορροής (watershed transform). Διαπιστώθηκε ότι υπήρχε ισχυρότερη συσχέτιση μεταξύ της ιστολογικής ανίχνευσης και των ανθρώπινων αξιολογήσεων ($r = 0.9243$, $p = 0.0001$) παρά μεταξύ της ανθρώπινης ανάλυσης και των δεδομένων ραδιολογίας ($r = 0.8353$).

Στη δημοσιευμένη μελέτη της Batool [22] χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι μορφολογικοί παράγοντες, συγκεκριμένα η στερεότητα, η εκκεντρότητα και το μέγεθος, προκειμένου να αποκλειστούν τυχόν ανιχνευμένα παθολογικά ή υγιή ευρήματα που δεν χαρακτηρίζαν τις φυσαλίδες λίπους. Επομένως, ο λόγος στεάτωσης θα μπορούσε έπειτα να μετρηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια σε ένα σύνολο 38 εικόνων βιοψίας ήπατος με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (hematoxylin and eosin - H&E). Επίσης, εφαρμόστηκε και μια δυαδική μέθοδος λεξικού για την περαιτέρω μείωση των ψευδώς θετικών ευρημάτων και για την ανάκτηση περιοχών διήθησης λίπους που δεν είχαν συμπεριληφθεί προηγουμένως. Τα τελικά αποτελέσματα αποκάλυψαν μια καλή συσχέτιση Pearson ($r_p = 0.9066$) μεταξύ των ποσοτικών ελέγχων του λογισμικού και των ποσοστών στεάτωσης που δόθηκαν από δύο ειδικούς ιατρούς.

Στη μελέτη των Schwen et al. [23] αναπτύχθηκε μια μέθοδος για τη ποσοτικοποίηση της μακροφυσαλιδώδους στεάτωσης σε 2037 βιοψίες ήπατος ποντικού οι οποίες χρωματίστηκαν με διάφορες βαφές (H&E, Elastica van Gieson - EvG, HE/EvG, GS, κ.α.) και ψηφιοποιήθηκαν σε μεγέθυνση 400×. Πρώτον, οι ιστολογικές τομές διαχωρίστηκαν από το φόντο τους ορίζοντας μια τιμή κατωφλίου στις τιμές φωτεινότητας και κορεσμού των εικονοστοιχείων, ενώ οι λοβιακές ζώνες ορίστηκαν με πλυμμηρισμό των υπολογιζόμενων κοιλάδων μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού λεκάνης απορροής. Η κατάτμηση των κενотоπίων λίπους έγινε επίσης με βάση τις τιμές των εικονοστοιχείων, ενώ το σχήμα τους χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση των αληθώς θετικών από τα τεχνουργήματα. Συμπερασματικά, η χρώση H&E επέτρεψε την βέλτιστη κατάτμηση των αντικειμένων λίπους και βάσει οπτικών ελέγχων από ειδικό, η ακρίβεια της ποσοτικής μεθόδου ορίστηκε στο 92%.

Οι Hall et al. [24] ερεύνησαν τις συσχετίσεις μεταξύ του ηπατικού λίπους, των αιμοτρανσφερασών και της ηπατικής αρχιτεκτονικής μέσω τεχνικών επεξεργασίας εικόνας σε στεατωτικά μικροσκοπικά δείγματα με αντικειμενική (objective) μεγέθυνση 20×. Αρχικά, οι ινώδεις περιοχές και τα ιστολογικά τεχνουργήματα εξαιρέθηκαν από τις μετρήσεις της αναλογικής περιοχής λίπους (measurement of the fat proportionate area - mFPA) ως συνέπεια της δυαδικής μετατροπής των κόκκινων, πράσινων και μπλε καναλιών του χρωματικού χώρου RGB σε συνδυασμό με τον μορφολογικό τελεστή διαστολής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν η περιεκτικότητα σε λίπος ήταν αυξημένη, αυξήθηκαν επίσης τα επίπεδα της

αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (alanine aminotransferase - ALT) και της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (aspartate aminotransferase - AST). Επιπλέον, ισχυρίστηκαν ότι η αυξημένη ALT ήταν εμφανής τόσο στο 5% όσο και στο 20% της mFPA και ότι σε περιπτώσεις με προχωρημένη αναλογία λίπους (mFPA = 10%), παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην ηπατική αρχιτεκτονική και στην ακτίνα των λοβών.

Η μεθοδολογική προσέγγιση των Tsiplakidou et al. [25] περιλάμβανε μια σειρά βημάτων επεξεργασίας εικόνας για την ανίχνευση αληθώς θετικών δομών λίπους. Οι δοκιμές αφορούσαν 40 δείγματα βιοψίας από ασθενείς με ηπατίτιδα C που ελήφθησαν σε χαμηλή 2× μεγέθυνση. Μετά από ένα στάδιο βελτίωσης εικόνας, συμπεριλήφθηκαν μόνο υποψήφιος περιοχές στεάτωσης που πληρούσαν τα κριτήρια εμβαδού, εκκεντρότητας και στρογγυλότητας. Χρησιμοποιώντας τον συντελεστή συσχέτισης συμφωνίας (concordance correlation coefficient - CCC), τα υπολογιζόμενα ποσοστά επικράτησης λίπους της αυτοματοποιημένης μεθόδου συγκρίθηκαν με αυτά των παθοανατόμων. Η βαθμολογία CCC = 0.87 [-1, 1] έδειξε ένα καλό επίπεδο συμφωνίας μεταξύ των δύο πλευρών.

Οι Roy et al. [26] πρότειναν μια νέα μέθοδο για την κατάτμηση λίπους σε αποκομμένα ιστολογικά τμήματα από 11 εικόνες βιοψίας υψηλής ανάλυσης. Με την εφαρμογή τεχνικών βελτίωσης εικόνας και μορφολογικής επεξεργασίας, επιτεύχθηκε εξομάλυνση των εξωτερικών ορίων των κυτταρικών δομών στεάτωσης, καθώς και αφαίρεση μικρών ανεπιθύμητων τεχνουργημάτων. Στη συνέχεια, περιεγράφηκε μια εξειδικευμένη τεχνική για τον προσδιορισμό των σημείων καμπυλότητας με σκοπό να διαχωριστούν τα επικαλυπτόμενα σταγονίδια λίπους. Επιπρόσθετα, διεξήχθη ένα βήμα ταξινόμησης για την περαιτέρω διαφοροποίηση μεμονωμένων και επικαλυπτόμενων περιοχών στεάτωσης, με ποσοστά επιτυχίας στις περισσότερες περιπτώσεις ίσα με 100%.

Οι Segovia-Miranda et al. [27] εφάρμοσαν μια τεχνική τρισδιάστατης απεικόνισης για την ανάπτυξη χωρικά-επιλυμένων γεωμετρικών και λειτουργικών μοντέλων και τον εντοπισμό μορφολογικών αλλαγών που σχετίζονται με την εξέλιξη της NAFLD. Συγκεκριμένα, το μέγεθος της κατανομής των σταγονιδίων λίπους και η ομοιογένεια της πυρηνικής τους υψής αξιολογήθηκαν ως ιστολογικοί βιοδείκτες για τη διαφοροποίηση μεταξύ των σταδίων της NAFLD. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο υψηλότερος συντελεστής συσχέτισης Pearson ήταν 0.680 για τη γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (gamma-glutamyl transpeptidase), ακολουθούμενος από 0.518 για το πρωτογενές ολικό χολικό οξύ, 0.505 για το ολικό χολικό οξύ και 0.473 για την αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase).

Οι Esparza et al. [28] βασίστηκαν στην αυτοματοποίηση της κατάτμησης των λιποκυττάρων για να προσδιοριστεί η συσχέτισή τους με τον βαθμό στεάτωσης και την οπτική εκτίμηση ενός παθολόγου. Η τρέχουσα έρευνα εφαρμόστηκε σε 68 εικόνες βιοψίας ασθενών με μεταμόσχευση ήπατος που χρωματίστηκαν με H&E και Masson's trichome και ψηφιοποιήθηκαν σε μεγέθυνση 20×. Με τον καθορισμό μιας τιμής κατωφλίου επιτεύχθηκε ο εντοπισμός

των ιστολογικών τμημάτων, ενώ η μετατροπή τους σε κλίμακα του γκρι, η ενίσχυση της υφής τους με το φίλτρο Frangi και η δυαδικοποίησή τους οδήγησαν στην αποκάλυψη των αντικειμένων ενδιαφέροντος. Με την εκ νέου εφαρμογή ορίου κατωφλίου στα σχηματικά χαρακτηριστικά αυτών των αντικειμένων, ακολουθούμενη από τον μετασχηματισμό λεκάνης απορροής σε συνδυασμό με μορφολογικούς τελεστές, επιτεύχθηκε η εξάλειψη μικρών και μη-κυκλικών δομών και ο διαχωρισμός επικαλυπτόμενων λιποκυττάρων. Ως τελικό βήμα, για κάθε κατατμημένη λιπώδη δομή υπολογίστηκαν η ακτίνα, η κυκλικότητα, η απόσταση με τον πλησιέστερο της γείτονα, η μεταξύ τους περιφερειακή ιστροπία (ομοιομορφία-ετερογένεια) και ο λόγος των λιποκυττάρων προς τα συνολικά ηπατοκύτταρα. Κλείνοντας, η ανάλυση παλινδρόμησης και ο συντελεστής Spearman παρήγαγαν υψηλές τιμές συσχέτισης για την ακτίνα ($R^2 = 0.86$, $r = 0.72$), την απόσταση πλησιέστερου γείτονα ($R^2 = 0.82$, $r = -0.82$), την περιφερειακή ιστροπία ($R^2 = 0.84$, $r = 0.74$) και την αναλογία λιποκυττάρων ($R^2 = 0.90$, $r = 0.85$), ενώ χαμηλές τιμές για την κυκλικότητα ($R^2 = 0.48$, $r = -0.32$) με τους βαθμούς στεάτωσης και της εξέτασης του παθολόγου, αντίστοιχα.

Στους Xu et al. [29] αναπτύχθηκε μια αυτοματοποιημένη μέθοδος για τον προσδιορισμό των ρυθμών διήθησης λίπους σε εικόνες βιοψίας και τη σύγκριση με ημι-ποσοτικές βαθμολογίες τριών παθολογοανατόμων. Με την προσάρτηση ενός smartphone στη βάση του προσοφθάλμιου μικροσκοπίου φωτός, ελήφθησαν 80 εικόνες H&E σε μεγεθύνσεις 10×, 20× και 40× από δείγματα ασθενών με μεταμόσχευση ήπατος. Πρώτον, για την ανίχνευση των αντικείμενων μακροστεάτωσης, εφαρμόστηκε η κατωφλίωση ιστογράμματος για τη μετατροπή των εικόνων RGB σε δυαδικές. Συνεχίζοντας, χρησιμοποιώντας τους μορφολογικούς τελεστές, τον μετασχηματισμό λεκάνης απορροής και ορίων κατωφλίου στις τιμές κυκλικότητας και μεγέθους των δυαδικών αντικειμένων, οι δομές στεάτωσης διακρίθηκαν από τα ιστολογικά τεχνουργήματα. Συμπερασματικά, υπήρχε μόνο μέτρια συμφωνία μεταξύ του ψηφιακού εργαλείου και των ιατρών όταν ελήφθη υπόψη μόνο ο αριθμός των σωστά προσδιορισμένων στοιχείων μακροστεάτωσης στα δείγματα, με συντελεστή συσχέτισης μεταξύ των κατηγοριών (interclass correlation coefficient - ICC) 0.65 (95% CI, 0.29-0.89). Ωστόσο, όταν διερευνήθηκαν πρόσθετοι παράγοντες όπως η έκταση και η κατανομή του ιστολογικού δείγματος για τον υπολογισμό του λόγου στεάτωσης, υπήρχε καλύτερη συμφωνία (ICC 0.72, 95% CI, 0.40-0.91).

Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες της ηπατικής νόσου, η ηπατική απόφραξη που αναφέρεται σε μπλοκάρισμα των χοληφόρων αγωγών, των χολποειδών, των πυλαίων φλεβών κ.λπ. μπορεί να οδηγήσει σε μη-αναστρέψιμες επιπλοκές στο όργανο. Εξαιτίας αυτών, οι ερευνητές έχουν εμβαθύνει στην ανάπτυξη διαγνωστικών συστημάτων βασισμένων σε μη-εποπτευόμενες τεχνικές μηχανικής μάθησης και αλγόριθμους ταξινόμησης για την ακριβή διάκριση του λιπώδους ιστού από άλλες ιστολογικές δομές και την εξάλειψη των ψευδώς θετικών παθολογικών ευρημάτων.

Στους Nativ et al. [30] προτάθηκε μια μέθοδο ανάλυσης εικόνας που θα μπορούσε να διακρίνει τις κύριες διαφορές μεταξύ της μικροφυσαλιδώδους στεάτωσης μικρών σταγονιδίων και της μακροφυσαλιδώδους στεάτωσης μεγάλων σταγονιδίων. Για την κατάτμηση των δύο αντικειμένων ενδιαφέροντος, η προσέγγιση έκανε εφαρμογή των μοντέλων ενεργού περιγράμματος και του αλγόριθμου ομαδοποίησης (clustering) K-means. Στο τέλος, κλήθηκε επίσης ένας ταξινομητής δέντρου απόφασης για την ενίσχυση του διαχωρισμού των δύο ομάδων. Μετά τη φάση ταξινόμησης, οι τιμές ειδικότητας (specificity) και ευαισθησίας (sensitivity) ήταν 93.7% και 99.3%, αντίστοιχα και ο συντελεστής προσδιορισμού γραμμικής παλινδρόμησης, ως η μέθοδος συσχέτισης με τις ημι-ποσοτικές εκτιμήσεις παθολόγων, ήταν ίσος με 0.97.

Οι Sumitpaibul et al. [31] παρουσίασαν μια μεθοδολογία για τον ακριβή υπολογισμό της αναλογίας λίπους σε ιστολογικές τομές από 16 ΩΣΙς της 400× μεγέθυνσης. Κλασικές τεχνικές επεξεργασίας εικόνας, όπως μετατροπή χρωματικού χώρου σε κλίμακα του γκρι, μείωση θορύβου με φιλτράρισμα μέσης τιμής, διαχωρισμός φόντου και μορφολογική επεξεργασία δυαδικών αντικειμένων εφαρμόστηκαν για τη κατάτμηση των υποψήφιων δομών στεάτωσης. Στο επόμενο βήμα, ο ταξινομητής k-πλησιέστερων γειτόνων (k-NN) κλήθηκε να προσδιορίσει τις κηλίδες λίπους που θα παρείχαν μια ακριβή μέτρηση του λόγου στεάτωσης στις ηπατικές εικόνες. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ακρίβεια (accuracy) ταξινόμησης λιπιδίων αντικειμένων 97.52% και μέση διαφορά 0.22 μονάδων μεταξύ της αναλογίας λίπους που υπολογίστηκε με την αυτοματοποιημένη μέθοδο και της βασικής αλήθειας από χειροκίνητες επισημειώσεις ειδικών.

