

Maruša Jerše^{1*}, Ana Rebeka Kamšek^{1*}, Danica Stojanović², Ema Ahačič³,
Jurij Nastran⁴, Matija Milanič⁵, Jože Pižem⁶

Razvoj programske opreme za digitalno analizo histopatoloških vzorcev uvealnega melanoma

Software Development for the Digital Analysis of Pathological Uveal Melanoma Samples

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: uvealni melanom, digitalna patologija, programska oprema, digitalizacija, strojno učenje

IZHODIŠČA. Uvealni melanom je rak, ki se razvije iz melanocitov srednje očesne ovojnice. Diagnozo uvealnega melanoma postavimo na podlagi kliničnega pregleda in UZ-preiskave očesa ter jo potrdimo s histopatološko preiskavo. Z razvojem tehnologije se odpirajo nove možnosti za delo s histopatološkimi preparati. Naša hipoteza je bila, da lahko napišemo program, ki bo samodejno dovolj natančno določil tipe tkiv na sliki, in da ta program lahko vključimo v programsko opremo za delo s slikami preparatov. **METODE.** Proučevani vzorec je vseboval 16 slik preparatov uvealnega melanoma, ki smo jih naložili na strežnik odprtega mikroskopskega okolja (angl. *Open Microscopy Environment*, OMERO). V okolju OMERO smo na slikah ročno označili posamezna tkiva in napisali model za prepoznavo tkiv, ki deluje po principu metod strojnega učenja. Na podlagi slik z ročno označenimi tkivi model pripravi lastne kriterije za razvrščanje tkiv. **REZULTATI.** Naš rezultat je postavitve programskega okolja za delo z digitaliziranimi slikami preparatov ter model, ki s 85-% točnostjo razvrsti različna tkiva na slikah preparatov. **RAZPRAVA.** Odpirajo se nove možnosti prikaza slik preparatov, avtomatskega označevanja slik, postavljanje najverjetnejše diagnoze in opredeljevanje napovednih dejavnikov, kar bi lahko nadalje olajšalo delo patologov in izboljšalo zdravljenje bolnikov.

* Avtorici si delita mesto prvega avtorstva.

¹ Maruša Jerše, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

¹ Ana Rebeka Kamšek, mag. fiz., Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Jadranska ulica 19, 1000 Ljubljana

² Danica Stojanović, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; danicastojanovic704@gmail.com

³ Ema Ahačič, dr. med., Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva cesta 2, 1000 Ljubljana

⁴ Jurij Nastran, štud. rač. in inf., Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani, Večna pot 113, 1000 Ljubljana

⁵ Doc. dr. Matija Milanič, Oddelek za fiziko, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Jadranska ulica 19, 1000 Ljubljana

⁶ Izr. prof. dr. Jože Pižem, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: uveal melanoma, digital pathology, software, digitalization, machine learning

BACKGROUND. Uveal melanoma is a malignant tumor that originates from the melanocytes of the eye's middle layer. Diagnosis is made clinically, with an eye ultrasound, and confirmed by histopathological examination. Technological developments are opening new possibilities for working with histopathological samples. We hypothesized that we could develop computer software, which would automatically classify tissues observed in an image. **METHODS.** The studied sample consisted of 16 images of uveal melanoma slides, which were uploaded to the Open Microscopy Environment server. We manually labeled different types of tissues present in the images and wrote a model to automatically segment the tissues by learning from our examples. The model is based on machine learning methods. Based on the manual tissue classification, the model developed its own criteria for tissue classification. In a new image, the model uses the developed criteria, recognizes the tissues, and labels them. **RESULTS.** We implemented a software environment for processing digitized images and developed a model that classifies different tissues with an 85% accuracy. **DISCUSSION.** New possibilities for processing histological images, providing the most relevant diagnosis or predicting prognosis could ease the diagnostic process and improve patient treatment.

IZHODIŠČA

Uvealni melanom

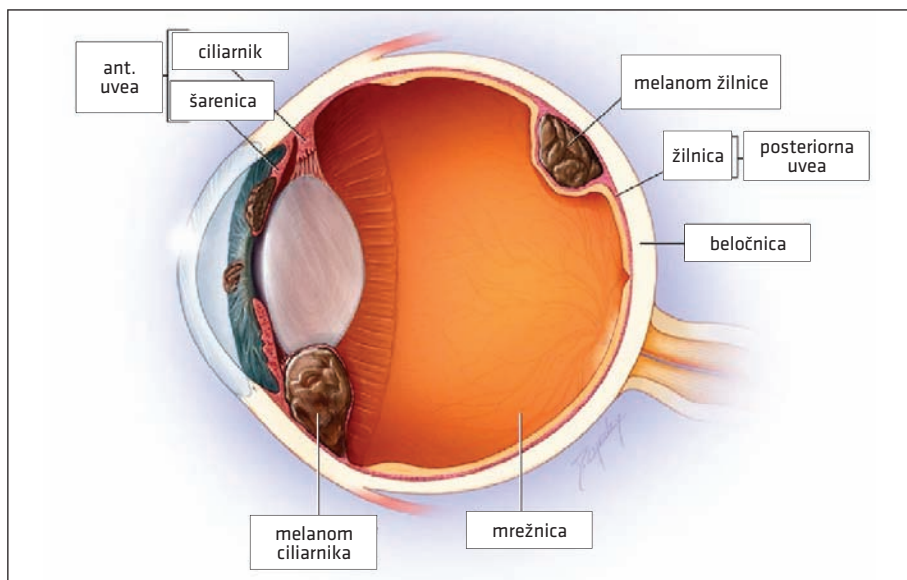
Uvea je žilna, srednja očesna ovojnica, ki jo sestavljajo šarenica, ciliarnik in žilnica. Melanom uvee, prikazan na sliki 1, se razvije iz melanocitov uvee, ki nastanejo iz celic nevralnega grebena (1, 2). Je najpogostejši primarni maligni tumor očesa pri odraslih (3). Najpogostejši so melanomi žilnice (85–90 %) (4). Večji melanomi žilnice so kupolaste ali gobaste oblike, saj se z rastjo tumorja relativno šibka Bruchova membrana napne in počí, tumor pa raste skozi razpoko pod mrežnico (5, 6). Mrežnica okrog tumorja lahko odstopi zaradi kopičenja eksudata med mrežnico in pigmentnim epitelijem mrežnice (6). Redkejši so melanomi ciliarnika (5–8 %) in šarenice (3–5 %) (4). Melanomi šarenice imajo ugodnejši potek z manjšo verjetnostjo zasevkov (2, 3). Navadno so diagnosticirani relativno majhni in pri mlajših bolnikih, 10–20 let prej kot melanomi žilnice (5, 6).

Epidemiologija

Srednja starost ob postavitvi diagnoze je približno 62 let (4). Incidenca je višja pri moških in v Evropi raste od juga z incidenco $< 2/1.000.000$ proti severu z incidenco $> 8/1.000.000$ (7, 8). V Sloveniji se bolezen pojavlja z incidenco 7,8/1.000.000 za moške in 7,4/1.000.000 za ženske (9). Kljub napredku pri diagnosticiranju in zgodnjemu zdravljenju melanoma uvee se stopnja preživetja ni izboljšala in se ne spreminja zadnjih 50 let. Smrtnost zaradi melanoma uvee je 35 % v petih in 50 % v desetih letih od postavitve diagnoze (3).

Dejavniki tveganja

Dovzetnejši za razvoj melanoma uvee so posamezniki s svetlo kožo, svetlimi lasmi ter modro ali zeleno barvo oči (5). Izmed vseh melanomov uvee je družinskih 0,6 %. Pogosteje se razvije v sklopu sindromov *xeroderma pigmentosum*, Li-Fraumeni ter družinskega sindroma atipičnih nevusov in



Slika 1. Tkiva, iz katerih lahko vznikne uvealni melanom (7). Ant. uvea – sprednja (anteriorna) uvea.

melanoma (2, 3). Displastični nevusi, nevusi šarenice ali žilnice, kožni melanomi ter očesna in okulodermalna melanocitoza so povezani z večjim tveganjem za razvoj melanoma uvee (2, 5). Osebe s somatsko ali zarodno mutacijo gena za s prvim odkritim genom za dovzetnost za raka dojke povezano beljakovino 1 (angl. *BRCA1 associated protein 1*, *BAP1*) imajo večje tveganje za razvoj melanoma uvee in kože ter drugih tumorjev (5).

Klinična slika

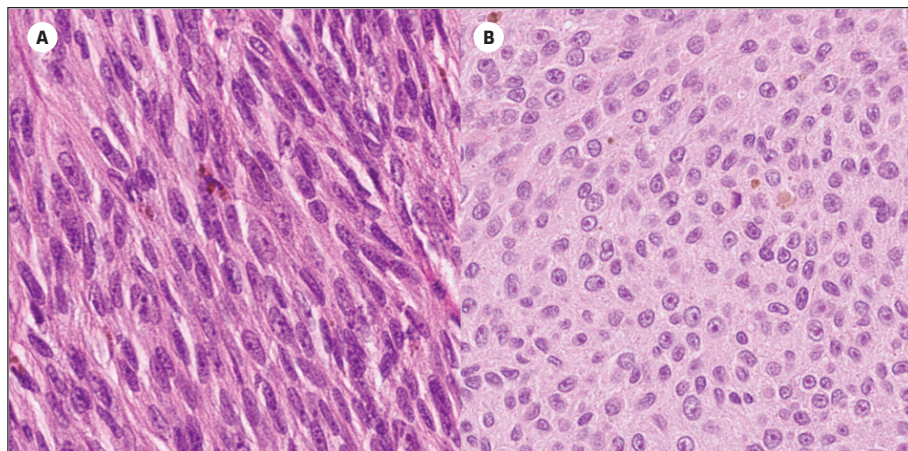
Pri večini bolnikov se uvealni melanom kaže kot neboleča izguba ali izkrivljanje vida. Lahko pride tudi do zamegljenega vida in motnjav, ki jih bolnik vidi kot madeže, niti ali delce pajčevine. Neredko večji tumorji povzročijo odstop mrežnice, kar se kaže s svetlobnimi bliski in figurami v vidnem polju (fotopsija) (2, 5).

Kadar uvealni melanom prizadene sprednji del očesa, lahko bolniki sami opazijo spremembo barve šarenice. Tudi kronično vnetje očesne veznice (kronični konjunktivitis) lahko kaže na uvealni mela-

nom. Tumorji ciliarnega telesa lahko povzročijo asimetrični astigmatizem zaradi premika očesne leče. Bolečina v očesu je redka, lahko se pojavi sekundarno zaradi vnetja ali glavkoma (2). Približno tretjina bolnikov je ob diagnozi asimptomatskih (2, 5, 10).

Histopatološke lastnosti

Histopatološko delimo uvealne melanome glede na tip celic v vretenastocelične (slika 2, A), epiteloidnocelične (slika 2, B) ter mešanocelične, v katerih je vsaj 10 % vsakega tipa celic (2, 3). Vretenastocelični melanomi rastejo počasneje in imajo boljšno napoved (2). Vretenaste celice so obdane z gostim mrežjem retikulina in imajo podolgovata jedra (2, 3). Epiteloidne celice so večje, imajo obilno citoplazmo in jasne celične meje (6). Jedro je večje, okroglo, z velikim eozinofilnim jedrcem (2, 6). Prisotna je izguba povezanosti z zunajceličnim prostorom in med sosednjimi celicami (6). Mitotična aktivnost je večja kot v vretenastih celicah, epiteloidni tumorji rastejo hitreje in imajo agresivnejši potek (2, 6).



Slika 2. A – vretenaste celice, B – epiteloidne celice. Sliki sta bili posneti pri 400-kratni povečavi.

Zasevanje

Ne glede na primarno zdravljenje melanoma uvee skoraj polovica bolnikov razvije zasevke. Zasevanje je hematogeno, najpogostejše v jetra (90–95 %) (2). Po pogostosti sledijo zasevki v pljuča in kosti (5). Ob odkritju zasevkov je napoved slaba, s povprečnim pričakovanim preživetjem sedem mesecev. Za napredovalo bolezen z zasevki ni učinkovitega zdravljenja (3).

Napovedni dejavniki

Velikost tumorja je najpomembnejši klinični napovedni dejavnik, saj vsako povečanje debeline tumorja za milimeter poveča tveganje za zasevanje v 10 letih za 5 % (2, 3, 5). S slabo napovedjo so povezani (3, 6, 11):

- prisotnost epiteloidnocelične komponente v tumorju,
- visoka mitotična aktivnost,
- velik povprečni premer desetih največjih jedrc,
- visoka gostota drobnih žil,
- prisotnost žilnih zank in
- intenzivnejša infiltracija tumorja z limfociti in makrofagi.

Negativni napovedni dejavniki so še (2):

- višja starost bolnika,
- lega tumorja pred ekvatorjem in
- rast skozi beločnico.

V večini uvealnih melanomov so nenaključne kromosomske anomalije na kromosomih 1, 3, 6 in 8, ki lahko služijo kot napovedni označevalci. Na kromosomu 3 je zapisan tumor supresorski gen *BAP1*, katerega inaktivirajoče mutacije so pogoste v melanomih, ki so zasevali (2). Monosomija kromosoma 3, velik bazalni premer tumorja in epiteloidnocelični tip so najpomembnejši dejavniki tveganja za smrt zaradi melanoma uvee (3).

Diagnostika in zdravljenje uvealnega melanoma

Bolnike s sumljivimi pigmentiranimi lezijami mora pregledati oftalmolog, ki ima klinično strokovno znanje o očesnih tumorjih. Klinični videz in oftalmoskopske lastnosti pomagajo pri razlikovanju majhnih melanomov od benignih nevusov. Prisotnost subretinalne tekočine, oranžnega pigmenta in dokumentirana rast na fotografiji fundusa so najdbe, ki podpirajo diagnozo melanoma (2).

Melanomi imajo na UZ po navadi nizko notranjo odbojnost. Večja kot je dimenzija lezije, večja je verjetnost, da je lezija neoplastična, z večanjem debeline pa se povečuje tudi možnost oddaljenih zasevkov. Lezija, debelejša od treh milimetrov, je verjetno melanom. V primerih nejasnosti pri

slikovnih preiskavah je potrebna biopsija za potrditev diagnoze (10).