Οι Homeyer et al. [32] στόχευσαν στην ακριβή διάκριση μεταξύ μεμονωμένων ή επικαλυπτόμενων σταγονιδίων λίπους και υγιών τμημάτων (αγγεία, ρωγμές) σε 32 εικόνες από στεατωτικά δείγματα αρουραίων. Ο αλγόριθμος Τυχαίου Δάσους (Random Forest) χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των μικροσκοπικών αντικειμένων με βάση τα εξαγόμενα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με στατιστικά στοιχεία γειτνίασης, το μέγεθος και την εκκεντρότητα. Η μέθοδος παρήγαγε ακρίβεια ταξινόμησης 92% για τα αντικείμενα λίπους, με τα χαρακτηριστικά γειτνίασης να βελτιώνουν σημαντικά την τιμή της κατά 17%.

Οι Sciarabba et al. [33] πρότειναν ένα εργαλείο για την παρακολούθηση της ηπατικής στεάτωσης σε 15 ιστολογικές εικόνες μεγέθυνσης 20×. Η κατάτμηση των αντικειμένων έγινε μέσω της κατωφλίωσης δύο επιπέδων ύστερα από ομαδοποίηση, λαμβάνοντας υπόψη διάφορες χρωματικές και σχηματικές ιδιότητες (στερεότητα, επιμήκυνση και τραχύτητα). Τα αποτελέσματα κατάτμησης έπειτα βελτιστοποιήθηκαν μέσω των μορφολογικών τελεστών ανοίγματος και κλεισίματος προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των φυσαλίδων λίπους από μη-ασθενικά ευρήματα. Το λογισμικό πέτυχε ένα καλό ποσοστό ανίχνευσης 91.01%, ως

ο αριθμός των λιπιδίων στεάτωσης που ανιχνεύθηκαν επιτυχώς σε σχέση με τον αντίστοιχο της χειροκίνητης καταμέτρησης ενός παθολόγου. Παράλληλα, εντοπίστηκε μια ψευδώς θετική αναλογία λίπους της τάξης του 4.49% σε σχέση με την εκτίμηση του ιατρού.

Οι Shi et al. [34] παρείχαν μια μέθοδο για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας ηπατικού λίπους σε μικροσκοπικά δείγματα ποντικών με χρώση H&E και συντελεστή μεγέθυνσης 400×. Για να διαχωριστούν οι υποψήφιες φυσαλίδες λίπους από το φόντο τους, αρχικά υπολογίστηκε ένα προσαρμοστικό καθολικό όριο κατωφλίου σύμφωνα με τη διάμεσο (median) των ιστογραμμάτων εικόνας. Πριν από τη χρήση αλγόριθμων ομαδοποίησης για τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων από το κυτταρόπλασμα και τους πυρήνες, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές βελτίωσης εικόνας, όπως μείωση θορύβου και ενίσχυση αντίθεσης μεταξύ των εικονοστοιχείων ιστού και λιποκυττάρων. Ο υπολογισμός του διανύσματος χαρακτηριστικών για την προσέγγιση ομαδοποίησης αντικειμένων ενδιαφέροντος έλαβε υπόψη μια ποικιλία μορφολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων της εκκεντρότητας, της στερεότητας και του εμβαδού, επιπλέον των τιμών έντασης εικονοστοιχείων στα κανάλια L και b του χρωματικού χώρου Lab. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι ο αριθμός των ανιχνευόμενων σταγονιδίων λίπους και οι υπολογιζόμενες μέσες τιμές στεάτωσης ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες χειροκίνητων επισημειώσεων. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το υπολογιζόμενο όριο κατωφλίου είχε ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό ορισμένων αντικειμένων λίπους με χαμηλότερη από τη διάμεση ένταση στα εικονοστοιχεία τους. Παρόλα αυτά, τα εξαγόμενα ποσοστά σφάλματος ήταν μικρότερα από 5%, που είναι επαρκή για την υιοθέτηση του αυτοματοποιημένου εργαλείου στην κλινική πρακτική.

Οι Munsterman et al. [35] ανέπτυξαν ένα λογισμικό για την αυτόματη μέτρηση της αναλογικής περιοχής στεάτωσης (steatosis proportionate area - SPA) σε ολόκληρες εικόνες διαφανειών (whole slide images - WSIs) ήπατος, όπου μπορεί να ενσωματωθεί ως Java πρόσθετο (plug-in) στο εργαλείο Fiji. Για να διακριθούν πιθανά στεατωτικά ηπατοκύτταρα από τον περιβάλλοντα ιστό, καθορίστηκε ένα όριο κατωφλίου στο κανάλι κορεσμού του χρωματικού χώρου HSB σε ιστολογικά δείγματα χρωματισμένα με H&E. Για να επιτευχθεί ένας λεπτομερής διαχωρισμός των δομών λίπους από άλλα μικροσκοπικά αντικείμενα των WSIs, ο αλγόριθμος Λογιστικής Παλινδρόμησης (Logistic Regression - LR) εκπαιδεύτηκε και αξιολογήθηκε σε τιμές χαρακτηριστικών της κυκλικότητας, της στρογγυλότητας και της στερεότητας από αντικείμενα χειροκίνητης επισημείωσης. Στο τέλος των δοκιμών, η ακρίβεια ταξινόμησης του αλγορίθμου LR ήταν 91.9% και η AUC της σωστά ταξινομημένης στεάτωσης ήταν 0.970. Επίσης, η SPA των WSIs συσχετίστηκε σημαντικά με τα καταγεγραμμένα ποσοστά στεάτωσης ενός ηπατολόγου ($R_s = 0.845$, CI: 0.749-0.902, $P < 0.001$).

Οι Arista Romeu et al. [36] δημιούργησαν ένα μεθοδολογικό πλαίσιο για τη δυαδική ταξινόμηση περιπτώσεων NAFLD και μη-NAFLD σε εικόνες βιοψίας ήπατος ποντικών με χρώση

H&E και Oil-Red O. Πιο εμφατικά, η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (principal component analysis - PCA) και τα μοντέλα τετραγωνικής (quadratic) και κανονικής (canonical) διακριτικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν για την αυτοματοποιημένη διάγνωση σε 2298 δεδομένα φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης (diffuse reflectance - DF) και ενδογενούς φθορισμού (fluorescence spectra - FS). Εν συνεχεία, εξετάστηκε η συσχέτιση μεταξύ των φασματικών μετρήσεων και της διατροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος που δόθηκε στους ζωικούς δότες, καθώς και με μορφομετρικές αναλύσεις των εικόνων μικροσκοπίας με το εργαλείο ImageJ. Οι αναπτυσσόμενοι ταξινομητές εκπαιδεύτηκαν και δοκιμάστηκαν με τη μέθοδο διασταυρούμενης επικύρωσης Leave-One-Out. Σημειώνεται ότι τα δυαδικά μοντέλα παρήγαγαν σφάλματα ταξινόμησης $\leq 1.3\%$, ενώ ο συνδυασμός μετρήσεων DF και FS μείωσε το διαγνωστικό σφάλματα σε $\leq 0.6\%$. Ομοίως, οι συντελεστές συσχέτισης Pearson με βάση τη μορφομετρική ανάλυση και τη διατροφή λίπους ήταν ≤ 0.8 .

Χάρη στην αποτελεσματικότητα των σύγχρονων διαγνωστικών συστημάτων, ο τομέας της ιστοπαθολογίας έχει επικεντρωθεί σε προβλήματα αναγνώρισης πολλαπλών και περιπλοκών ιστολογικών αλλοιώσεων, συμπεριλαμβανομένης της ηπατοκυτταρικής διόγκωσης (hepatorcellular ballooning) και της φλεγμονής, δύο χρόνιες παθήσεις για τις οποίες μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν αυτοματοποιημένες διαγνωστικές λύσεις.

Η μεθοδολογία των Vanderbeck et al. [37] βασίστηκε σε τεχνικές κατάτμησης και εποπτευόμενης ταξινόμησης για την επίλυση ενός προβλήματος αναγνώρισης πολλαπλών ιστολογικών κλάσεων σε 47 εικόνες μεγέθυνσης $20\times$ υγιών και NAFLD δοτών. Οι δομές μακροστεάτωσης, τα χοληφόρα αγγεία, οι πυλαίες φλέβες και τα χολποειδή αποτέλεσαν τις ανατομικές δομές ενδιαφέροντος, ενώ για τον διαχωρισμό τους χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Μηχανής Διανυσματικής Υποστήριξης (Support Vector Machine - SVM). Τα πειράματα παρήγαγαν τιμές πιστότητας (precision) και ανάκλησης-ευαισθησίας (recall-sensitivity) $\geq 82\%$ επιπλέον της συνολικής ακρίβειας ταξινόμησης 89% . Σύμφωνα με τον συντελεστή Spearman, το συνολικό ποσοστό στεάτωσης που υπολογίστηκε με την αυτοματοποιημένη προσέγγιση συσχετίστηκε με τον μέσο διαγνωστικό βαθμό δύο ιατρών κατά 90.8% . Ως συμπέρασμα, η εφαρμοσμένη μέθοδος κρίθηκε αξιόπιστη για την εκτίμηση του βαθμού NAFLD και είχε το πλεονέκτημα ότι λαμβάνει υπόψη επιπλέον ανατομικά χαρακτηριστικά σε εικόνες βιοψίας ήπατος.

Μια μεταγενέστερη μελέτη των Vanderbeck et al. [38] στόχευσε στην αυτοματοποιημένη αναγνώριση της λοβιακής φλεγμονής και της ηπατοκυτταρικής διόγκωσης. Παρομοίως με την προηγούμενη έρευνα [37], η ταξινόμηση των κατατμημένων δομών παρήγαγε τιμές πιστότητας και ανάκλησης 70% και 49% για περιπτώσεις φλεγμονής και 91% και 54% για διογκωμένα ηπατοκύτταρα, αντίστοιχα. Επιπλέον, κατά το στάδιο ταξινόμησης, ένα 95% εμβαδού περιοχής κάτω από την καμπύλη (area under the curve - AUC) παρατηρήθηκε για τη λοβιακή φλεγμονή και 98% για τη κυτταρική διόγκωση. Η συσχέτιση Spearman

για τα φλεγμονώδη αντικείμενα και τις διογκώσεις σε σχέση με την διάγνωση των ειδικών παθολόγων ήταν 45.2% για 46%, αντίστοιχα, ενθαρρυντικές αποδόσεις για επερχόμενες ποσοτικές αναλύσεις της μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (non-alcoholic steatohepatitis - NASH).

Στη μελέτη των Ishikawa et al. [39] παρουσιάστηκε μια μεθοδολογία ανάλυσης εικόνας για τον διαχωρισμό των ιστολογικών δοκίδων από τα σταγονίδια λίπους, τα κολποειδή και τα στρώματα σε βιοψίες ήπατος H&E ψηφιοποιημένες σε μεγέθυνση 20×. Η κατάτμηση των υποψήφιων λιπωδών σχηματισμών επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας μια ποικιλία τεχνικών επεξεργασίας εικόνας, συμπεριλαμβανομένης της εξομάλυνσης ακμών με φιλτράρισμα επιλεκτικού προσανατολισμού (orientation-selective), του δυαδικού μετασχηματισμού μέσω κατωφλίωσης και της εφαρμογής του αλγόριθμου προσδοκίας-μεγιστοποίησης (expectation-maximization). Μετά την εξαγωγή διανυσμάτων χαρακτηριστικών, ο ταξινομητής Random Forest κλήθηκε για να διαχωρίσει τις φυσαλίδες λίπους από τα υπόλοιπα ασθενικά και μη ευρήματα. Τα πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν την ικανότητα της μεθόδου να υπολογίζει την αναλογία της δοκιδωτής περιοχής, με βάση την πυρηνική της πυκνότητα προς το κυτταρόπλασμα, για τη σταδιοποίηση Edmondson του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (hepatocellular carcinoma - HCC).

Στους Giannakeas et al. [40] προτάθηκε μια αυτοματοποιημένη διαγνωστική μέθοδος βασισμένη στην ομαδοποίηση εικονοστοιχείων και το δυαδικό μορφολογικό φιλτράρισμα για την ποσοτική εκτίμηση της στεάτωσης σε 20 εικόνες βιοψίας ήπατος με μεγέθυνση 5×. Πιο συγκεκριμένα, η ένταση των εικονοστοιχείων από κάθε κανάλι RGB των έγχρωμων δειγμάτων σχημάτισε το διάνυσμα χαρακτηριστικών για τον K-means διαχωρισμό των εικονοστοιχείων του φόντου από τα αντίστοιχα του ιστού. Ένα περαιτέρω στάδιο περιλάμβανε μια επαναληπτική μορφολογική διαδικασία ανοίγματος για την ανίχνευση κυκλικών λιποκυττάρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το νέο εργαλείο παρουσίασε ~1% μέσο ποσοστό σφάλματος σε σχέση με τις ημι-ποσοτικές διαγνώσεις ηπατολόγων. Σε μια επέκταση της μεθοδολογίας [41], προκειμένου να αποκλειστεί η πλειονότητα των ψευδώς θετικών δομών στεάτωσης (διογκωμένα ηπατοκύτταρα, κολποειδή και φλέβες) από τις διαδικασίες μέτρησης διήθησης λίπους, συμπεριλήφθηκε ένα βήμα ταξινόμησης των αντικειμένων κατάτμησης σε ένα μεγαλύτερο σύνολο 27 εικόνων με μεγέθυνση 20×. Χάρη στην εποπτευόμενη προσέγγιση, επιτεύχθηκε μείωση του μέσου σφάλματος μέτρησης λίπους (1.95%) κατά μισή ποσοστιαία μονάδα σε σύγκριση με το στάδιο κατάτμησης (2.4%) άγνωστων ιστολογικών δομών.

Οι Sethunath et al. [42] προσπάθησαν να αναπτύξουν ένα εργαλείο για τον εντοπισμό δομών ηπατικής μικρο- και μακροστεάτωσης σε δείγματα ποντικών με χρώση H&E και 20× μεγέθυνση, αλλά και να αξιολογήσουν το επίπεδο συμφωνίας του με τους ημι-ποσοτικούς ελέγχους ενός ειδικού παθολόγου. Για να διαχωριστεί η ιστολογική περιοχή από το φόντο

της, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάπτυξης περιοχής (region growing), ενώ η προσέγγιση για την ανίχνευση λευκών αντικειμένων ενδιαφέροντος βασίστηκε αρχικά στο φίλτρο μέσης τιμής για τη μείωση του θορύβου και στην τεχνική διόρθωσης γάμμα (Gamma correction) για την αύξηση των αντιθέσεων εικόνας. Στη συνέχεια, οι πιθανές περιοχές λίπους διαχωρίστηκαν από τον ιστό τους χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο K-means και ένα όριο κατωφλίου στο πλήθος των λευκών εικονοστοιχείων. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα λιποκύτταρα και να αποκλειστούν διάφορες ιστολογικές αλλοιώσεις (λοβιακή φλεγμονή και πυλαία φλεγμονή) και ιστολογικά τεχνουργήματα από τους υπολογισμούς του λόγου στεάτωσης, ο ταξινομητής SVM εκπαιδεύτηκε λαμβάνοντας υπόψη χαρακτηριστικά υψής για κάθε κατατμημένη δομή εφαρμόζοντας φίλτρα Gabor με διάφορους προσανατολισμούς θ° . Κατά την πρόβλεψη των περιοχών μακροστεάτωσης με το εκπαιδευμένο μοντέλο, επιτεύχθηκε συνολική ακρίβεια ταξινόμησης 84.2%, η οποία απέδωσε επίσης τιμές πιστότητας, ανάκλησης και περιοχής κάτω από την καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (AUROC) 94.2%, 95% και 99.1%, αντίστοιχα. Όσον αφορά τις περιοχές μικροστεάτωσης, οι εξαγόμενες τιμές πιστότητας, ανάκλησης και AUROC ήταν 79.2%, 77%, 78.1%, αντίστοιχα και η ακρίβεια ίση με 78.7%. Τέλος, ο συντελεστής προσδιορισμού για τη συσχέτιση μεταξύ των αναλογιών μακροστεάτωσης που υπολογίστηκαν από το λογισμικό και τον παθολόγο ήταν $R^2 = 0.905$.