Diferencialna diagnoza

Klinično pomembni diferencialni diagnozi uvealnega melanoma sta melanocitni nevus in zasevki. Zasevki so najpogostejši znotraj očesni maligni tumorji. Najpogostejši so zasevki raka dojke, sledijo zasevki pljučnega raka (2).

Nove možnosti pri analizi histopatoloških preparatov

Analiza slik histoloških preparatov je lahko zelo zahtevna, iz česar izvira potreba po novih metodah, ki bi analizo olajšale. Nove možnosti se odpirajo predvsem z razvojem računalniških orodij. Na voljo so programska okolja, ki omogočajo delo z digitaliziranimi histološkimi preparati, kar lahko olajša delo patologov, pripomore k hitrejši in natančnejši diagnozi ter posledično k boljšemu zdravljenju. Pri tem velja omeniti, da so nekatere storitve plačljive, npr. Philips IntelliSite Pathology Solutions® ali Concentriq by Proscia®, nekatere pa so na voljo brezplačno (12, 13). Na slednje se bomo osredotočili v tem prispevku.

Z uporabo takšnih okolij lahko vsi uporabniki z dovoljenjem dostopajo do slik, jih organizirajo, analizirajo ali delijo z drugimi. Na slikah lahko tudi označijo različna področja ali patološke strukture. Pri tem oznake ostanejo shranjene v programu, kar omogoča ponovni pregled preparata s shranjenimi oznakami. To lahko olajša konzultacije, saj bi lahko točno označili strukture ali predele, glede katerih si patolog želi drugo mnenje.

Programer z ustreznim znanjem lahko napiše nove, naprednejše modele, s katerimi nadgradi že obstoječo programsko opremo ter olajša delo raziskovalcem. Odvisno od izbranega okolja in potreb delovne skupine lahko napišemo programe za delo s slikami po meri. Tovrstni programi lahko potencialno samodejno razvrstijo (klasifi-

cirajo) tkiva oz. segmentirajo slike. Lahko bi postavili tudi delovno in najverjetnejše diferencialne diagnoze ter napovedali prognozo glede na histopatološke slike.

Vloga strojnega učenja pri segmentaciji slik

Če želimo posamezna tkiva na slikah identificirati s pomočjo računalniškega programa, jih moramo najprej pravilno segmentirati, tj. razdeliti na skupine. Pri tem obstajata dve glavni možnosti.

Če imajo tkiva enostavno določljive značilnosti, lahko uporabnik sam določi vse kriterije, jih ročno vnese v kodo programa in program na podlagi teh kriterijev segmentira tkiva na sliki. Enostavni kriteriji so lahko npr. prevladujoča barva, pravilna oblika celic itd.

V kompleksnejših primerih, ki so v analizi patoloških preparatov pogostejši, so posamezna tkiva določljiva na podlagi oblik in velikosti celic ter drugih morfoloških značilnosti, ki se jih težje enoznačno ročno definira. V teh primerih so za segmentacijo tkiv na slikah primernejši modeli strojnega učenja. Ti se učijo na primerih pravilno segmentiranih slik ter avtomatično poskušajo najti ključna pravila oz. značilnosti teh tkiv, na podlagi katerih lahko najbolj pravilno segmentirajo nove slike. Množica slik oz. podatkov, na katerih se model uči, se imenuje učna množica. Množica slik, na katerih se v nadaljevanju preverja pravilnost delovanja modela, se imenuje testna množica (14).

Predpogoj, da model lahko na slikah najde omenjene ključne značilnosti, je, da morajo biti slike narejene v ponovljivih pogojih ter biti ponovljive kakovosti. V primeru, da je kakovost slik neponovljiva, se namreč model ne bo uspel naučiti značilnosti, na podlagi katerih lahko uspešno segmentira sliko, kar bo vodilo v manjšo uspešnost modela.

Za učenje modela potrebujemo dovolj veliko učno množico, ki je sestavljena iz

pravilno segmentiranih tkiv. To zahteva delo usposobljenih strokovnjakov, ki ročno segmentirajo čim večje število slik, lahko tudi več tisoč. Pri tem morajo segmentirati vse slike po istih merilih ter z enako natančnostjo, kar zahteva medsebojno usklajevanje strokovnjakov pred segmentacijo. V slikah učne množice morajo biti različna tkiva tudi čim bolj enakovredno zastopana. Če bodo učne slike namreč vsebovale neko tkivo A v 95 % slike, lahko program za optimalno točnost preprosto označi vsa tkiva na sliki kot tkivo A, saj tako pravilno segmentira 95 % slike. Če pa so na voljo učne slike, na katerih so enakovredno zastopana različna tkiva, model ne bo dal posebne teže eni ali drugi vrsti tkiva. Težavo neenakomerne zastopanosti je možno delno rešiti s prilagajanjem učenja modela ali pa z dodajanjem oz. odvzemanjem ustreznih slik iz učne množice (14).

Ključni, a pogosto spregledani opravili pri segmentiranju slik sta predobdelava in poobdelava slik. Pri predobdelavi je bistveno pretvoriti slike tako, da se ohranijo oz. izpostavijo značilnosti slike, ki bodo modelu predvidoma bolj koristne. Pogosto se odstrani šum, popravi kontrast, prilagodi barvni model itd. V predobdelavi se po potrebi popravlja slabo segmentirana področja slik s tehnikami, ki odstranijo neželene artefakte, kot so nepravilna segmentacija drobnih področij znotraj pravilno segmentiranih področij (14).

Izbira modela strojnega učenja in njegovih nastavitev je močno odvisna od specifičnega raziskovalnega vprašanja. Zahteva razumevanje tako delovanja modela kot tudi specifičnih lastnosti tkiv, ki so prisotna na učnih in testnih slikah.

Hipoteza

Naša hipoteza je bila, da lahko napišemo model, ki bo dovolj zanesljivo določil tipe tkiv na slikah stekelc s preparati uvealnega melanoma, ter da lahko ta program uspešno vključimo v programsko opremo za

digitalno shranjevanje, organiziranje in analizo slik.

METODE

Priprava preparatov in zajem slik

Z Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo prejeli digitalizirane slike 16 primerov uvealnega melanoma 14 različnih bolnikov. Vsi so imeli potrjeno diagnozo uvealnega melanoma. Vsi histološki preparati so bili pripravljeni po standardnem postopku procesiranja tkiva. Vse histološke rezine so bile obarvane s hematoksilinom in eozinom po enakem protokolu v aparatu Ventana HE 600, proizvajalca Ventana Medical Systems Inc., Arizona, ZDA. Celotne preparate smo posneli pri 400-kratni povečavi s sistemom Nano Zoomer S360 proizvajalca Hamamatsu, Photonics K. K., Japonska.

Rezultat slikanja so slikovne datoteke s tremi kanali, ki predstavljajo rdečo, zeleno in modro barvo (angl. *red, green, blue*, RGB), ki so na videz take, kot bi jih posnelo človeško oko, in torej intuitivne za ročno prepoznavanje regij. Datoteke so bile shranjene v formatu .ndpi (15).

Programska okolja za delo s slikami

Za delo s pridobljenimi slikami obstaja več programskih okolij. Po pregledu razpoložljivih okolij smo se odločili za odprto mikroskopsko okolje (angl. *Open Microscopy Environment*, OMERO), ki je prosto dostopno (16, 17). To je podporno okolje vrste odjemalec/strežnik za vizualizacijo znanstvenih slik in njihovo obdelavo. Podpira več kot 140 slikovnih formatov, vključno s formatom .ndpi, v katerem so bile zapisane naše slike. Po vzpostavitvi strežnika ter naložitvi slik nanj je omogočena organizacija slik, upravljanje intenzitete RGB-kanalov, kontrasta ter ročno določanje interesnih regij (angl. *Region of Interest*, ROI) poljubne oblike.

OMERO ima kakovostno dokumentacijo za osnovna opravila s slikami. Pomembna

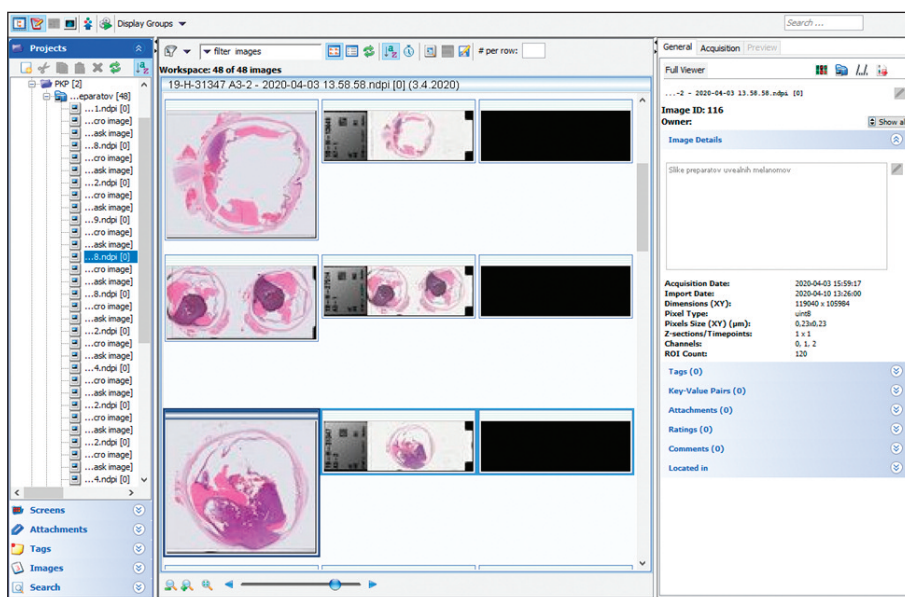
lastnost OMERA je možnost pisanja lastnih programov oz. skript, ki neposredno komunicirajo s strežnikom ter imajo dostop do vseh podatkov na strežniku. Z njimi se tako lahko izvajajo analize slik po željah uporabnika. Z uporabo ROI lahko ustvari izrezane regije slik ter jih analizira z uporabo ročno napisanih segmentacijskih postopkov ali pa z uporabo katerega izmed modelov strojnega učenja. Okolje omogoča povezovanje s programi, napisanimi v programskih jezikih Python, Matlab in Jython (18).

Očitna slabost okolja OMERA je pomanjkanje že pripravljenih skript za analizo slik z že naučenimi modeli strojnega učenja. Težava je delno rešljiva z uporabo modelov iz knjižnic, napisanih za jezike Python ali Matlab. Uporabnik mora za analizo slik napisati lastne skripte, kar je nepraktično v primerjavi z nekaterimi drugimi podpornimi okolji, ki vsebujejo že napisane modele, npr. ImageJ z vtičnikom slideJ, QuPath in Orbit (19–22). Slabost dokumentacije je tudi pomanjkljiva razlaga

dostopanja do spremljevalnih podatkov, ki jih vsebuje slikovna datoteka. OMERO nudi povezovanje z drugimi okolji, kot so CellProfiler, ImageJ, ilastik, Orbit, QuPath in TrackMate, s čimer omogoča uporabo dodatnih funkcionalnosti in že napisanih modelov v drugih okoljih na datotekah, shranjenih v okolju.

Okolje OMERO nam omogoča dostop do slik prek katerega koli računalnika, povezanega s strežnikom. Na posamezen računalnik lahko naložimo program OMEROinsight, tj. odjemalec, s katerim lahko uporabljamo vse funkcionalnosti, ki jih ponuja okolje OMERO (18). Na sliki 3 je posnetek zaslona med uporabo OMEROinsight.

Program OMEROinsight ni edina možnost za dostop do slik. Do njih lahko dostopamo tudi prek spletnega brskalnika, na strani omero.web, ki ima zelo podoben uporabniški vmesnik (18). Dostop prek spletne strani omogoča opazovanje slik, spreminjanje osnovnih nastavitev prikaza in shranjevanje interesnih regij, ne omogoča



Slika 3. Prikaz programa OMEROinsight. Na levi je meni, kjer izbiramo med mapami. Na sredini je prikazana vsebina mape. Na desni so prikazani podatki o izbrani sliki.

pa nalaganja novih slik, kar je mogoče le v programu OMEROinsight.

Možnost segmentacije

Kot že omenjeno, lahko na slikah označimo ROI. Področja lahko označimo s pravokotno, okroglo, točkovno ali poligonalno označbo. Področja, ki pripadajo istemu tkivu, lahko razvrstimo v skupno mapo za lažjo organizacijo, vsakemu področju posebej pa lahko dodamo tudi komentar, kot je ponazorjeno s primerom na sliki 4.

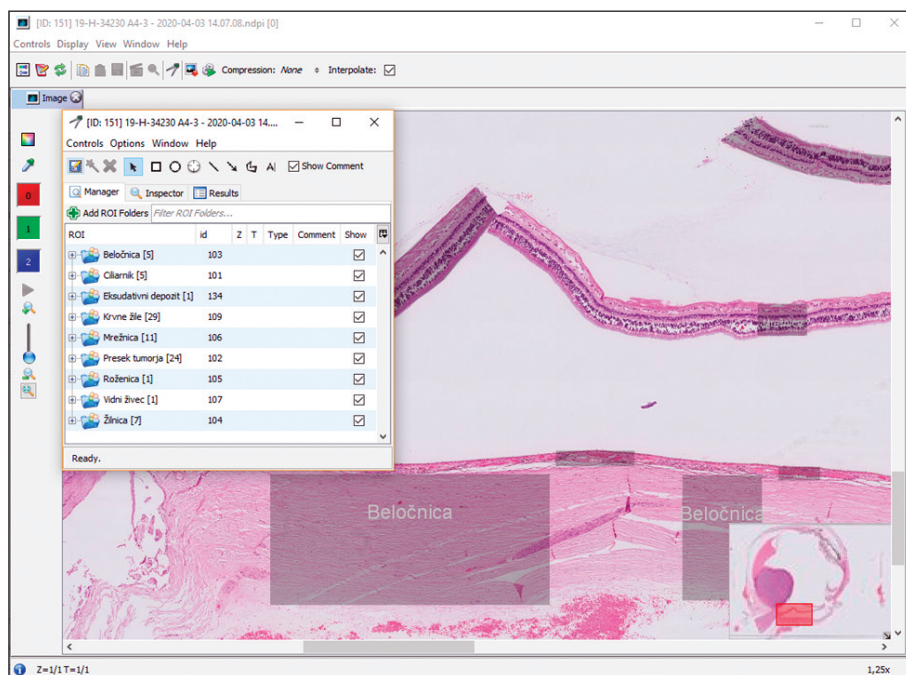
Metode strojnega učenja

Ob vključitvi metod strojnega učenja v razvrščanje tkiv na slikah uvee sta bila pomembna dva premisleka. Prvi je bila izbira učne množice, ki je morala vključevati dovolj raznolike in številčne primere tkiv. Drugi je bila izbira metode strojnega učenja, kjer smo želeli uporabiti preprosto

in učinkovito metodo, ki bi brez ogromne količine truda uspešno prepoznala pojavnost tumorskih celic na slikah preparatov ter tako predstavljala hitro izvedljivo rešitev, ki bi se jo lahko kombiniralo z uporabo digitalnega podpornega okolja in tako olajšalo delo specialističnega kadra.