Οι Forlano et. al. [43] παρουσίασαν μια ολοκληρωμένη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές επεξεργασίας εικόνας και μηχανικής μάθησης για τον εντοπισμό πολλαπλών παθολογιών του ήπατος, όπως η στεάτωση, η κυτταρική διόγκωση, η ιστολογική φλεγμονή και η ίνωση. Για τις πειραματικές δοκιμές ελήφθησαν υπόψη 246 δείγματα βιοψίας ασθενών με NAFLD-NASH, μέρος των οποίων χρωματίστηκε με H&E (σάρωση σε μεγέθυνση $20\times$) και το υπόλοιπο με Sirius Red (σάρωση σε μεγέθυνση $2\times$). Οι μέθοδοι επεξεργασίας αναφέρονται στον αλγόριθμο ομαδοποίησης K-means, την κατωφλίωση εικόνας, τους μορφολογικούς τελεστές και τα διαγράμματα Voronoi για την κατάτμηση των περιοχών ενδιαφέροντος και τον διαχωρισμό υγιών ηπατοκυττάρων από τα αντίστοιχα διόγκωσης. Κατόπιν αυτού, τα υπολογιζόμενα ποσοστά επικράτησης λίπους, διόγκωσης, φλεγμονής και ίνωσης συγκρίθηκαν με τα ημι-ποσοτικά ευρήματα από τις χειροκίνητες επισημειώσεις παθολόγων. Για τις δύο διαγνωστικές προσεγγίσεις, παρατηρήθηκε ICC 0.97 για τη στεάτωση, 0.96 για την φλεγμονή, 0.94 για τη διόγκωση και 0.92 για την ίνωση.

Στους Liu et al. [44] εισήχθη το αυτοματοποιημένο εργαλείο qFIBS σε μια προσπάθεια να εκτιμηθεί ο επιπολασμός διαφορετικών παθολογικών συμπτωμάτων που σχετίζονται με διαταραχές NAFLD-NASH. Η διαγνωστική διαδικασία περιλάμβανε ανάλυση 219 δειγμάτων βιοψίας που χρωματίστηκαν με H&E και Masson's trichrome για την παρακολούθηση της ηπατικής στεάτωσης, της κυτταρικής διόγκωσης, της λοβιακής φλεγμονής και της ίνωσης.

Για τη σάρωση των βιοψιών, χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπία παραγωγής δεύτερης αρμονικής/φθορισμού διεγερμένη από δύο φωτόνια (second harmonic generation/two-photon-excited fluorescence – SHG/TPEF) σε μεγέθυνση 20×. Η υπολογιστική ανάλυση διεξήχθη παραμετροποιώντας ξεχωριστά προφίλ κάθε ιστολογικής αλλοίωσης και αντιμετωπίζοντας κάθε εύρημα ηπατικής κλάσης ως συνεχή και όχι κατηγορηματική μεταβλητή. Σε σύγκριση με τις ημι-ποσοτικές εκτιμήσεις παθολόγων, η απόδοση του qFIBS γενικά έδειξε καλύτερη συσχέτιση κατά την εκτίμηση του βαθμού στεάτωσης (0.867-1.000, $P < 0.001$) και ίνωσης (0.787-1.000, $P < 0.001$) και αντίστοιχα χαμηλότερη συσχέτιση κατά τη διάκριση της σοβαρής φλεγμονής (0.726-0.933, $P < 0.001$) και υψηλότερων βαθμών κυτταρικής διόγκωσης (0.708-0.957, $P < 0.001$).

Στους Teramoto et al. [45] εφαρμόστηκε μια μεθοδολογία ανάλυσης τοπολογικών δεδομένων για την ταξινόμηση 79 εικόνων βιοψίας σε μεγέθυνση 10× σε υποτύπους NAFLD (1-4) λαμβάνοντας υπόψη το σύστημα βαθμολόγησης Matteoni. Το συγκεκριμένο σύστημα συνέβαλε επίσης στη διάκριση μεταξύ δειγμάτων NASH και NAFL, με βάση την παρουσία ευρημάτων όπως η κυτταρική διόγκωση ή η ιστολογική ίνωση. Τα βήματα προεπεξεργασίας εικόνων περιλάμβαναν την μετατροπή κάθε χρωματικού δείγματος σε αντίστοιχο της κλίμακας του γκρι και την εξισορρόπηση ιστογράμματος για τον υπολογισμό τιμών χαρακτηριστικών ανά υποεπίπεδα έντασης εικονοστοιχείων. Συνεχίζοντας, ο αλγόριθμος Logistic Regression κλήθηκε για τη διάκριση και σταδιοποίηση των δομών NAFLD-NASH βάσει των τοπολογικών τους χαρακτηριστικών. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν καλή απόδοση ταξινόμησης μεταξύ των υποτύπων NAFLD, καθώς και διάκρισης μεταξύ περιπτώσεων NASH και NAFLD με ποσοστά ακρίβειας άνω του 90%. Επίσης, οι υψηλότερες τιμές AUC για ταξινόμηση μεταξύ NASH και δύο υποτύπων NAFLD, χρησιμοποιώντας ανάλυση καμπυλών λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (receiver operating characteristic - ROC), ήταν 0.984 και 0.946, αντίστοιχα.

Στους Brunt et al. [46] παρουσιάστηκε το εργαλείο ανάλυσης εικόνων “qBallooning2” για την παρακολούθηση της ηπατοκυτταρικής διόγκωσης σε 44 δείγματα βιοψίας με χρώση H&E και με τη μέθοδο μικροσκοπικής απεικόνισης SHG/TPEF. Οι σαρωμένες διαφάνειες εξετάστηκαν επίσης από εννέα παθολόγους για τη σταδιοποίηση της NASH, οι οποίοι αργότερα επισημείωσαν κύτταρα με διόγκωση για την εκπαίδευση αλγόριθμων μηχανικής μάθησης. Η ανίχνευση υποψήφιων διογκωμένων κυττάρων ήταν το αρχικό βήμα της προσέγγισης qBallooning2, η οποία πραγματοποιήθηκε στο κανάλι TPEF χρησιμοποιώντας παραδοσιακές τεχνικές κατάτμησης εικόνων, όπως η μορφολογική επεξεργασία και ο μετασχηματισμός λεχάνης απορροής. Οι κατατμημένες δομές στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν από τη φάση μηχανικής μάθησης λαμβάνοντας υπόψη τιμές χαρακτηριστικών όπως το εμβαδόν, η περίμετρος, η απόσταση μεταξύ των διογκωμένων κυττάρων και η συνολική περιοχή κολλαγόνου γύρω από τις περιοχές διόγκωσης. Όταν εκπαιδεύτηκε με σύνολα δεδομένων ≥ 50 δειγμάτων, ο αλγόριθμος qBallooning2 έδειξε τιμές ευαισθησίας 11%-41%, θετική προγνωστική

αξία (positive predictive value) 16%-38%, ποσοστά ψευδούς ανακάλυψης (false discovery rates) 62%-84% και ειδικότητα $> 99\%$. Ωστόσο, η τιμή συσχέτισης Fleiss kappa μεταξύ των αυτοματοποιημένων NASH ή μη-NASH NAFLD διαγνώσεων και των αντίστοιχων ημι-ποσοτικών ήταν 0.127 (95% CI 0.024-0.230, $p = 0.016$), η οποία θεωρήθηκε ότι οφείλεται στα μέτρια επίπεδα συμφωνίας μεταξύ των ιατρών, με Fleiss kappa 0.197 (95% CI 0.094–0.300) και ICC (0.718 [0.511–0.900]).

Τα πιο πρόσφατα χρόνια, οι μέθοδοι βαθιάς μάθησης έχουν εισαγάγει καινοτόμες και αποτελεσματικές λύσεις σε πολλές διεργασίες ανάλυσης εικόνας. Συνεπώς, τα βαθιά νευρωνικά δίκτυα έχουν επεκταθεί στον τομέα της ιστολογικής απεικόνισης προκειμένου να καταγράψουν με ακόμη πιο αυτοματοποιημένο τρόπο την ανατομία και τη φυσιολογία των παθολογικών ευρημάτων και να ποσοτικοποιήσουν τον επιπολασμό τους.

Οι Vicas et al. [47] στόχευσαν στην ανίχνευση της ιστολογικής ίνωσης και στην αντικειμενική ποσόστωση της στεάτωσης σε ένα σύνολο 107 αποκομμένων τμημάτων από WSIs ήπατος. Οι δύο διαγνωστικές προσεγγίσεις βασίστηκαν σε κλασικές τεχνικές υπολογιστικής όρασης (προεπεξεργασία εικόνας και συμβατική μηχανική μάθηση) και σε συνελκτικά νευρωνικά δίκτυα (convolutional neural networks - CNNs). Από τεχνικής άποψης, το στάδιο προεπεξεργασίας εικόνας περιλάμβανε τη μετατροπή χρωματικών καναλιών σε κλίμακα του γκρι ή HSV και τον υπολογισμό εκατοστημορίων ιστογράμματος για τη μείωση της διακύμανσης στις τιμές φωτεινότητας των εικονοστοιχείων. Επιπλέον, οι αρχιτεκτονικές VGG-16 και U-net ήταν τα προτιμώμενα βαθιά μοντέλα. Για την επικύρωση της αυτοματοποιημένης ανάλυσης εξετάστηκε ο συντελεστής συσχέτισης R^2 με βάση τις ημι-ποσοτικές αξιολογήσεις ενός ιατρού. Συνοπτικά, το U-net αποδείχθηκε ως η βέλτιστη αρχιτεκτονική για την σημασιολογική κατάτμηση (semantic segmentation) αντικειμένων, ενώ ο R^2 ήταν 0.748 για την κλασική προσέγγιση υπολογιστικής όρασης και 0.893 για την CNN.

Οι Guo et al. [48] εφάρμοσαν τη μέθοδο βαθιάς μάθησης Mask R-CNN για την κατάτμηση μεμονωμένων και επικαλυπτόμενων σταγονιδίων στεάτωσης σε 451 ηπατικές WSIs. Τις συγκεκριμένες συνόδευσαν και οι μάσκες κατάτμησης λίπους βασικής αλήθειας. Οι αρχιτεκτονικές Resnet41, Resnet50 και Resnet65 χρησίμευσαν ως η βάση (backbone) του Mask R-CNN, στις οποίες εφαρμόστηκε η μεταφορά μάθησης (transfer learning). Ταυτόχρονα, δοκιμάστηκε μια συμβατική μέθοδος κατάτμησης αντικειμένων λίπους, η οποία περιλάμβανε τη μετατροπή των εικόνων εισόδου σε κλίμακα του γκρι, την αφαίρεση περιοχών με στερεότητα > 0.95 και τη διαίρεση επικαλυπτόμενων λιπιδίων με μια μέθοδο ψηφοφορίας σημείων υψηλής καμπυλότητας. Το κύριο αποτέλεσμα αναφέρεται στο ότι η αρχιτεκτονική Resnet50 παρήγαγε την υψηλότερη πιστότητα (75.87%), ανάκληση (60.66%), κατανομή-F1 (F1-score) (65.88%) και συντελεστή ομοιότητας κατάτμησης Jaccard (76.97%), σε σχέση με τις μέσες μετρήσεις στεάτωσης βασικής αλήθειας.

Στη μελέτη των Yang et al. [49] έγινε υλοποίηση και εκπαίδευση μιας νέας αρχιτεκτονικής CNN για την ποσοτική ανάλυση της ηπατικής στεάτωσης. Για τη ερευνητική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 180 ιστολογικές εικόνες ζωικών δειγμάτων (κουνελιών) που ελήφθησαν με μεγέθυνση προσοφθαλμίου φακού $10\times$ και αντικειμενικού $40\times$. Αρχικά, για κάθε εικόνα προσδιορίστηκε η αναλογία στεάτωσης βασικής αλήθειας μέσω χειροκίνητης κατάτμησης λιποκυττάρων από επισημειώσεις ιατρών. Κατά τη δοκιμή της προτεινόμενης CNN τοπολογίας, οι μέσες τιμές απόλυτου σφάλματος ήταν $\leq 3.21\%$, ενώ ο συντελεστής Pearson αποκάλυψε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του μέσου υπολογιζόμενου λόγου συσσώρευσης λίπους και της βασικής αλήθειας ($R \geq 0.9227$).

Στη μελέτη των Salvi et al. [50] επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μιας πλήρως αυτοματοποιημένης μεθόδου ονόματι “HEPASS” για τον εντοπισμό δομών ηπατικής μικροστεάτωσης και μακροστεάτωσης σε 385 εικόνες βιοψίας H&E. Αρχικά, η χρήση ενός υψιπερατού φίλτρου RGB, καθώς και ο καθορισμός του κατωφλίου Otsu σε συνδυασμό με τον τελεστή μορφολογικού ανοίγματος, επέτρεψαν την αναγνώριση των εξωτερικών ορίων των ιστολογικών περιοχών. Έπειτα, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς πυρήνες Gabor, πραγματοποιήθηκε μια γενική κατάτμηση των αντικειμένων ενδιαφέροντος. Επιπλέον, εφαρμόστηκε μια προσαρμοστική χρωματική αποσυνέλιξη για τον διαχωρισμό των καναλιών αιματοξυλίνης και ηωσίνης μαζί με τα μοντέλα ενεργού περιγράμματος Chan-Vese ώστε να εντοπιστούν πιθανές δομές μικροστεάτωσης. Το τελικό μεθοδολογικό στάδιο περιλάμβανε την εκτέλεση σημασιολογικής κατάτμησης στα φιλτραρισμένα αντικείμενα με το βαθύ U-Net CNN έχοντας ως βάση την αρχιτεκτονική ResNet-34. Συμπερασματικά, η μέθοδος HEPASS ήταν σε θέση να διαχωρίσει επικαλυπτόμενες περιοχές σε δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και να εξαλείψει τα ιστολογικά τεχνουργήματα από τη διαγνωστική διαδικασία. Τα ευρήματα της αυτοματοποιημένης διάγνωσης έδειξαν ακρίβεια ταξινόμησης αντικειμένων λίπους 97.27% και μέσο σφάλμα ποσοτικοποίησης στεάτωσης 1.07% , σε σύγκριση με τις χειροκίνητες επισημειώσεις παθολόγων.