Okviren razvoj modela strojnega učenja za določanje tipov tkiva na sliki je prikazan na sliki 5. Iz ročno segmentiranih slik stekelc smo pri 100-kratni povečavi izvozili posamezne ROI z eno samo vrsto tkiva. Povečava je bila izbrana tako, da so se posamezne celice še vedno dobro ločile med seboj, hkrati pa je bila velikost posamezne datoteke dovolj majhna za hitro delovanje programov. Za delo je bilo izbranih naslednjih 11 tkiv oz. tkivnih struktur, razvrščenih po abecednem redu:

- beločnica,
- ciliarnik,



Slika 4. Označevanje regij v programu OMEROinsight. Na preparatu so označene regije s prikazanim komentarjem, npr. imenom tkiva. V pojavnem oknu zgoraj levo je prikazan seznam skupin interesnih regij, ki so označene na preparatu.

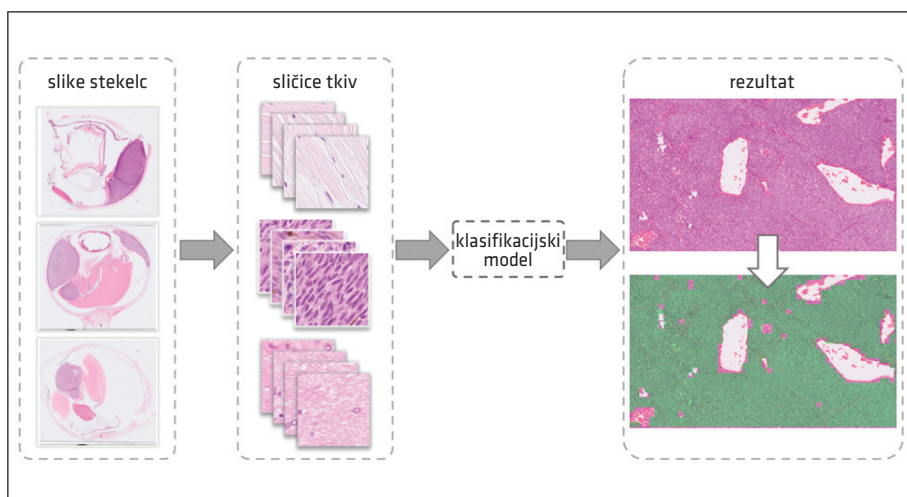
- eksudat,
- epiteloidne tumorske celice,
- krvne žile,
- mrežnica,
- roženica,
- šarenica,
- vidni živec,
- vretenaste tumorske celice in
- žilnica.

Slike tkiv smo razrezali na manjše kvadrate velikosti 100×100 slikovnih pik (v nadaljevanju sličice), ki so služili kot baza podatkov za kasnejše učenje modela. Velikost posamezne sličice je bila izbrana tako, da je bila sličica dovolj velika, da je gotovo vsebovala reprezentativen primer tkiva in s tem vse potrebne informacije, hkrati pa dovolj majhna, da smo za vsako tkivo imeli na voljo dovolj unikatnih primerov.

Izbrana tkiva so se razlikovala po barvah, zato se model ni učil na samih sličicah, ampak na preprostejši reprezentaciji sličic. Tako smo dosegli hitrejše delovanje modela in večjo odpornost na usmerjenost vzorca med slikanjem, saj je bil pomemben le barvni videz celic, ne pa njihova usme-

ritev v prostoru. Najprej smo za vsako RGB-sličico njene tri kanale, ki predstavljajo rdečo, zeleno in modro barvo, pretvorili v drugi barvni prostor, v katerem trije kanali ponazarjajo odtenek, nasičenost in intenzivnost (angl. *Hue, Saturation, Value*, HSV), saj je pri obarvanih histopatoloških vzorcih poleg same barve pomembno tudi, kako intenzivno obarvano je tkivo. Nato smo za vsako sličico izračunali barvni histogram, ki ponazarja porazdelitev barv v tkivu. Barvna ločljivost histograma je znašala 256, tako je bila vsaka sličica na račun uporabe vrednosti za odtenek, nasičenost in intenziteto opisana s trikrat toliko številčnimi vrednostmi oz. z vektorjem dolžine 768. Histogram kot preprostejša reprezentacija sličice je služil kot podatek v bazi za učenje modela. Ime mape, v kateri se je nahajala sličica, je služilo kot oznaka podatka. En vnos v bazi podatkov je bil tako sestavljen iz barvnega histograma sličice in imena tkiva. Na sliki 6 sta prikazani sličici beločnice in epiteloidnih celic s pripadajočima barvnima histogramoma.

Baza podatkov je vsebovala 9.503 označenih barvnih histogramov. Tkiva so bila



Slika 5. Prikaz poteka razvoja programske opreme. Iz shranjenih slik stekelc v okolju OMERO smo ustvarili bazo slikovnih primerov za različna tkiva. Na podlagi teh primerov se je učil razvrščevalni model, ki je nato na podani novi sliki lahko ocenil prisotnost tumorskega tkiva.

z izjemo žil med sabo približno enako zastopana. Za vsako tkivo je bilo na voljo 500–900 primerov za učenje, za žile pa približno 100, ker zanje ni mogoče najti večjega območja, ki bi bilo v celoti zapolnjeno s tem tkivom. Baza podatkov je bila naključno razdeljena na učno množico, ki je vsebovala 75 % vnosov v bazo, in testno množico, ki je vsebovala preostalih 25 % vnosov. Izbrana metoda strojnega učenja je bila metoda podpornih vektorjev (angl. *Support Vector Machine*, SVM), ki se je izkazala kot uporabno orodje za avtomatsko ravščanje tkiv (23). Metoda med učenjem razvršča podatke v razrede, pri čemer skuša postaviti pravila za opis posameznih razredov. Pravila so takšna, da razrede med sabo karseda učinkovito razmejijo (14). SVM je bila kot demonstracijska metoda za razvrščanje preprostih reprezentacij sličic tkiv v ustrezne razrede uporabljena zaradi preprostosti njene implementacije ter krajšega časa učenja modela v primerjavi z določenimi naprednejšimi metodami strojnega učenja, prav tako je bila nevarnost prekomernega prilagajanja modela podatkom ocenjena kot zadovoljivo nizka. Za namen te študije je bila uporabljena implementacija metode podpornih vektorjev v prosto dostop-

ni programski knjižnici *scikit-learn* (24). Uporabili smo linearno obliko jedra, pri čemer je bila za parameter regularizacije za namen kaznovanja napačnih odločitev modela uporabljena vrednost 1,0. Razvrščanje podatkov v izbrano število razredov je potekalo kot množica binarnih ravrstitev in ne kot simultana razvrstitev vseh kategorij tkiv.