Οι Sun et al. [51] ανέπτυξαν μια μέθοδο βαθιάς μάθησης για τον υπολογισμό του ποσοστού συσσώρευσης λίπους σε 96 WSIs ήπατος με χρώση H&E και μεγέθυνση $20\times$. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην τεχνική μεταφοράς μάθησης στην προεκπαιδευμένη αρχιτεκτονική VGG-16, προκειμένου να αποδοθούν ετικέτες στεάτωσης σε εικονοστοιχεία που αποτελούν περιοχές εναπόθεσης λίπους και να εξαλειφθούν τα υγιή ανατομικά αντικείμενα. Συγκεκριμένα, η εκπαίδευση του μοντέλου CNN χωρίστηκε σε διάφορες φάσεις, καθεμιά από τις οποίες περιλάμβανε το “ξεπάγωμα” του επόμενου συνελικτικού μπλοκ για την ενημέρωση των βαρών λαμβάνοντας υπόψη τα νέα ιστολογικά δεδομένα. Στη συνέχεια, κάθε συντονισμένο (fine-tuned) μοντέλο προχώρησε στην ταξινόμηση των εικονοστοιχείων εντός επιθεμάτων εικόνας (image patches). Αυτό επιτεύχθηκε πρώτα με την τεχνική κυλιόμενου παραθύρου στις WSIs με διάσταση 832×832 και βήμα 448 εικονοστοιχεία. Προχωρώντας, εφαρμόστηκε ένας συντελεστής υποδειγματοληψίας 32, με αποτέλεσμα οι ταξινομητές να

παράγουν πιθανοτικούς κατηγορηματικούς χάρτες μεγέθους 26×26 εικονοστοιχείων για κάθε επίθεμα εικόνας. Συνολικά, το διαγνωστικό εργαλείο έδειξε επαρκή απόδοση μέτρησης λίπους με καλή συσχέτιση Pearson, τόσο στο σύνολο εκπαίδευσης ($r = 0.88$, $ICC = 0.88$) όσο και σε νέα σύνολα δοκιμής ($r = 0.85$, $ICC = 0.85$), με βάση τις χειροκίνητες επισημειώσεις ιατρών.

Στους Qu et al. [52] προτάθηκε ένα αυτοματοποιημένο σύστημα για την αναγνώριση πολλαπλών πτυχών της NAFLD, όπως η στεάτωση, η ηπατοκυτταρική διόγκωση, η λοβιακή φλεγμονή και η ιστολογική ίνωση. Για τη μελέτη ελήφθησαν υπόψη 87 διαφάνειες βιοψίας χρωματισμένες με H&E και Trichrome και ψηφιοποιημένες σε συντελεστές μεγέθυνσης $5\times$, $10\times$ και $20\times$. Για να μειωθεί η χρωματική διακύμανση μεταξύ των μικροσκοπικών δειγμάτων, κάθε WSI χωρίστηκε σε επιθέματα εικόνας και οι τιμές της έντασης κανονικοποιήθηκαν. Ακολούθως, τα δείγματα κάθε ηπατικής κλάσης εισήχθησαν σε ξεχωριστά ResNet-18 CNN μοντέλα, στα οποία τα βάρη του τελευταίου συνελικτικού μπλοκ ενημερώθηκαν για να εξαχθούν χάρτες χαρακτηριστικών πιο σχετικοί με το ιστοπαθολογικό πρόβλημα. Συμπερασματικά, δεν εντοπίστηκαν διαφορές στην απόδοση ταξινόμησης μεταξύ των μεγεθύνσεων $5\times$, $10\times$ και $20\times$ όσον αφορά τα αντικείμενα στεάτωσης ($AUC = 90.48\%$) και ίνωσης. Αντίθετα, ο συντελεστής $20\times$ παρήγαγε την βέλτιστη απόδοση για εικόνες λοβιακής φλεγμονής ($AUC = 70.18\%$) και ο $10\times$ για ηπατοκυτταρική διόγκωση, αντίστοιχα. Επιπλέον, η χρώση Trichrome οδήγησε σε καλύτερες προβλέψεις των περιοχών ίνωσης ($AUC = 83.85\%$) και κυτταρικής διόγκωσης ($AUC = 81.06\%$).

Οι Taylor-Weiner et al. [53] παρουσίασαν επίσης μια μεθοδολογία για την παρακολούθηση τεσσάρων NAFLD-NASH ιστοπαθολογικών υποτύπων (στεάτωση, κυτταρική διόγκωση, λοβιακή φλεγμονή και ίνωση) σε εικόνες βιοψίας ήπατος από ασθενείς με προχωρημένη NASH. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν νέα βαθιά CNN εμπνευσμένα από τις υπολειμματικές (residual) συνδέσεις και τις αρχιτεκτονικές Inception για να διαχωρίσουν τις ιστολογικές περιοχές από το υπόβαθρό τους, να αποκλείσουν υγιή τεχνουργήματα από τις διαγνώσεις και να κάνουν προβλέψεις σε επίπεδο εικονοστοιχείων, με τη μορφή χαρτών θερμότητας, για τα αντικείμενα ηπατικής νόσου στις WSIs. Σε σύγκριση με τις ημι-ποσοτικές αξιολογήσεις ενός ειδικού ηπατολόγου, βρέθηκαν ικανοποιητικές συσχετίσεις Spearman για τις ταξινομήσεις των περιοχών στεάτωσης ($r = 0.59$) και ίνωσης ($r = 0.63$), ενώ χαμηλότερα επίπεδα συμφωνίας για τις περιοχές κυτταρικής διόγκωσης ($r = 0.39$) και φλεγμονής ($r = 0.34$).

Ομοίως, οι Heinemann et al. [54] ανέπτυξαν έναν αυτοματοποιημένο σύστημα για ποσοτικοποίηση της σοβαρότητας των τεσσάρων ιστολογικών αλλοιώσεων που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη μελέτη σε μικροσκοπικά δείγματα ήπατος. Για να επιτευχθεί επίσης σταδιοποίηση των NAFLD/NASH, το αναπτυσσόμενο λογισμικό έλαβε υπόψη τις κλίμακες

βαθμολόγησης Kleiner και Brunt σε 467 βιοψίες με χρώσεις Masson's Trichrome και Masson Goldner. Για την αναγνώριση των ασθενικών περιοχών ενδιαφέροντος, διαμορφώθηκε ένα σύνολο δεδομένων εικόνας με χειροκίνητη επισημείωση δειγμάτων κυτταρικής διόγκωσης, φλεγμονής και ίνωσης από έναν βιολόγο, ενώ η επισημείωση στεατωτικών κυττάρων έγινε αυτόματα μέσω της αρχιτεκτονικής U-net. Τα δεδομένα επισημείωσης τροφοδοτήθηκαν στη συνέχεια σε προεκπαιδευμένα Inception-v3 CNN μοντέλα και στα τελευταία τους επίπεδα, εφαρμόστηκε η μεταφορά μάθησης για την προσαρμογή τους στα νέα πρότυπα ηπατικής νόσου. Ένα CNN χρησιμοποιήθηκε ειδικά για την ανίχνευση περιοχών ίνωσης και ένα άλλο για στεάτωσης, διόγκωσης και φλεγμονής, αντίστοιχα. Διαχωρίζοντας τις WSIs σε πλέγματα επιθεμάτων εικόνας, οι CNN ταξινομήσεις εξήγαγαν έναν χάρτη θερμότητας, ως τη μέθοδο οπτικοποίησης χωρικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τις εξεταζόμενες ιστολογικές ανωμαλίες. Τέλος, με βάση τα ανιχνευμένα ευρήματα ηπατικής κλάσης, οι ανακτώμενοι χάρτες παρήγαγαν μια ενιαία βαθμολογία δραστηριότητας NAFLD/NASH. Η συμφωνία μεταξύ των υπολογισμένων βαθμολογιών και των αντίστοιχων της βασικής αλήθειας ενός παθολόγου μετρήθηκε με τις μέσες τετραγωνικές σταθμισμένες τιμές kappa του Cohen, οι οποίες ήταν 0.66 για τη στεάτωση, 0.43 για την κυτταρική διόγκωση, 0.24 για τη φλεγμονή, 0.62 για την ίνωση και 0.52 για τη βαθμολόγηση της δραστηριότητας NAFLD. Παράλληλα, παρήχθη ένα μέσο απόλυτο σφάλμα 0.29 για τη στεάτωση, 0.61 για τη διόγκωση, 0.53 για τη φλεγμονή, 0.78 για την ίνωση και 0.77 για τη βαθμολόγηση NAFLD.

Στο άρθρο των Yin et al. [55] παρουσιάστηκε το εργαλείο "SparseX" για αυτόματη μάθηση αραιών ερμηνεύσιμων χαρακτηριστικών και βαθμολόγηση της δραστηριότητας NAFLD σε εικόνες βιοψίας ήπατος. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε η ερμηνεύσιμη χωρική δειγματοληψία (interpretable spatial sampling - ISS) καθοδηγούμενη από χαρακτηριστικά για την ανίχνευση ασθενικών περιοχών βάσει των παρατηρούμενων ιστολογικών αλλοιώσεων. Προκειμένου να επιλεγούν πιο αραιές αναπαραστάσεις, δηλαδή εκείνες με μεγαλύτερη μεταβλητότητα, για πιο ακριβείς εντοπισμούς των δομών ενδιαφέροντος, μεθοδεύτηκε η τεχνική της μη-αρνητικής παραγοντοποίησης πίνακα (non-negative matrix factorization - NMF) και ενσωματώθηκε σε ένα βαθύ νευρωνικό δίκτυο. Η προτεινόμενη μέθοδος έλαβε χώρα στα δημοσίως διαθέσιμα σύνολα δεδομένων "SteatosisRaw" και "Liver-NAS". Ένας ειδικός ιατρός αρχικά αξιολόγησε ημι-ποσοτικά κάθε WSI μέσω της χειροκίνητης ταυτοποίησης των ασθενικών τμημάτων, οδηγώντας σε σταδιοποίηση των βαθμών στεάτωσης, ηπατοκυτταρικής διόγκωσης και ιστολογικής φλεγμονής. Όσον αφορά την αυτοματοποιημένη μέθοδο, οι WSIs χωρίστηκαν σε πλέγματα επιθεμάτων εικόνας, από τα οποία επιλέχθηκαν k με βάση τον υποτύπο NAFLD και πραγματοποιήθηκε εξαγωγή χαρακτηριστικών, ενώ η NMF συνέσπερε στον εντοπισμό της στεάτωσης, διόγκωσης και φλεγμονής. Οι μέσες κατανομές-F1 της ISS στο σύνολο δεδομένων SteatosisRaw ήταν 73.1%, 69.9% και 76.7% για τη στεάτωση, την ηπατοκυτταρική διόγκωση και τη φλεγμονή, αντίστοιχα, όπου προέκυψαν με βάση τα επισημειωμένα ευρήματα του παθολόγου. Όταν χρησιμοποιήθηκε επίσης η τεχνική NMF

(ISS + NMF), η ικανότητα ανίχνευσης του SparseX βελτιώθηκε με κατανομές-F1 79.3% για τη στεάτωση και 76.7% για την κυτταρική διόγκωση και τη φλεγμονή. Στο σύνολο δεδομένων Liver-NAS, η χρήση μόνο της ISS είχε ως αποτέλεσμα κατανομές-F1 74.6% για τη στεάτωση, 69.9% για τη διόγκωση και 55.2% για την ίνωση. Ωστόσο, όταν συνδυάστηκε με την NMF, οι κατανομές-F1 αυξήθηκαν σε 70.8% και 56.8%, για τις περιοχές διόγκωσης και φλεγμονής, αντίστοιχα.

2.1.2 Μεθοδολογίες ανάλυσης της μη-αλκοολικής λιπώδους παγκρεατικής νόσου

Παρά το γεγονός ότι το πάγκρεας είναι πιο επιρρεπές στην ανάπτυξη στεάτωσης σε σύγκριση με το ήπαρ, η μη-αλκοολική λιπώδης παγκρεατικής νόσος (non-alcoholic fatty pancreas disease – NAFPD) έχει διερευνηθεί λιγότερο από τη μη-αλκοολική λιπώδη ηπατική νόσο (NAFLD). Κατά συνέπεια, οι αυτοματοποιημένες μέθοδοι υπολογιστικής όρασης δεν έχουν ακόμη εφαρμοστεί εκτενώς στις εικόνες παγκρεατικής βιοψίας, με μεγαλύτερη έμφαση να δίνεται στην έρευνα με μη-επεμβατικές μεθόδους ιατρικής απεικόνισης και στην ανάλυση της NAFLD. Επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω, υπάρχουν λίγες δημοσιευμένες μελέτες παρακολούθησης της παγκρεατικής στεάτωσης, οι οποίες βασίζονται κυρίως σε ημι-ποσοτικές εξετάσεις ιστολογικών δειγμάτων, σε συνδυασμό με στατιστικές αναλύσεις διαγνωστικών αποτελεσμάτων.

Ξεκινώντας με τη μελέτη του Olsen [56], στόχος ήταν να εξεταστεί ο βαθμός λιπομάτωσης σε ιστολογικά δείγματα παγκρέατος από ανθρώπινους δότες. 394 άτομα ηλικίας άνω των 20 ετών παρείχαν βιοψίες από το σώμα του παγκρέατος με χρώση H&E για μικροσκοπική διάγνωση. Μάλιστα, το σύνολο υποδιαιρέθηκε σε ηλικιακές ομάδες 10 ετών, δηλαδή 20-29, 30-39, ..., 90-99, πριν διερευνηθεί η συσχέτιση της λιπώδους διήθησης με παράγοντες όπως η ηλικία και το βάρος. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στάδια για την κατηγοριοποίηση του βαθμού λιπομάτωσης, όπου το στάδιο 1 αντιπροσώπευε τμήματα με αραιά κατανεμημένα λιποκύτταρα στο εξωκρινές παρέγχυμα, τα στάδια 2 και 3 αυξημένη περιεκτικότητα σε λιποκύτταρα και το στάδιο 4 τμήματα με μερική ή πλήρη αντικατάσταση των εξωκρινών λοβών από λιπώδη ιστό. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι η ηλικία και το υπερβολικό βάρος συσχετίζονται σημαντικά με τα επίπεδα λίπους όπου αυξάνονται με την ηλικία, με τιμή Chi square test ($\chi^2 = 64.08$, $p < 0.001$) και συντελεστή συνάφειας (contingency coefficient) $C = 0.37$. Επιπλέον, οι ασθενείς με λιπομάτωση σταδίων 3-4 εμφάνισαν σημαντική αύξηση βάρους, η οποία επαληθεύτηκε στατιστικά με ($\chi^2 = 13.24$, $0.05 > p > 0.02$) και $C = 0.18$.

Οι Wilson et al. [57] προσπάθησαν να προσδιορίσουν τους μηχανισμούς πίσω από το σχηματισμό σταγονιδίων λίπους σε ιστολογικά δείγματα αρουραίων. Σύμφωνα με την κατανομή

t-Student (Student's t-test), οι βάσεις των ακινικών κυττάρων βρέθηκαν να έχουν πολυάριθμες και ομοιόμορφες εναποθέσεις λίπους, ιδίως σε δότες που τράφηκαν με αιθανόλη (15 ± 17 σταγονίδια/τετράγωνο πλέγμα) σε σύγκριση με εκείνα μιας ομάδας ελέγχου (control) (5 ± 0.8) ($p < 10^{-5}$), δηλαδή χωρίς κάποια πειραματική θεραπεία. Επιπρόσθετα, τα ακινικά κύτταρα στα δείγματα των δύο ομάδων είχαν παρόμοια μορφολογία και δεν έδειξαν στοιχειώδη εκφυλιστικών αλλαγών. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι η ανάπτυξη λιποκυττάρων στον παγκρεατικό ιστό αποδίδεται εν μέρει στην αυξημένη εστεροποίηση της χοληστερόλης.

Οι Nghiem et al. [58] επικεντρώθηκαν στην ημι-ποσοτική αξιολόγηση της διήθησης λίπους μεταξύ των παγκρεατικών λοβών και της συσχέτισή της με τον δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), εξετάζοντας 33 ιστολογικές τομές από την κεφαλή, το σώμα και την ουρά 7 παγκρεάτων, χρωματισμένες με H&E και σε μεγέθυνση $40\times$. Μικροσκοπικά, παρατηρήθηκε αυξημένη διήθηση λίπους μεταξύ των παγκρεατικών λοβών καθώς και πάχυνση των μεσολοβιακών διαφραγμάτων με πολυάριθμα λιποκύτταρα εντός τους, που εκτιμήθηκε ότι προκλήθηκε από τον υψηλό $\Delta\text{ΜΣ} = 33.3$ των δοτών.

Στόχος της μελέτης των Mathur et al. [59] ήταν να εξακριβωθεί εάν η στεάτωση αποτελεί παράγοντα κινδύνου για μετεγχειρητική παγκρεατική φίστουλα, ως η μη-ομαλή επικοινωνία μεταξύ του παγκρέατος και άλλων οργάνων. Για την διάκριση του λιπώδους ιστού, χρησιμοποιήθηκαν 40 δείγματα βιοψίας ιστολογικής χρώσης H&E, ιδιαίτερα από τον παγκρεατικό λαιμό (neck) και από ασθενείς με και χωρίς παγκρεατική φίστουλα. Για κάθε δείγμα, ο συνολικός βαθμός επικράτησης της στεάτωσης, ως η συνολική ποσότητα λίπους εντός ενός μεμονωμένου παγκρεατικού λοβού (intralobular) και μεταξύ πολλαπλών παγκρεατικών λοβών (interlobular), αξιολογήθηκε και κατατάχθηκε σε διάφορα στάδια (0 - 4+). Οι διαγνωστικές εξετάσεις έδειξαν ότι, σε σύγκριση με το 13% των ασθενών ελέγχου, τα άτομα με φίστουλα είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ενδολοβιακού, μεσολοβιακού και ολικού παγκρεατικού λίπους, με το 50% από αυτούς να κατηγοριοποιούνται ως με στάδια στεάτωσης > 3 ($P < 0.001$). Σε μια μεταγενέστερη μελέτη [60], η ίδια ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε δοκιμές για να καθορίσει εάν η διήθηση λίπους και η συσσώρευση ίνωσης συσχετίζονται με άτομα με αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος. Οι ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για αδενοκαρκίνωμα είχαν σημαντικά περισσότερο παγκρεατικό λίπος από εκείνους που ήταν αρνητικοί (46.4 ± 8.7 έναντι 21.4 ± 4.8 , $p < 0.02$). Όσον αφορά τους θετικούς ασθενείς, είχαν επίσης μειωμένα ποσοστά ίνωσης (1.7 ± 0.3 έναντι 2.7 ± 0.3 , $p < 0.02$).

Στους Pinnick et al. [61] διερευνήθηκε η συσχέτιση της ιστολογικής περιεκτικότητας σε λίπος, της τριακυλογλυκερόλης (TG) και του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (type-2 diabetes mellitus - T2DM). Συγκεκριμένα, ο ποσοτικός επιπολασμός των λιποκυττάρων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό επεξεργασίας εικόνων ImageJ και με μορφομετρικές τεχνικές σε ιστολογικές εικόνες χρωματισμένες με αιμοτοξυλίνη. Αρχικά, τα λιποκύτταρα φάνηκε να καταλαμβάνουν έως και το 20% της ιστολογικής περιοχής. Η ιστολογική ανάλυση

των βιοψιών επιβεβαίωσε επίσης ότι η ποσοτική μέτρηση λίπους συσχετίστηκε σημαντικά με την περιεκτικότητα τους σε TG ($r = 0.64$, $P < 0.05$), ανεξάρτητα από τη διαβητική κατάσταση κάθε ασθενούς.

Οι Rosso et al. [62] διερεύνησαν τη συσχέτιση μεταξύ του επιπολασμού του λίπους και της ανάπτυξης παγκρεατικής φίστουλας σε 111 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε παγκρεατογαστροστομία. Η ποσοτική αξιολόγηση της λιπώδους διήθησης πραγματοποιήθηκε σε δείγματα βιοψίας που χρωματίστηκαν με H&E και εκφράστηκε ως η αναλογία των λιποκυττάρων στην ενδολοβιακή (intralobular) και μεσολοβιακή (interlobular) περιοχή προς τη συνολική επιφάνεια του ιστού. Σύμφωνα με μια μονομεταβλητή ανάλυση, η αυξημένη διήθηση παγκρεατικού λίπους ($> 10\%$) συσχετίστηκε σημαντικά με την παρουσία φίστουλας ($P = 0.0003$). Παρόμοια με τη μελέτη του Olsen [56], τα αυξημένα επίπεδα παγκρεατικού λίπους συσχετίστηκαν σημαντικά με την προχωρημένη ηλικία ($P = 0.049$) και τον ΔΜΣ ($P < 0.0001$).

Οι Fraulob et al. [63] εξέτασαν τη σχέση μεταξύ της NAFLD, του λιπώδους ήπατος και της αντίστασης στην ινσουλίνη σε βιοψίες ποντικών που χρωματίστηκαν με H&E. Για τη διερεύνηση της μορφομετρίας των λιποκυττάρων και τη μέτρηση του επιπολασμού τους, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, ΗΠΑ). Για να επισημανθούν οι λιπώδεις περιοχές ενδιαφέροντος, χρησιμοποιήθηκε ένα εργαλείο επιλογής με βάση μια τιμή κατωφλίου πυκνότητας εικονοστοιχείων. Συνοπτικά, σε δείγματα με υψηλότερο λόγο στεάτωσης, οι δομές λίπους είχαν μορφομετρία $86.5 \pm 0.9 \mu\text{m}$ σε αντίθεση με $56.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ σε αντίστοιχα με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος ($p < 0.0001$). Σημειώνεται επίσης ότι δείγματα με αυξημένη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ και στο πάγκρεας εμφάνισαν συμπτώματα αντίστασης στην ινσουλίνη ($p < 0.0001$). Οι συγγραφείς ισχυρίστηκαν ότι παρόμοια φαινόμενα ισχύουν για παράγοντες του ανθρώπινου μεταβολικού συνδρόμου, που μπορεί τελικά να οδηγήσει σε χρόνια παγκρεατίτιδα.

Ο στόχος των Gaujoux et al. [64] ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης του ΔΜΣ σε ασθενείς με παγκρεατεκτομή ως πιθανό παράγοντα κινδύνου για παγκρεατική φίστουλα (pancreatic fistula - PF). Η ιστολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε σε 100 δείγματα βιοψίας H&E που ελήφθησαν από τον λαϊμό του παγκρέατος και τα διαγνωστικά δεδομένα υποβλήθηκαν σε πολυπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression - LR). Με βάση την περιφερική (perilobular) και εντός μεμονωμένων παγκρεατικών λοβών (intralobular) διήθηση των φυσαλίδων στεάτωσης, υπολογίστηκε ο συνολικός επιπολασμός λίπους. Πέραν τούτου, βαθμολογήθηκαν περιοχές παγκρεατικής ίνωσης που αναπτύχθηκαν επίσης περιφερικά και εντός μεμονωμένων λοβών. Σύμφωνα με την πολυπαραγοντική ανάλυση, ο $\Delta\text{ΜΣ} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ και η παρουσία φυσαλίδων λίπους ήταν οι πιο σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες της PF ($P < 0.0001$). Από την άλλη πλευρά, η παγκρεατική ίνωση δεν αποδείχθηκε ως καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη PF. Η

περιοχή κάτω από την ROC καμπύλη (AUROC) για αυτές τις εκτιμήσεις ήταν 0.78, υποδεικνύοντας μια αντικειμενική βαθμολογία που ήταν σύμφωνη με τις ημι-ποσοτικές διαγνώσεις δύο κλινικών ιατρών. Η ακρίβεια κάθε PF βαθμολόγησης αποδείχθηκε επίσης από το τεστ Hosmer-Lemeshow ($P = 0.98$), η οποία συνεπάγεται με έλλειψη απόκλισης μεταξύ των τιμών του μοντέλου LR και των παρατηρούμενων από τους ιατρούς ποσοστών διάγνωσης.

Οι Van Geenen et al. [65] αναζήτησαν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της παγκρεατικής στεάτωσης και της NAFLD σε 80 βιοψίες από αποθανόντες δότες. Πιο emphaticά, η μονομεταβλητή διατάξιμη (univariate ordinal) λογιστική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για τη συσχέτιση πολλαπλών ιστολογικών παραμέτρων-παθήσεων σε δείγματα παγκρέατος (λίπος) και ήπατος (λίπος, ηπατοκυτταρική διόγκωση και λοβιακή φλεγμονή) και για δύο παραμέτρους, η δυωνυμική (binary) λογιστική παλινδρόμηση, αντίστοιχα. Το ολικό παγκρεατικό λίπος αποδείχτηκε ότι είναι ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας του επιπολασμού της NAFLD ($P = 0.02$). Επιπλέον, το μεσολοβιακό και το ολικό παγκρεατικό λίπος ($P = 0.02$ και $P = 0.03$, αντίστοιχα) βρέθηκαν να είναι σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες για τη βαθμολογία δραστηριότητας NAFLD. Τέλος, σε αντίθεση με το ολικό λίπος, η παρουσία ενδολοβιακού παγκρεατικού λίπους συσχετίστηκε με τη μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH).

Οι Barriere et al. [66] ανέπτυξαν ένα μοντέλο για την παρακολούθηση των επιπτώσεων του μεταβολικού συνδρόμου σε ασθενείς με T2DM, συμπεριλαμβανομένης της αντίστασης στην ινσουλίνη, της δυσλειτουργίας των β-κυττάρων και άλλων βλαβών. Για να επιτευχθεί αυτό, αναλύθηκαν ψηφιοποιημένες βιοψίες αρουραίων χρωματισμένα με αιματοξυλίνη-ηωσίνη-σαφράν (hematoxylin-eosin-safran - HES) με το λογισμικό NIS-Elements Advanced Research (Nikon Instruments Inc., Τόκυο, Ιαπωνία). Τεχνικά, το μέγεθος των νησιδίων Λάγγκερχανς (Langerhans) υπολογίστηκε με βάση την αντίθεσή τους με τα συμπλέγματα κυττάρων (άκτινοι) χρησιμοποιώντας μια αυτόματα καθορισμένη τιμή κατωφλίου. Οι μορφομετρικές αναλύσεις των παγκρεατικών εικόνων αποκάλυψαν ότι ο αριθμός των νησίδων Langerhans μειώθηκε σημαντικά στα διαβητικά δείγματα λόγω της δυσλειτουργίας των β-κυττάρων τους ($P < 0.05$). Επίσης, σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου, το μέγεθος των υφιστάμενων νησίδων αυξήθηκε σημαντικά ($P < 0.01$), έχοντας επίσης υπερπλαστικές και αιμορραγικές αλλοιώσεις, που καταδεικνύουν την ύπαρξη T2DM.

Οι Sokmen et al. [67] διερεύνησαν τη συσχέτιση μεταξύ ηπατικής και παγκρεατικής στεάτωσης σε 228 ασθενείς με NAFLD. Τόσο η αξονική τομογραφία (CT) όσο και οι διαφάνειες βιοψίας χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του βαθμού συσσώρευσης λίπους στο ήπαρ, ενώ τρεις διαφορετικές μέθοδοι απεικόνισης βασισμένες στην CT για το πάγκρεας, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των βαθμών στεάτωσης που προσδιορίστηκαν με βιοψίες ήπατος και εκείνων με CT ($p < 0.001$). Αντίθετα, δεν υπήρχε

συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών παγκρεατικού λίπους στις εξετάσεις CT και των αντίστοιχων στο ήπαρ που καθορίστηκαν με τη μέθοδο βιοψίας ($p > 0.05$).

Οι Naik et al. [68] ανέπτυξαν το εργαλείο “Fatquant” για τον εντοπισμό περιοχών διήθησης λίπους σε βιοψίες παγκρέατος H&E από μια δημοσίως προσβάσιμη βάση δεδομένων. Για να διαχωριστούν τα επικαλυπτόμενα λιποκύτταρα με διαγώνια γειτνίαση και να εξαλειφθούν τα ιστολογικά τεχνουργήματα, εφαρμόστηκε ένας πυρήνας τετραγωνικού σχήματος πεπερασμένου μεγέθους στις αρχικές εικόνες H&E. Επομένως, διατηρήθηκαν μεμονωμένες φυσαλίδες λίπους που πληρούσαν τα κριτήρια των τιμών μικρομέτρου (micron) ανά εικονοστοιχείο και διαμέτρου. Η διαδικασία κατάτμησης πραγματοποιήθηκε επίσης με την υπάρχουσα μέθοδο “Adiposoft”, η οποία δυαδικοποίησε τα δείγματα με μια τιμή κατωφλίου, αντί να ληφθεί υπόψη η παράμετρος του μικρόμετρου στα χρωματικά κανάλια. Για να αξιολογηθεί η ακρίβεια ανίχνευσης των αλγόριθμων ανάλυσης εικόνας, υπολογίστηκε ο λόγος τομής προς την ένωση (intersection over union - IoU) για να προσδιοριστεί η ομοιότητα κατάτμησης μεταξύ των αυτομάτως καθορισμένων περιοχών λίπους και των αντίστοιχων βασικής αλήθειας από χειροκίνητες επισημειώσεις. Ως συμπέρασμα, οι τιμές IoU του Fatquant κυμαίνονταν από 0.797 έως 0.966, δείχνοντας ικανοποιητικές αποδόσεις ανίχνευσης των περιοχών στεάτωσης. Αντίθετα, η μέθοδος Adiposoft είχε μειωμένη απόδοση, με τις τιμές IoU να κυμαίνονται από 0 έως 0.935, αδυνατώντας να εντοπίσει οποιαδήποτε δομή λίπους σε πολλά δείγματα.

2.1.3 Μεθοδολογίες ανάλυσης της νεφροκυτταρικού καρκινώματος

Ως αποτέλεσμα των εξελίξεων στην ιστολογική απεικόνιση, η εξέταση εικόνων μικροσκοπίας έχει αναδειχθεί ως το χρυσό πρότυπο για κλινικές μελέτες του νεφροκυτταρικού καρκινώματος (renal cell carcinoma - RCC), μειώνοντας σημαντικά τα ζητήματα που σχετίζονται με την υποκειμενικότητα στις ανθρώπινες ερμηνείες. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία περιλαμβάνει μεθοδολογίες υπολογιστικής όρασης που στοχεύουν διάφορους υποτύπους του RCC σε δείγματα βιοψίας με ιστολογική χρώση H&E, η οποία προτιμάται περισσότερο τα τελευταία χρόνια για την παρατήρηση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών λεπτομερειών.