REZULTATI

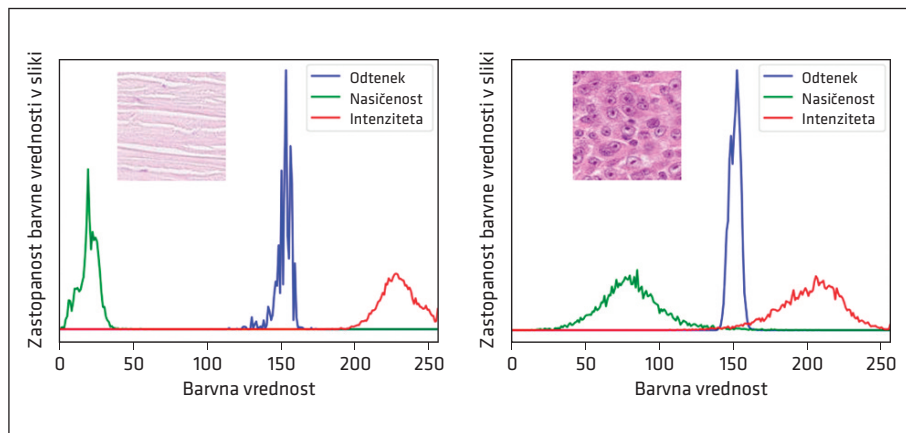
Opredelitev uspešnosti razvrščevalnega modela

Za opredelitev uspešnosti razvrščevalnega modela smo se poslužili treh pogosto uporabljenih metrik. To so:

- točnost (angl. *accuracy*),
- občutljivost (angl. *sensitivity*) in
- specifičnost (angl. *specificity*).

Sestavljene so iz različnih kombinacij možnih rezultatov, to so pravilno pozitivni (angl. *true positive*, TP), pravilno negativni (angl. *true negative*, TN), lažno pozitivni (angl. *false positive*, FP) in lažno negativni (angl. *false negative*, FN) rezultati (14).

Točnost je definirana kot razmerje med količino pravilnih napovedi in količino



Slika 6. Primer barvnih histogramov za različni tkivi. Obe strani sta sestavljeni iz 100 × 100 slikovnih pik velike sličice tkiva in barvnega histograma, ki ga sestavljajo tri krivulje različnih barv, ki predstavljajo vrednosti za odtenek, nasičenost in intenzivnost na sličici. Na levi je prikazana beločnica, desno pa epitelioidne tumorske celice.

vseh napovedi oz. $(TP + TN)/(TP + TN + FP + FN)$. Občutljivost je definirana kot delež pravilno ugotovljenih pozitivnih izidov med vsemi pozitivnimi izidi oz. $TP/(TP + FN)$ in je pomembna, kadar imajo lažno negativni izidi visoko ceno. Pomen visoke občutljivosti se v medicini pokaže, kadar zaradi prekinitve izvajanja nadaljnjih preiskav ob negativnem rezultatu testa nastane huda škoda na bolnikovem zdravju. Pogosteje nastane večja škoda, če bolnemu človeku rečemo, da je zdrav, kot pa če zdravega pošljemo na dodatne preiskave, zaradi česar je zelo pomembna visoka vrednost te metrike. Specifičnost je po drugi strani definirana kot delež pravilno ugotovljenih negativnih izidov med vsemi negativnimi izidi oz. $TN/(TN + FP)$. Iz definicije sledi, da visoka specifičnost na račun redkih lažno pozitivnih izidov zmanjša potrebo po dodatnem

testiranju za potrditev izida. Obe metriki imata tako velik pomen v medicinski diagnostiki.

Model je tako obravnaval učno množico, naučeno shranil v model za kasnejšo uporabo in s pomočjo testne množice izračunal statistiko uspešnosti za vsako tkivo posebej, prikazano v tabeli 1, ter splošno statistiko za model, prikazano v tabeli 2.

Tabeli 1 in 2 opisujeta, kako uspešen je model, ko razvršča novo sličico velikosti 100×100 slikovnih pik, shranjeno pri 100-kratni povečavi, na kateri je izrazito zastopana ena vrsta tkiva. V testni množici so namreč shranjene sličice, pridobljene na enak način kot sličice v učni množici, saj je bila baza sličic povsem naključno razdeljena na učno in testno množico. Statistika na tej točki tako še ne opisuje, kako uspešen bi bil model pri segmentiranju območja, na

Tabela 1. Statistika uspešnosti modela po tkivih. Prvi stolpec vsebuje tkiva, ki so bila zajeta v analizo, nadaljnji stolpci pa metrike uspešnosti za vsako tkivo, izražene v deležih brez enot.

Tkivo	Občutljivost	Specifičnost
Beločnica	0,87	0,99
Ciliarnik	0,44	0,99
Eksudat	1,00	1,00
Epiteloidne tumorske celice	0,95	0,99
Krvne žile	0,75	1,00
Mrežnica	0,89	0,98
Roženica	0,92	0,97
Šarenica	0,78	0,95
Vidni živec	0,89	0,99
Vretenaste tumorske celice	0,96	0,99
Žilnica	0,74	0,99

Tabela 2. Splošna statistika uspešnosti modela. Metrike so izražene v deležih brez enot. Točnost modela je 0,85.

Mere modela	Občutljivost	Specifičnost
Mere modela brez obteženosti	0,84	0,99
Mere modela, obtežene glede na zastopanost tkiva	0,85	0,98

katerem je prisotnih več vrst tkiv, je pa oprijemljiv pokazatelj obnašanja modela na primerih, analognih zbranim v bazi.

Iz tabele 2 sledi, da je splošna točnost modela 85-%, kar zajema razvrščanje vseh tkiv. Za postavitev diagnoze je najpomembnejša pravilna identifikacija tumorskega tkiva, kar opisuje občutljivost v tabeli 1. Ta znaša 95 % za epiteloidne tumorske celice in 96 % za vretenaste tumorske celice. Model torej na sliki preparata uspešno prepozna tumorsko tkivo, njegova celokupna točnost pa je nižja na račun slabšega prepoznavanja tkiv, kot sta ciliarnik in šarenica. Tu se je treba spomniti, da največji delež uvealnih melanomov predstavljajo melanomi žilnice, medtem ko so melanomi ciliarnika in šarenice redkejši. Poraja se torej vprašanje, ali bi pri tako nizki občutljivosti za ciliarnik in šarenico lahko tvegali neuspešno prepoznavo melanoma ciliarnika ali šarenice. Odgovor je negativen in izvira iz načina, kako je model zasnovan. Model slike očesa ne razdeli na tkiva in ne išče tumorskih sprememb v prepoznanih tkivih ali ob njih, temveč pregleda celotno sliko in zazna prisotnost tumorskega tkiva popolnoma neodvisno od sosednjih vrst tkiva. Zanima ga samo lokalna barvna porazdelitev na preiskovanem območju, na podlagi katere prepozna vrsto tkiva. Gre torej za prepoznavanje vzorca, ki ga tvori posamezno tkivo, in ne za logično sklepanje, ki ga je ob ogledu slike sposoben specialist patologije, ki na podlagi znanja iz histologije in patologije lahko prepozna patološko spremembo. V analizo bi bilo mogoče vključiti tudi prostorsko informacijo, kar bi verjetno izboljšalo rezultat razvrščanja, saj bi algoritem odločitve sprejemal na podlagi bolj raznolikih podatkov.