Οι Waheed et al. [69] είχαν ως στόχο την ποσοτική αξιολόγηση του RCC σε 64 ιστολογικά δείγματα H&E που ελήφθησαν με ολική νεφρεκτομή. Το αναπτυσσόμενο εργαλείο επικεντρώθηκε αρχικά στην κατάτμηση ογκολογικών δομών ενδιαφέροντος χρησιμοποιώντας τεχνικές επεξεργασίας εικόνας, όπως το Γκαουσιανό φίλτρο θολώματος (Gaussian blur) για την ενίσχυση των ακμών, η ομαδοποίηση K-means για τον διαχωρισμό των καρκινικών κυττάρων από το υπόβαθρό τους, οι μορφολογικοί τελεστές συστολής και διαστολής για την εξάλειψη ανεπιθύμητων τεχνουργημάτων και ο μετασχηματισμός λεκάνης απορροής για

τον διαχωρισμό επικαλυπτόμενων κυτταρικών δομών. Ως τελικό βήμα, εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο Naive Bayes, τα αντικείμενα κατάτμησης χωρίστηκαν σε τέσσερις υποτύπους RCC: 1) διαυγοκυτταρικό νεφρικό καρκίνωμα (clear cell renal cell carcinoma - ccRCC), 2) θηλώδες νεφρικό καρκίνωμα (papillary renal cell carcinoma - pRCC), 3) χρωμοφοβικό νεφρικό καρκίνωμα (chromophobe renal cell carcinoma - chrRCC) και 4) νεφρικό ογκοκύττωμα (renal oncocytoma - ROnc). Σύμφωνα με τον χαρακτηρισμό των κατατμημένων αντικειμένων από έναν παθολόγο, η υπολογιστική μέθοδος παρήγαγε μια ακρίβεια ταξινόμησης των υποτύπων RCC ίση με 98.4%.

Ομοίως, οι Chaudry et al. [70] επικεντρώθηκαν στην αναγνώριση των υποτύπων ccRCC, pRCC, chrRCC και ROnc του RCC σε 48 εικόνες βιοψίας H&E με συντελεστή μεγέθυνσης 200×. Για να μειωθούν πρώτα οι έντονες διακυμάνσεις στις τιμές των εικονοστοιχείων, οι έγχρωμες εικόνες μετατράπηκαν πρώτα σε αντίστοιχες της κλίμακας του γκρι τεσσάρων επιπέδων. Στη συνέχεια, η ομαδοποίηση K-means βοήθησε στον διαχωρισμό των ασθενικών περιοχών ενδιαφέροντος, έτσι ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω ανάλυση αυτών. Συγκεκριμένα, στατιστικά στοιχεία που σχετίζονται με τις μορφολογικές και υφικές ιδιότητες των ογκολογικών τμημάτων, καθώς και την αντίθεση, ενέργεια, ομογένεια και εντοπία, υπολογίστηκαν με τη μέθοδο χωρικών πινάκων εξάρτησης επιπέδου του γκρι (gray-level spatial dependence matrix – GLCM). Τέλος, ο διακριτός μετασχηματισμός κυματιδίων (discrete wavelet transform) τεσσάρων επιπέδων συνέβαλλε στον υπολογισμό πρόσθετων χαρακτηριστικών υφής για κάθε δομή RCC. Με βάση τις εξαγόμενες τιμές, ο υποτύπος νεφρικού καρκίνου προσδιορίστηκε από τον αλγόριθμο Naive Bayes, ο οποίος παρήγαγε ακρίβεια ταξινόμησης της τάξης του 87.5%. Σε μια προσπάθεια βελτίωσης της μεθοδολογικής προσέγγισης [71], η κατάτμηση K-means τεσσάρων επιπέδων του γκρι ακολουθήθηκε από την εφαρμογή μορφολογικών τελεστών για το φιλτράρισμα περιοχών υψηλής πυκνότητας. Σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη, εξήχθησαν μόνο τα βασιζόμενα στη μέθοδο GLCM χαρακτηριστικά, ενώ ο ταξινομητής Naive Bayes εφαρμόστηκε για τη διάκριση των καρκινικών κυττάρων από διάφορες ανατομικές δομές, όπως αδένες, κυτταρόπλασμα και ερυθρά αιμοσφαίρια. Ως αποτέλεσμα, η ακρίβεια ανίχνευσης των υποτύπων ccRCC, pRCC, chrRCC και ROnc αυξήθηκε στο 95%.

Οι Kruk et al. [72] παρουσίασαν ένα εργαλείο για τη σταδιοποίηση ccRCC ογκολογικών περιοχών με βάση το σύστημα βαθμολόγησης Fuhrman σε 94 δείγματα βιοψίας χρωματισμένα με H&E και ψηφιοποιημένα σε μεγέθυνση 400×. Κατά τη διάρκεια του σταδίου προεπεξεργασίας εικόνας, εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός κυματιδίων (wavelet transform) για την αποθρομβοποίηση και τη βελτίωση των αχμών στα αντικείμενα, αλλά και ο μετασχηματισμός λεκάνης απορροής για διαχωρισμό επικαλυπτόμενων καρκινικών κυττάρων ενδιαφέροντος. Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκε ένα βήμα μετα-επεξεργασίας για τη συγχώνευση υπερκατατμημένων περιοχών με χαμηλά επίπεδα αντίθεσης και την εξάλειψη μικροσκοπικών

τεχνουργημάτων. Σε επόμενη φάση χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλές τεχνικές για την εξαγωγή χαρακτηριστικών μορφομετρίας, χρώματος, υψής και ιστογράμματος, ενώ η επιλογή των πιο πληροφοριακών έγινε με τη μέθοδο Fisher, τον Γενετικό Αλγόριθμο, τον εκτιμητή Τυχαίου Δάσους (Random Forest) και τη μέθοδο φιλτραρίσματος βάσει της γρήγορης συσχέτισης (fast correlation based filter). Προκειμένου να βελτιωθεί η ακρίβεια ταξινόμησης των ασθενικών δομών κατάτμησης, τα επιλεγμένα χαρακτηριστικά εισήχθησαν σε έναν συνδυασμό των ταξινομητών SVM και Random Forest σε ομάδα (ensemble). Συνολικά, το σύστημα αναγνώρισης βαθμού Fuhrman παρουσίασε μέση ακρίβεια 96.7%.

Στην μελέτη των Holdbrook et al. [73] αναπτύχθηκε ένα αυτοματοποιημένο σύστημα αξιολόγησης του βαθμού Fuhrman (χαμηλός = Fuhrman 1 και 2, υψηλός = Fuhrman 3 και 4) σε WSIs βιοψιών που ελήφθησαν από 59 ασθενείς με ccRCC. Για τον προσδιορισμό των συντεταγμένων οριοθέτησης των ογκολογικών δομών, εφαρμόστηκαν δύο ανιχνευτές βασισμένοι σε εκπαιδευμένα μοντέλα πολλαπλών καταρρακτών (cascades) Viola-Jones, ένας για εικόνες υψηλού ccRCC και ο άλλος για χαμηλού, αντίστοιχα. Αυτές οι συντεταγμένες επέτρεψαν την εξαγωγή επιθεμάτων εικόνας, από τις οποίες ανακτήθηκαν αριθμητικά χαρακτηριστικά με βάση το ιστόγραμμα πολικής διαβάθμισης (histogram of polar gradient - HPG), το ενισχυμένο ιστόγραμμα πολικής διαβάθμισης (enhanced histogram of polar gradient - EHPG), την ανάλυση αποκλειστικών συνιστωσών (exclusive component analysis feature - XCA) και τις ακατέργαστες εντάσεις εικονοστοιχείων (raw pixel intensities - RPI) στα πυρήνια (nucleoli) των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιώντας τα εξαγόμενα διανύσματα χαρακτηριστικών εκπαιδεύτηκαν οι αδύναμοι (weak) ταξινομητές SVM (με τιμές HPG) και Logistic Regression (με RPI) και AdaBoost (με EHPG-XCA), οι οποίοι συνδυάστηκαν σε έναν ισχυρό (strong) ταξινομητή AdaBoost. Με βάση τις ετικέτες βασικής αλήθειας που καθορίστηκαν από έναν ειδικό παθολόγο, οι κατανομές-F (F-scores) των πρώτων 400 ταξινομημένων δομών κυμαίνονταν μεταξύ 0.78 και 0.83.

Οι Tian et al. [74] επικεντρώθηκαν επίσης στην ταξινόμηση ιστολογικών δειγμάτων ccRCC σε δύο στάδια Fuhrman, χρησιμοποιώντας δεδομένα εικόνας από το αποθετήριο "The Cancer Genome Atlas" (TCGA), το οποίο περιέχει καρκινικά δείγματα από πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένων και εικόνων μικροσκοπίας RCC με χρώση H&E. Για να γίνει αυτό, εξήχθησαν μικρότερες ιστολογικές τομές από WSIs και ο χρωματικός χώρος RGB μετατράπηκε σε HSV για να τονιστούν καλύτερα τα εξωτερικά όρια των ασθενικών αντικειμένων ενδιαφέροντος. Έπειτα, τα κύτταρα ccRCC κατατμήθηκαν με παραδοσιακές τεχνικές επεξεργασίας εικόνας (προσαρμοστική καταφλίσωση, μορφολογική επεξεργασία, μετασχηματισμός λεκάνης απορροής κ.λπ.). Συνεχίζοντας, χάρη στην τεχνική Lasso Παλινδρόμησης (Lasso Regression) επιλέχθηκαν τα πιο πληροφοριακά μορφολογικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά έντασης (από τα 26 συνολικά) και τροφοδοτήθηκαν ως είσοδοι σε εποπτευόμενους αλγόριθμους, μερικοί από τους οποίους ήταν οι SVM, Random Forest και ένα Τεχνητό Νευρωνικό Δίκτυο (Artificial Neural Network - ANN). Από τα ανακτηθέντα διαγνωστικά αποτελέσματα, η

μεθοδολογική προσέγγιση παρήγαγε μέγιστη ακρίβεια ταξινόμησης 83.3%, η οποία έδειξε μια καλή συμφωνία με τις ημι-ποσοτικές αξιολογήσεις δύο παθοανατόμων.

Στους He et al. [75] εφαρμόστηκε μια μεθοδολογία για την ανάλυση ιστολογικών ανωμαλιών σε μοριακό επίπεδο σε 77 εικόνες H&E με RCC. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, συλλέχθηκαν χαρακτηριστικά από δεδομένα σήματος της φασματοσκοπίας Raman και τροφοδοτήθηκαν στους αλγόριθμους SVM, k-NN, Random Forest, AdaBoost και ANN για να διαχωριστούν τα ογκολογικά τμήματα από τους υγιείς ιστούς και τα λιποκύτταρα. Η ερευνητική ομάδα είχε επίσης στόχο να αναγνωρίσει αυτόματα διάφορους υποτύπους RCC, όπως ccRCC, pRCC, chrRCC και καρκίνωμα συλλεκτικού πόρου (collecting duct carcinoma - CDC), καθώς και τη βαθμολόγηση Fuhrman των ccRCC κυττάρων, επιλύοντας ένα πρόβλημα ταξινόμησης 2-κλάσεων, όπου οι βαθμοί Fuhrman 1 και 2 συνδυάστηκαν για να δηλώσουν το αρχικό στάδιο, ενώ οι Fuhrman 3 και 4 το προχωρημένο, αντίστοιχα. Πριν από την εκπαίδευση των μοντέλων ταξινόμησης, επιλέχθηκαν τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιώντας την προσέγγιση ορίου διακύμανσης (variance threshold) για τη μείωση των δεδομένων σήματος με χαμηλή διακύμανση. Ο SVM τελικά αναδείχθηκε ως ο βέλτιστος ταξινομητής, παράγοντας ακρίβεια διάκρισης 92.89%, μεταξύ των ογκολογικών αντικειμένων, υγιών ιστών και λιπιδίων. Επιπλέον, η μέθοδος απέδωσε ακρίβεια ταξινόμησης 86.79% και 89.53% για τους υποτύπους RCC και του βαθμού Fuhrman σε κύτταρα ccRCC, αντίστοιχα.

Οι σύγχρονες ερευνητικές μελέτες περιλαμβάνουν μεθοδολογικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν υπολογιστικά συστήματα βασισμένα σε βαθιά νευρωνικά δίκτυα για την ακριβέστερη ανίχνευση κακοήθων αλλοιώσεων που προέρχονται, στη προκειμένη περίπτωση, από ιστολογικά δείγματα νεφρού.

Οι Song et al. [76] παρουσίασαν ένα μεθοδολογικό πλαίσιο για την κατάτμηση κυττάρων και πυρηνίων σε ογκολογικά δείγματα βιοψίας διάφορων οργάνων, συμπεριλαμβανομένου ενός συνόλου δεδομένων εικόνας νεφρού από το αποθετήριο “Kidney Renal Cell Carcinoma” (KIRC). Η αυτοματοποιημένη προσέγγιση βασίστηκε στο φιλτράρισμα χαρακτηριστικών μέσω πυρήνων συνέλιξης πριν τροφοδοτηθούν σε ένα μοντέλο καταρράκτη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, εφαρμόστηκε η τεχνική αραιής παλινδρόμησης (sparse regression) για την επαναληπτική ενημέρωση της εξίσωσης των καμπυλών B-spline, έτσι ώστε οι θέσεις των περιγραμμάτων ανίχνευσης να συγκλίνουν στα πραγματικά όρια κάθε καρκινικής δομής. Η ιδέα βασίστηκε επίσης στην τεχνική ενίσχυσης της κλίσης δέντρων απόφασης (Gradient Boosting Decision Trees), για τον διαχωρισμό επικαλυπτόμενων αντικειμένων ορίζοντας τα σημεία καμπυλότητας κάθε μεμονωμένου κυττάρου. Για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, υπολογίστηκε ο συντελεστής ομοιότητας Dice μεταξύ των κατατμημένων εικονοστοιχείων και των αντίστοιχων βασικής αλήθειας από το σύνολο δεδομένων KIRC. Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν πολύ καλή απόδοση με μέσο συντελεστή Dice 0.914.

Οι Tabibu et al. [77] επικεντρώθηκαν στην αναγνώριση των καρκινικών υποτύπων ccRCC, chrRCC pRCC, καθώς και στον διαχωρισμό τους από υγιή τμήματα σε εικόνες βιοψίας νεφρού από τη βάση δεδομένων TCGA. Η αυτοματοποιημένη ανάλυση βασίστηκε αρχικά στη μεταφορά μάθησης στις προεκπαιδευμένες ResNet-18 και ResNet-34 αρχιτεκτονικές CNN με τα νέα ιστοπαθολογικά δεδομένα. Στη συνέχεια, με την εφαρμογή μιας τιμής κατωφλίου στα εικονοστοιχεία των WSIs, οι ογκολογικές περιοχές ενδιαφέροντος εξήχθησαν με τη μορφή υποπαραθύρων εικόνας πριν τροφοδοτηθούν στο επίπεδο εισόδου των CNN. Όσον αφορά τις πρώιμες δοκιμές της μεθόδου, το βέλτιστο ResNet-18 μοντέλο παρήγαγε χαμηλή ακρίβεια ταξινόμησης 87.69%. Για να αυξηθεί η απόδοση των βαθμών ταξινόμησης, το πρόβλημα αναγνώρισης πολλαπλών κλάσεων μετατράπηκε σε επιμέρους δυαδικά αντικαθιστώντας την τελική συνάρτηση softmax με πολλαπλούς ταξινομητές SVM εντός ενός κατευθυνόμενου ακυκλικού γραφήματος (Directed Acyclic Graph – DAG). Ως εκ τούτου, χάρη στην υβριδική προσέγγιση “CNN-DAGSVM”, η ακρίβεια ταξινόμησης μεταξύ υγιών από ογκολογικών τμημάτων έφτασε το 93.39% με το ResNet-18 και το 87.34% με το ResNet-34. Επιπλέον, η ακρίβεια διαχωρισμού των τριών υποτύπων καρκίνου ήταν ίση με 94.07%.