Matrika zmot

Pravilne in napačne napovedi za vsa tkiva smo povzeli v matriki zmot, ki je prikazana na sliki 7. Matrika zmot je transparenten način prikaza podatkov, iz katerega lahko sklepamo o medsebojnih zamenjavah

pri razvrščanju tkiv. Da bi zajeli še informacijo glede količine testnih primerov za vsako tkivo, vrednosti v matriki nismo normalizirali. V njej lahko za izbrano tkivo odčitamo, kolikokrat je model podal pravilno oz. napačno napoved, kar omogoča tudi ugotavljanje morebitnih medsebojnih zamenjav. V idealnem primeru, v katerem do napačnih napovedi sploh ne bi prišlo, bi na diagonalnih mestih imeli število testnih primerov za vsako tkivo, izven diagonale pa bi bile ničelne vrednosti. V našem primeru so vrednosti izven diagonale konsistentno bistveno nižje od diagonalnih, izstopajo pa napovedi v primeru ciliarnika. Slednji je bil večkrat napačno razvrščen v druge kategorije, kar se ujema z izračunano občutljivostjo v tabeli 1. Pri drugih tkivih ne prihaja do drastičnih odstopanj oz. zamenjav.

Preizkus modela

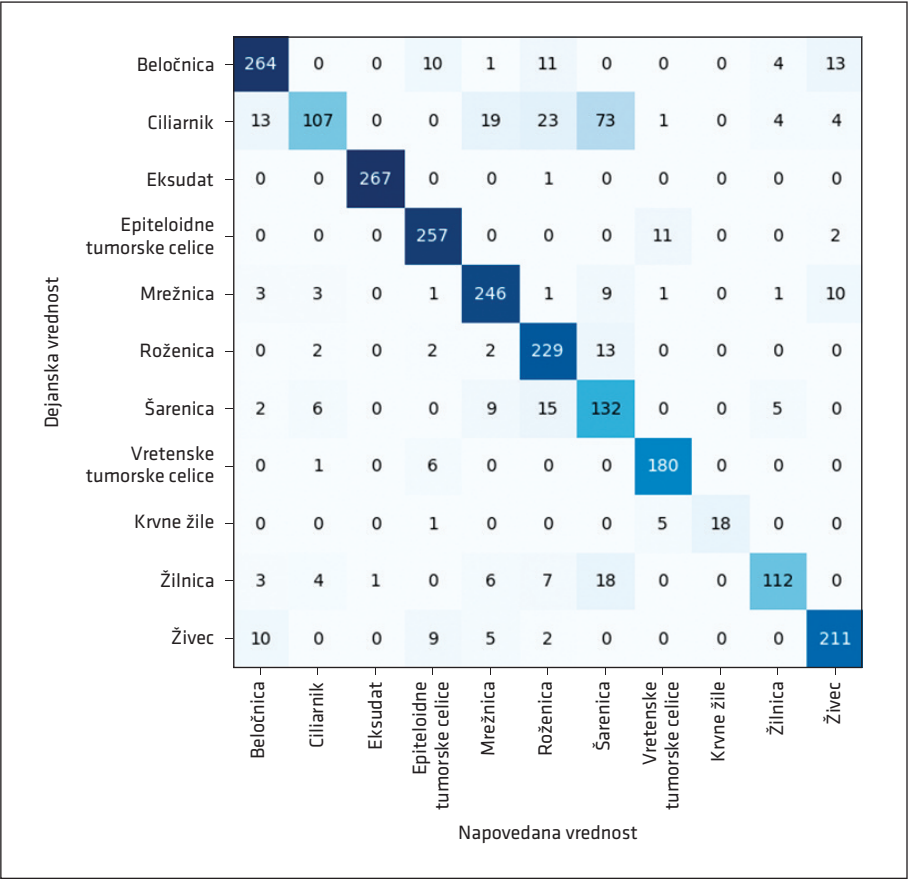
Po ugotovljeni zadovoljivi uspešnosti ravščanja posameznih tkiv smo model preizkusili na večjih testnih slikah, ki so vsebovale različna tkiva ter bile prav tako kot primeri za učenje shranjene pri 100-kratni povečavi. Pri izbiri teh slik smo bili posebno pazljivi, da zagotovo niso bile del učne ali testne množice. Tako smo zagotovili, da smo model preizkusili na primerih, ki jih nikoli prej ni videl, hkrati pa je to korak dlje od opisa uspešnosti modela, kot ga predstavljata tabeli 1 in 2.

Metoda drsečega okna

Model za preizkus je testno sliko obdelal z metodo drsečega okna (angl. *sliding window*), ki je uveljavljena tehnika pri tovrstnih nalogah (25). Metoda deluje tako, da se okno velikosti $(2n+1) \times (2n+1)$ slikovnih pik najprej umesti v levi zgornji kot. Nato se premika proti desni za eno slikovno piko naenkrat. Ko dokonča vrsto, se vrne nazaj na začetek vrste, se premakne eno slikovno piko nižje in nadaljuje desno do konca vrste. Tako skenira celotno sliko, pri čemer vsak del slike »vidi« večkrat. Na vsaki pozici-

ciji drsečega okna model izračuna barvni histogram območja, ki ga okno trenutno pokriva. S poprej shranjenim modelom histogram razvrsti in tako določi tkivo, ki naj bi pokrivalo območje okna. Ker je za diagnostiko najpomembnejše uspešno prepoznavanje tumorskega tkiva, vrne tudi kopijo vhodne slike, na kateri je pobarvano območje, zaznano oz. razvrščeno kot tumorsko tkivo. Posamezna slikovna pika na sliki je pobarvana takrat, ko je bilo kot tumorsko tkivo prepoznano celotno okno, katerega sredinska točka je ravno ta slikovna pika. Na ta način smo dosegli natančno določanje mej posameznega prepoznanega tkiva.

Velikost drsečega okna in predobdelava slike sta bili določeni z željo po kompromisu med uspešnostjo in računsko zahtevnostjo. Ker drseče okno vsak del slike obdela večkrat, je razvrščanje velike slike dolgotrajna in zahteva veliko količino delovnega pomnilnika. Samo na večjih slikah z različnimi območji pa lahko jasno preverimo, ali model res loči tumorsko tkivo od vseh ostalih. Slik, ki prikazujejo več različnih območij in ki so bile shranjene pri 100-kratni povečavi, ni bilo mogoče razvrstiti z osebnim računalnikom pri velikosti okna, kot je bila določena pri učenju modela, zaradi prevelike zahtevane prostornine



Slika 7. Matrika zmot. Na navpični osi se nahajajo dejanske kategorije vnosov v testni množici, na vodoravni pa vrednosti, kot jih je napovedal model. Za lažjo predstavbo so polja obarvana glede na vsebovano vrednost.