Οι Fenstermaker et al. [78] κατασκεύασαν μια νέα τοπολογία CNN για τη διάκριση μεταξύ ιστολογικών δειγμάτων RCC και καλοήθων, καθώς και για την αναγνώριση υποτύπων RCC (ccRCC, chrRCC και pRCC) και βαθμού Fuhrman (1-4) του ccRCC. Προκειμένου η μέθοδος να γενικεύσει σε νέα δείγματα φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων, εικόνες από το σύνολο δεδομένων TCGA χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εκπαίδευσης και υποβλήθηκαν σε διάφορους τυχαίους γεωμετρικούς μετασχηματισμούς, όπως περιστροφή και αναστροφή στα επίπεδα συνέλιξης του βαθμού CNN. Για τη διάκριση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων αντικειμένων, εφαρμόστηκε ένα δυαδικό επίπεδο εξόδου με τη σιγμοειδή συνάρτηση ενεργοποίησης, ενώ για την ταξινόμηση του υποτύπου RCC ή του βαθμού Fuhrman ccRCC, υπολογίστηκε η κατηγορηματική ετικέτα κλάσης χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση ενεργοποίησης softmax. Το νέο CNN μοντέλο παρήγαγε ακρίβεια 99.1% κατά τη διάκριση του φυσιολογικού παρεγχύματος από τον καρκινογενή ιστό, ενώ κατά την ταξινόμηση των υποτύπων RCC και του βαθμού Fuhrman ήταν ισοδύναμη με 97.5% και 98.4%, αντίστοιχα.

Οι Lu et al. [79] πρότειναν τη βασισμένη στη βαθιά μάθηση μέθοδο “CLAM” για την αυτοματοποιημένη αναγνώριση υποτύπων καρκινώματος (ccRCC, chrRCC και pRCC) στα νεφρικά κύτταρα, πέρα από τη διάκριση φυσιολογικού-ογκολογικού ιστού στις WSIs του συνόλου δεδομένων TCGA. Η αρχική φάση της διαδικασίας περιλάμβανε την κατάτμηση των ιστολογικών περιοχών χρησιμοποιώντας κλασικές τεχνικές επεξεργασίας εικόνων, όπως κατωφλίωση στο κανάλι κορεσμού, θόλωση με ένα διάμεσο φίλτρο για εξομάλυνση των ακμών και πλήρωση κενών και οπών με τον μορφολογικό τελεστή κλεισίματος. Μετά την εξαγωγή της δυαδικής μάσκας η ανιχνευθείσα ιστολογική περιοχή χωρίστηκε σε επιθέματα εικόνας. Αυτά στη συνέχεια εισήχθησαν στο μοντέλο ResNet50 CNN για την εκτέλεση κατάτμησης

στιγμιότυπων (instance segmentation) και την εξαγωγή χαρτών θερμότητας για την επισήμανση των μορφολογικών χαρακτηριστικών με υψηλή διαγνωστική αξία. Τέλος, ακολούθησε ομαδοποίηση των τιμών των χαρτών για τον δυαδικό διαχωρισμό υγιών-αλλοιωμένων ιστολογικών τμημάτων και των διάφορων υποτύπων καρκίνου. Συμπερασματικά, η μέθοδος παρήγαγε υψηλή απόδοση με ROC-AUC > 0.95 τόσο στις δυαδικές ταξινομήσεις όσο και στην ταυτοποίηση υποτύπων RCC.

Οι Safarpour et al. [80] παρουσίασαν επίσης μια προσέγγιση βαθιάς μάθησης για την αναγνώριση υποτύπων RCC (ccRCC, chrRCC και pRCC) στις WSIs του δημοσίου διαθέσιμου συνόλου δεδομένων TCGA. Αυτό επιτεύχθηκε εξετάζοντας πρώτα τα όρια της ιστολογικής περιοχής σε κάθε δείγμα και τροφοδοτώντας την στο μοντέλο DenseNet-121 με τη μορφή επιθεμάτων εικόνας για την ανίχνευση των κακοήθων σχηματισμών. Επιπλέον, κανονικοποιώντας τις χρωματικές διακυμάνσεις σε μεγέθυνση $2.5\times$ των δειγμάτων H&E, το CNN μοντέλο μπόρεσε να εμβαθύνει σε λεπτομέρειες τόσο σε επίπεδο δομής όσο και σε επίπεδο υψής για κάθε δομή RCC με χαμηλό υπολογιστικό κόστος. Σύμφωνα με τους εξαγόμενους χάρτες ενεργοποίησης των χαρακτηριστικών συνέλιξης (convolution activation map - CAM), το βαθύ μοντέλο επικεντρώθηκε με επιτυχία στα ασθενικά μοτίβα, έχοντας ως αποτέλεσμα κατανομές-F1 ≤ 0.95 κατά την ταξινόμηση των υποτύπων RCC στις εικόνες βιοψίας.

Ομοίως, οι Zhu et al. [81] χρησιμοποίησαν ένα βαθύ CNN για την ταξινόμηση του RCC στις κατηγορίες ccRCC, pRCC, crRCC και ROnc σε ψηφιοποιημένες διαφάνειες βιοψίας και χειρουργικής εκτομής από το σύνολο δεδομένων TCGA. Για την αναγνώριση κάθε κακοήθους δομής, το ιστολογικό τμήμα εξήχθη από το φόντο του, χωρίστηκε σε επιθέματα εικόνας και εισήχθη στην αρχιτεκτονική ResNet-18. Για να προσδιοριστεί η ιδανική τιμή κατωφλίου για τις πιθανότητες πρόβλεψης του βαθύ μοντέλου και να απορριφθούν ταξινομήσεις με χαμηλότερες βαθμολογίες εμπιστοσύνης, εφαρμόστηκε η τεχνική βελτιστοποίησης αναζήτησης πλέγματος (Grid-search) σε στατιστικές ιδιότητες των επιθεμάτων εικόνας. Συμπερασματικά, οι μέσες τιμές ROC-AUC για την ταξινόμηση των WSIs κυμαίνονταν από 97% έως 98%.

Στους Bidgoli et al. [82] παρουσιάστηκε μια μέθοδος εξελικτικής βελτιστοποίησης σε ένα βαθύ νευρωνικό δίκτυο για τον ακριβή χαρακτηρισμό υποτύπων καρκίνου σε WSIs του αποθετηρίου TCGA, συμπεριλαμβανομένων βιοψιών νεφρού σε ccRCC, chrRCC και pRCC. Αρχικά, κάθε διαφάνεια βιοψίας προβλήθηκε σε μεγέθυνση $20\times$ και χωρίστηκε σε επιθέματα εικόνας. Στη συνέχεια η αρχιτεκτονική KimiaNet χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή τιμών χαρακτηριστικών από τα ακατέργαστα δεδομένα εικόνας. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, το συγκεκριμένο μοντέλο ήταν η πιο ιδανική επιλογή, λόγω του ότι είχε προηγουμένως εκπαιδευτεί με δείγματα ιστοπαθολογίας. Το επόμενο βήμα ήταν μια στοχαστική αναζήτηση

με τον αλγόριθμο k-NN, με σκοπό την εύρεση μιας νέας γενιάς πιο πληροφοριακών χαρακτηριστικών. Για να αξιολογηθεί η βέλτιστη απόδοση ταξινόμησης στις WSIs με το νέο υποσύνολο, καθορίστηκε η υψηλότερη κατανομή-F1 με την τεχνική συνόρου Pareto (Pareto front). Συγκεκριμένα, η μέση κατανομή-F1 της εξελικτικής μεθόδου ήταν 93.23%, καταδεικνύοντας μια αύξηση 11.96% στην απόδοση ταξινόμησης σε σχέση με τα αρχικά εξαγόμενα χαρακτηριστικά του μοντέλου KimiaNet.

Οι DiPalma et al. [83] πρότειναν μια μεθοδολογία βασισμένη στην απόσταξη γνώσης (knowledge distillation) για την ταξινόμηση των υποτύπων καρκίνου σε εικόνες ιστολογίας, συμπεριλαμβανομένων των ccRCC, pRCC και crRCC στο σύνολο δεδομένων TCGA-RCC. Πιο συγκεκριμένα, ένα υπολειμματικό νευρωνικό δίκτυο (ResNet), ως το μοντέλο δασκάλου, εκπαιδεύτηκε με επισημειωμένες εικόνες μεγαλύτερης ανάλυσης και στη συνέχεια οι γνώσεις του μεταφέρθηκαν σε ένα μοντέλο μαθητή με την ίδια αρχιτεκτονική όπου εκπαιδεύτηκε ταυτόχρονα με εικόνες χαμηλότερης ανάλυσης. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι τα δείγματα προβλήθηκαν σε χαμηλότερες μεγεθύνσεις $5\times$ και $10\times$, αντί των αρχικών $20\times$ και $40\times$ στο TCGA, επιτρέποντας στο μοντέλο δασκάλου να εκπαιδευτεί σε σημαντικά μικρότερο χρονικό διάστημα (έως και 16 φορές). Το ίδιο ισχύει και για το μοντέλο μαθητή, του οποίου ο χρόνος εκπαίδευσης ήταν 4 φορές μικρότερος από αυτόν του δασκάλου. Τα ευρήματα έδειξαν ότι η απόδοση του δασκάλου στην ταξινόμηση του υποτύπου RCC είχε τιμές ακρίβειας, κατανομής-F1, πιστότητας και ανάκλησης 90.16%, 80.09%, 78.54% και 85.19%, αντίστοιχα. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kullback-Leibler, παρατηρήθηκε απόκλιση στα αποτελέσματα ταξινόμησης δασκάλου-μαθητή της τάξης του 1%, γεγονός που απέδειξε την εγκυρότητα της μεθοδολογίας.

Στη μελέτη των Haeyeh et al. [84] εφαρμόστηκε ένα εργαλείο βαθιάς μάθησης για τη διάκριση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων περιοχών RCC, καθώς και για την ταξινόμηση του υποτύπου καρκίνου σε ccRCC και pRCC σε μικροσκοπικές εικόνες βιοψίας H&E. Το πρώτο στάδιο της μεθόδου είχε ως στόχο να μειώσει τις έντονες διακυμάνσεις στα εικονοστοιχεία των WSIs, αντιστοιχίζοντας το ιστόγραμμα RGB στον χρωματικό χώρο του Lab, κανονικοποιώντας τις τιμές της έντασης του και στη συνέχεια μετατρέποντας το ξανά σε μορφή RGB. Ακολούθως, τρεις αρχιτεκτονικές ResNet-50 CNN εκπαιδεύτηκαν με ομόκεντρα επικαλυπτόμενα επιθέματα εικόνας διαφορετικής κλίμακας, συγκεκριμένα 400×400 , 200×200 και 100×100 , έτσι ώστε να διατηρηθεί η συνδεσιμότητα των ιστολογικών τμημάτων. Στο τέλος, οι προβλέψεις των βαθέων μοντέλων συνδυάστηκαν σε μια μέθοδο ψηφοφορίας για τον προσδιορισμό της κλάσης πλειονότητας για κάθε επίθεμα εικόνας. Με βάση αυτούς τους χαρακτηρισμούς, διαγνώστηκε και η παθολογική κατάσταση για κάθε διαφάνεια βιοψίας. Ως αποτέλεσμα, το νέο σύστημα είχε συνολική ακρίβεια $93.0\% \pm 4.9\%$, ευαισθησία $91.3\% \pm 10.7\%$ και ειδικότητα $95.6\% \pm 5.2\%$ στη διάκριση μεταξύ καλοήθων, ccRCC και pRCC ιστολογικών δειγμάτων.

Στην μελέτη των Nasir et al. [85] περιεγράφηκε ένα μεθοδολογικό πλαίσιο για την πρόβλεψη του σταδίου (1-3) του νεφροκυτταρικού καρκινώματος σε ιστολογικά δείγματα μικροσκοπίας, ενσωματώνοντας μοντέλα βαθιάς μάθησης και τεχνολογίες ασφάλειας Blockchain σε μια διαγνωστική πλατφόρμα βασιζόμενη στο σύννεφο. Συγκεκριμένα, η μέθοδος ανάλυσης εικόνων περιλάμβανε μεταφορά μάθησης στο μοντέλο AlexNet για την προσαρμογή του στο νέο ιστοδιαγνωστικό πρόβλημα. Για να εξισορροπηθεί το σύνολο εκπαίδευσης και να βελτιωθεί η ακρίβεια ταξινόμησης του βαθύου CNN, τα δείγματα εικόνων υποβλήθηκαν σε τεχνικές επαύξησης, όπως κλιμάκωση, αναστροφή, καθώς επίσης ενίσχυση αντίθεσης και βελτίωση φωτεινότητας εικονοστοιχείων. Για την εύρεση της βέλτιστης απόδοσης ταξινόμησης στα ασθενικά δεδομένα, η βαθιά αρχιτεκτονική εκπαιδεύτηκε με τους αλγόριθμους οπισθοδιάδοσης σφάλματος Adam, SGDM και RMSprop. Ως αποτέλεσμα, ο SGDM βρέθηκε να είναι ο βέλτιστος αλγόριθμος εκπαίδευσης για το AlexNet, καθώς παρήγαγε την υψηλότερη ακρίβεια δοκιμής, τόσο με επαύξηση (99.8%) όσο και χωρίς επαύξηση (99.2%) των δεδομένων εικόνων.

Οι Oner et al. [86] πρότειναν μια μέθοδο βαθιάς μάθησης για την πρόβλεψη της αναλογίας των καρκινικών κυττάρων σε αποκομμένες ιστολογικές περιοχές από WSIs διαφόρων οργάνων, συμπεριλαμβανομένων βιοψιών νεφρού από το αποθετήριο TCGA. Χωρίς τη μεσολάβηση χειροκίνητων επισημειώσεων για την εκπαίδευσή του, το μοντέλο ταξινόμησης σχεδιάστηκε για να λαμβάνει έναν σάκο (bag) με επιθέματα εικόνων από περιοχές ενδιαφέροντος και να εξάγει διανύσματα χαρακτηριστικών από αυτές. Προκειμένου να εκτιμηθεί το ποσοστό κακοήθους διήθησης σε κάθε δείγμα δοκιμής, οι χάρτες κατάτμησης των καρκινικών τμημάτων διαχωρίστηκαν από τους αντίστοιχους των υγιών εκτελώντας μια ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) στα εξαγόμενα διανύσματα χαρακτηριστικών. Συνοψίζοντας, η προτεινόμενη μέθοδος διαχώρισε επιτυχώς τα ογκολογικά δείγματα από τα καλοήγη με τιμές $AUC \geq 0.927$. Για τις εικόνες νεφρικού καρκινώματος, η απόδοση ταξινόμησης παρήγαγε τιμή ROC-AUC 0.999 (95% CI, 0.997-1.000).

Οι Wang et al. [87] ανέπτυξαν μια νέα μεθοδολογική προσέγγιση αυτοεποπτευόμενης μάθησης (self-supervised learning - SSL), ονομαζόμενη ως σημασιολογικά-σχετική αντικρουόμενη μάθηση (semantically-relevant contrastive learning - SRCL), για την ταξινόμηση των υποτύπων RCC (ccRCC, pRCC και crRCC) σε WSIs της βάσης δεδομένων ογκολογίας TCGA. Χαρακτηριστικό της SRCL είναι η σύγκριση δειγμάτων με παρόμοιες χωρικές αναπαραστάσεις, που οδηγεί στην αύξηση της ποικιλομορφίας τους και στην εξόρυξη πρόσθετων σημασιολογικών χαρακτηριστικών. Για να επιτευχθεί αυτό, κάθε WSI χωρίστηκε αρχικά σε επιθέματα εικόνων, τα οποία τροφοδοτήθηκαν στο υβριδικό βαθύ μοντέλο “CTransPath” για σκοπούς εκπαίδευσης και δοκιμής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ένα συνελικτικό νευρωνικό δίκτυο ενσωματώθηκε σε μια αρχιτεκτονική Swin Transformer, για την εκμάθηση ιεραρχικών χαρακτηριστικών σε αναπαραστάσεις διαφορετικής κλίμακας. Η διαδικασία εκπαίδευσης περιλάμβανε επίσης τη χρήση τεχνικών επαύξησης εικόνων, συμπεριλαμβανομένης

της τυχαίας περικοπής, της Γκαουσιανής θόλωσης και της μετατόπισης των καναλιών απόχρωσης (hue) και κορεσμού (saturation) στον χρωματικό χώρο HSV, για τη βελτίωση της ικανότητας του CTransPath να διακρίνει καρκινικές δομές ενδιαφέροντος. Συνοπτικά, η νέα μέθοδος ξεπέρασε τα υπερσύγχρονα εργαλεία ταξινόμησης εικόνων TCGA-RCC, με ακρίβεια 0.967 και ROC-AUC 0.991.

2.2 Βάσεις Δεδομένων Ιστολογικών Εικόνων Μικροσκοπίας

Το τμήμα Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων περιλαμβάνει ένα διεθνές δίκτυο συνεργασιών με ιδρύματα όπως το Imperial College Healthcare NHS Trust του Λονδίνου και το Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης, το οποίο έχει επιφέρει νέες ερευνητικές ιδέες για την παρακολούθηση και θεραπεία ασθενειών σε διάφορα όργανα. Επιπλέον, το Εργαστήριο Αλληλεπίδρασης Ανθρώπου Υπολογιστή (HCILAB) του τμήματος Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών έχει εξοπλιστεί με τον μικροσκοπικό σαρωτή Hamamatsu NanoZoomer S210 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Ιαπωνία). Το συγκεκριμένο ιατρικό εργαλείο έχει συμβάλλει σημαντικά στην ψηφιοποίηση χορηγούμενων ιστολογικών δειγμάτων βιοψίας από παθολογοανατομικές κλινικές και στην αύξηση του συνόλου δεδομένων εικόνων για την ανάπτυξη λογισμικών διάγνωσης.

2.2.1 Βάση δεδομένων μη-αλκοολικής λιπώδους ηπατικής νόσου

Η μη αλκοολική λιπώδης ηπατική νόσος (NAFLD) εκτιμάται ότι είναι η πιο κοινή χρόνια ηπατική πάθηση, με το ένα τέταρτο του ενήλικου πληθυσμού να πάσχει από αυτήν [88]. Η παρουσία της χαρακτηρίζεται από σημαντικές ενδείξεις ηπατικής στεάτωσης, ως η συσσώρευση καλοήθων λιποκυττάρων στον ηπατικό ιστό ως αποτέλεσμα παραγόντων του μεταβολικού συνδρόμου όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η δυσλιπιδαιμία [89].

Σε υψηλότερους βαθμούς, η NAFLD παίρνει μια πιο επιθετική μορφή γνωστή ως μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH), η οποία προκαλεί ένα χρόνια φλεγμονώδες περιβάλλον και είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για ηπατοκυτταρική διόγκωση, προοδευτική ηπατική ίνωση και κίρρωση τελικού σταδίου [90]. Επιπλέον, ένα μέρος ασθενών με NASH συνήθως υποβάλλεται σε μεταμόσχευση ήπατος λόγω επιπλοκών που προκαλούνται από πυλαία υπέρταση, ηπατική ανεπάρκεια και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [91]. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, ο επιπολασμός της NASH θα φτάσει τα 18 εκατομμύρια άτομα μέχρι το 2027 παγκοσμίως, κυρίως στις ΗΠΑ, την Ιαπωνία και την ΕΕ [92], καθώς τα ελάχιστα ιστολογικά κριτήρια για τη διάγνωσή της περιλαμβάνουν $\geq 5\%$ ηπατική στεάτωση, λοβιακή φλεγμονή και διόγκωση ηπατοκυττάρων χωρίς καμία ένδειξη ηπατοκυτταρικής βλάβης.

Η στεάτωση στις NAFLD-NASH, είναι ως επί το πλείστον μακροφουσαλιδώδης, με μεμονωμένα και μεγάλα λιπιδικά ενδοκυτταροπλασματικά κενοτόπια να προκαλούν εκτοπισμό των κυτταρικών πυρήνων. Περιστασιακά, μπορεί να παρατηρηθεί μικροφουσαλιδώδης στεάτωση με μικρότερα κενοτόπια μέσα στο κυτταρόπλασμα, καθώς και περιοχές συσσωμάτωσης μακροφουσαλιδώδους στεάτωσης. Αντίθετα, η ηπατοκυτταρική διόγκωση (hepatocellular ballooning), ή διαφορετικά η αεροσφαιροειδής εκφύλιση των ηπατοκυττάρων, χαρακτηρίζεται από διευρυμένα κύτταρα που περιβάλλονται από ένα διαυγές και κενοτοπικό κυτταρόπλασμα [93]. Επίσης, επειδή σχετίζεται στενά με τη προχωρημένη ηπατική ίνωση, αποτελεί το επίκεντρο του κλινικού ενδιαφέροντος των ερευνητών ιατρών [94, 95].

Για την αυτοματοποιημένη παρακολούθηση της ηπατικής νόσου στο πλαίσιο της διδακτορικής έρευνας, χρησιμοποιείται ένας μέγιστος αριθμός 41 διαφανειών χορηγούμενων από το θυγατρικό νοσοκομείο St. Mary του Πανεπιστημίου Imperial. Αυτό το σύνολο αποτελείται από ιστολογικά δείγματα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, η οποία έχει εκδηλωθεί ως NAFLD. Σύμφωνα με την οπτικές εκτιμήσεις των ιατρών, ένα μέρος των δειγμάτων ($n = 28$) εμφανίζει υψηλό βαθμό στεάτωσης, ενώ το υπόλοιπο ($n = 13$) υψηλότερα ποσοστά ηπατοκυτταρικής διόγκωσης, γεγονός που υποδηλώνει την εξέλιξη της νόσου σε χρόνια μορφή NASH.

Βασικό χαρακτηριστικό των παρεχόμενων διαφανειών είναι η συμπερίληψη ενός ή περισσότερων ιστολογικών δειγμάτων αποκτών με την επεμβατική μέθοδο της βελόνας βιοψίας. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η συγκεκριμένη τεχνική δειγματοληψίας θεωρείται λειτουργική, καθώς επιτρέπει την αποτελεσματική εφαρμογή μιας μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της εξάπλωσης των NAFLD-NASH αλλοιώσεων στην ψηφιοποιημένη ιστολογική περιοχή. Επίσης, επιλέχθηκε η χρώση H&E για να αναδείξει τις διαφορές των εξεταζόμενων παθολογικών ευρημάτων από τις υγιείς ανατομικές δομές. Τονίζεται ότι όλοι οι ασθενείς έδωσαν τη γραπτή συγκατάθεσή τους για τη ένταξη των δειγμάτων τους σε ερευνητικές μελέτες, οι οποίες διεξήχθησαν σύμφωνα με τους κανόνες της Διακήρυξης του Ελσίνκι (αναθεωρημένη το 2013).

Η ψηφιοποίηση των διαφανειών πραγματοποιήθηκε με έναν μικροσκοπικό σαρωτή της εταιρείας Hamamatsu, όπου αρχικά είχε διαστάσεις που ξεπερνούσαν τα $10,000 \times 10,000$ εικονοστοιχεία. Αυτό κατέστησε σημαντική τη μείωση της μείωση της δειγματοληψίας τους με μεγεθύνσεις αντικειμενικού φακού $20\times$ και $40\times$ και την εφαρμογή του προτύπου απώλεστικής συμπίεσης εικόνων (joint photographic experts group - JPEG) για τη μείωση του μεγέθους αποθήκευσης και του χρόνου φόρτωσης. Αυτός αποδείχτηκε ο καλύτερος τρόπος για να διατηρηθούν τα ανατομικά χαρακτηριστικά που συνθέτουν τις ασθενικές δομές στους ιστούς και, τελικά, να επιτευχθεί η βέλτιστη κατανομή της επεξεργαστικής ισχύος και των πόρων μνήμης κατά την εκτέλεση του διαγνωστικού λογισμικού.

2.2.2 Βάση δεδομένων μη-αλκοολικής λιπώδους παγκρεατικής νόσου

Η μη αλκοολική λιπώδης παγκρεατική νόσος (NAFPD), όπως η επιδημιολογία της NAFLD, είναι ένα φαινόμενο που σχετίζεται έντονα με την παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος ιατρικός όρος που υποδηλώνει την ανάπτυξη παγκρεατικής στεάτωσης, μιας διαταραχής κατά την οποία μη-εστεροποιημένα λιπαρά οξέα διεισδύουν στον παγκρεατικό ιστό, προκαλώντας την εκτόπιση των αικινικών κυττάρων και τη μόνιμη αντικατάστασή τους από σταγονίδια λίπους [96].

Η λεπτομερής παρακολούθηση της εξέλιξής της περιλαμβάνει ένα διαγνωστικό πρόβλημα που απασχολεί ολοένα και περισσότερο τους κλινικούς ιατρούς, καθώς η αυξημένη συσσώρευση λίπους μπορεί να οδηγήσει σε γενικευμένη αθηροσκληρώση (ασυμπτωματική βλάβη των αρτηριών), σοβαρή οξεία παγκρεατίτιδα, αλλά και σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [97–99]. Από τις αρχές του τρέχοντος αιώνα, δημοσιευμένες μελέτες έχουν τονίσει ότι η ιστολογική φλεγμονή, ως επέκταση της NAFPD, αποτελεί το σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων και τελικού σταδίου καρκίνου του παγκρέατος, όπου ο γενετικός μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως [100, 101].

Ωστόσο, οι αυτοματοποιημένες μέθοδοι υπολογιστικής όρασης δεν έχουν ακόμη εφαρμοστεί εκτενώς στις ιστολογικές εικόνες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η παγκρεατική βιοψία είναι μια αυστηρά υπεύθυνη επεμβατική διαδικασία για τους χειρουργούς, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές για τον ασθενή, όπως αιμορραγία και παγκρεατική φίστουλα, ως η μη-ομαλή επικοινωνία του παγκρέατος με άλλα όργανα [102]. Βάσει αυτού, αναμένεται ότι στο μέλλον και με τη χρήση ρομποτικών μεθόδων, για τη μείωση της επεμβατικής φύσης της μεθόδου βιοψίας, θα παρουσιαστούν νέα υπολογιστικά εργαλεία για τη μικροσκοπική αξιολόγηση της NAFPD.

Για την ανάπτυξη των μεθοδολογιών ποσοτικοποίησης της στεάτωσης NAFPD, χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα παγκρεατικής βιοψίας H&E από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης. Πρόκειται για χειρουργικά δείγματα που ελήφθησαν από ασθενείς με οξεία ή χρόνια παγκρεατίτιδα και με διάφορους βαθμούς στεάτωσης που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση παγκρέατος. Όπως και με τα δείγματα ηπατικής νόσου, οι διαφάνειες βιοψίας έχουν σαρωθεί σε μεγέθυνση αντικειμενικού φακού 20× και έχουν εξαχθεί σε μορφή αρχείου εικόνας JPEG.

2.2.3 Βάση δεδομένων νεφροκυτταρικού καρκινώματος

Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες κακοήθειες του ουροποιητικού συστήματος, το οποίο έχει διάφορους παράγοντες κινδύνου, όπως η παχυσαρκία, η υψηλή αρτηριακή πίεση και τα κληρονομικά σύνδρομα [103]. Το RCC ευθύνεται για περισσότερο από το 90% των κακοηθειών των νεφρών και το 2% των διαγνώσεων καρκίνου και των θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο παγκοσμίως [104]. Περιλαμβάνει περισσότερους από 10 διαφορετικούς ιστολογικούς και μοριακούς υποτύπους, ο πιο διαδεδομένος από τους οποίους είναι το διαυγοκυτταρικό νεφρικό καρκίνωμα (ccRCC). Ακόμη πιο αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η πλειονότητα των θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο του νεφρού παγκοσμίως έχουν συνδεθεί με ccRCC, ενώ το 30% των ασθενών με ccRCC που υποβάλλονται σε νεφρεκτομή αναπτύσσουν μεταστάσεις, οι οποίες σχετίζονται ομοίως με υψηλή και αυξανόμενη θνησιμότητα.

Μικροσκοπικά, το ccRCC αποτελείται συχνά από μεγάλα, ομοιόμορφα καρκινικά κύτταρα με διαυγές, πλούσιο σε γλυκογόνο και λίπος κυτταρόπλασμα και διασυνδεδεμένα με ένα ευρύ αγγειακό δίκτυο. Σε ορισμένες περιπτώσεις ccRCC, ένα τμήμα καρκινικών κυττάρων με ποικίλες ποσότητες κοκκώδους ηωσινόφιλου κυτταροπλάσματος μπορεί επίσης να αποτελεί ολόκληρη τη μάζα του όγκου [104, 105].

Πρέπει να αναφερθεί ότι η ακριβής ανίχνευση του RCC βοηθά στην αποτελεσματική αντιμετώπισή του με μερική ή ριζική νεφρεκτομή ή παραδοσιακή χημειοθεραπεία σε περιπτώσεις μεταστατικού RCC. Επίσης, την τελευταία δεκαετία, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη χρήση στοχευμένων αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία του μεταστατικού RCC, καθιστώντας την έγκαιρη διάγνωσή του με σύγχρονα συστήματα υπολογιστικής όρασης ένα υψίστης σημασίας έργο [104].

Για την αξιολόγηση της μεθόδου διάγνωσης ccRCC που παρουσιάζεται στη διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν 31 ιστολογικά δείγματα νεφρού που ελήφθησαν από ανθρώπινους δότες στην Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων Γ. Χατζηκώστα. Αναφέρονται σε περιπτώσεις με ημι-ποσοτικά διαγνωσμένο Fuhrman σταδίου 1 έως 3 ccRCC, ενώ δεν υπήρχε ασθενής με στάδιο Fuhrman 4 κατά την περίοδο συλλογής των δειγμάτων. Υπάρχουν δείγματα για καθε ένα από τα τρία στάδια Fuhrman που, σύμφωνα με τις παθολογικές εξετάσεις, είναι υλικό μερικής και ριζικής νεφρεκτομής. Ωστόσο, η πλειοψηφία τους ελήφθη με διαδερμική βιοψία και βελόνα βιοψίας. Όλοι οι εξαγόμενοι ιστοί χρωματίστηκαν με H&E, καθώς έχει αναδειχθεί ως το χρυσό πρότυπο στην ιστοπαθολογική διάγνωση των υποτύπων RCC τα τελευταία χρόνια. Τέλος, οι διαφάνειες βιοψίας σαρώθηκαν με το μικροσκοπικό σαρωτή Hamamatsu NanoZoomer S210 στο εργαστήριο HCILAB σε μεγέθυνση αντικειμενικού φακού 40× για να διατηρηθούν όσο το δυνατόν περισσότερες κυτταροπλασματικές και πυρηνικές λεπτομέρειες στα ογκολογικά τμήματα.