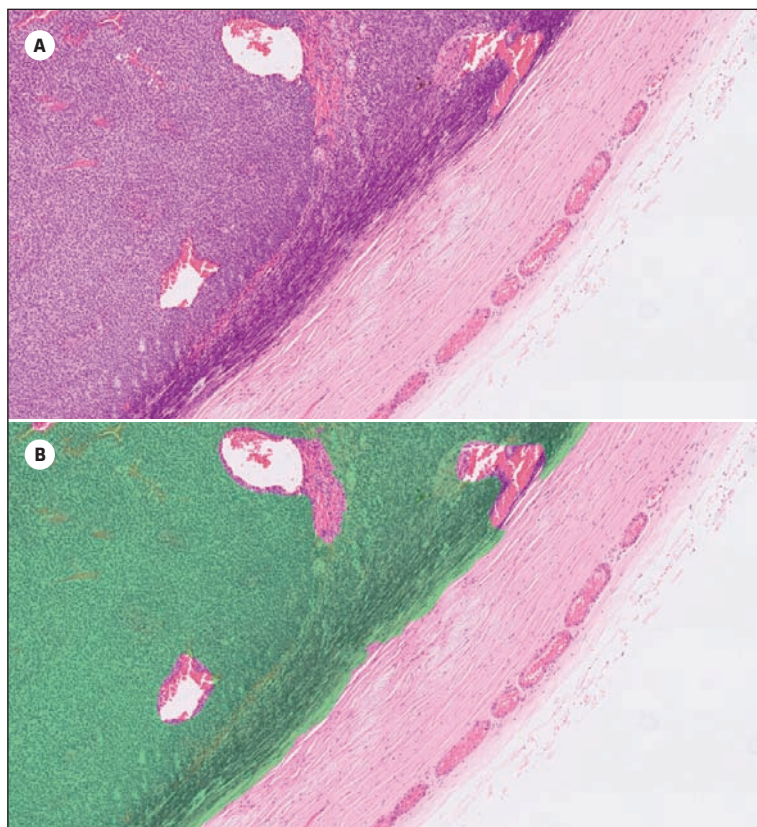
(kapacitete) pomnilnika. Zato so bile pred testiranjem slike pomanjšane na četrtno svoje velikosti, kar ni preseglo razpoložljivega pomnilnika, hkrati pa je bilo zaradi tega treba ponovno določiti tudi velikost okna. Ker so bile testne slike shranjene pri enaki povečavi kot učne slike in hkrati pomanjšane na četrtno, je tudi velikost okna pri testiranju znašala četrtno velikosti okna pri učenju, povečano za eno slikovno piko v vsaki smeri, tako da je bila vsaka stranica dolga liho število slikovnih pik in je bilo mogoče enostavno določiti sredinsko slikovno piko. Velikost okna je tako znašala 51×51 slikovnih pik. Vsa koda je bila napisana v programskem jeziku Python in vključena v podporno okolje.

Primeri delovanja modela

Trije različni primeri delovanja modela so prikazani na slikah 8, 9 in 10. Vsak par slik predstavlja enako območje. Prva slika prikazuje izvirno sliko. Na drugi sliki je z zeleno barvo označeno območje, ki ga je model prepoznal kot območje z vretenastimi ali epiteloidnimi tumorskimi celicami.

Na sliki 8 je prikazan primer uspešne razvrstitve. Model pravilno označi območje s tumorskim tkivom. Prav tako se pravilno izogne označevanju žil znotraj tumorja in jasno preneha z označevanjem na meji med tumorjem ter beločnico.

Na sliki 9 je prikazan še en primer uspešne razvrstitve. Model pravilno označi skoraj celo območje s tumorskim tkivom,



Slika 8. Primer uspešne razvrstitve. A – izvirna slika, B – slika, na kateri je z zeleno barvo označeno območje, prepoznano kot tumorsko tkivo.

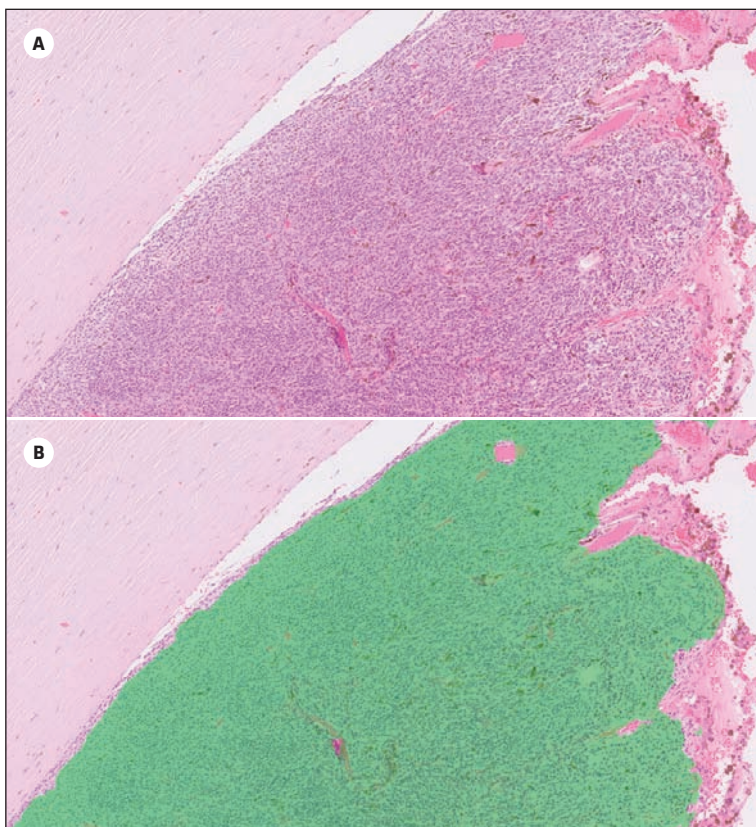
pri čemer izpusti le majhna območja tumorskih celic na meji med tumorjem in beločnico. Tudi tukaj pravilno izpusti območja znotraj tumorja, ki ne vsebujejo tumorskih celic, in preneha z označevanjem na delu tumorja, kjer se začne mrežnica.

Na sliki 10 je prikazan primer manj uspešne razvrstitve. Model pravilno označi le tisti del tumorja, ki ne vsebuje nekroze.

RAZPRAVA

Uspešnost modela strojnega učenja je neposredno odvisna od kakovosti vhodnih podatkov v učni in testni množici (14). To vodi lo se lepo kaže tudi na naših primerih. Model je prejel veliko količino slikovnih primerov vretenastih in epitelioidnih tumorskih

celic, ki so vsebovali zgolj in samo te celice. Posledici sta dve, po eni strani se model pri označevanju uspešno izogne žilam znotraj tumorja, po drugi strani pa sploh ne označi dela tumorja, ki vsebuje nekrozo. Slednje bi lahko rešili tako, da bi v učno in testno množico tkivom dodali še razred nekroze, da bi se model naučil tudi značilnosti tovrstnih regij. Vključitev primerov nekroze in ostalih anomalij v tumorskem tkivu je odvisna od razpoložljivosti slik preparatov, ki vsebujejo tovrstna območja, saj bi za uspešno učenje modela morali nabrati primerno število primerov, kar nam predstavlja izhodišče za nadaljnje delo. Vsekakor je bolje, da model označi preveliko območje, kot pa premajhno, saj je



Slika 9. Primer uspešne razvrstitve. A – izvorna slika, B – slika, na kateri je z zeleno barvo označeno območje, prepoznano kot tumorsko tkivo.

cena dodatnih preiskav zanemarljiva v primerjavi s ceno, ki jo plača nezdravljen bolnik.

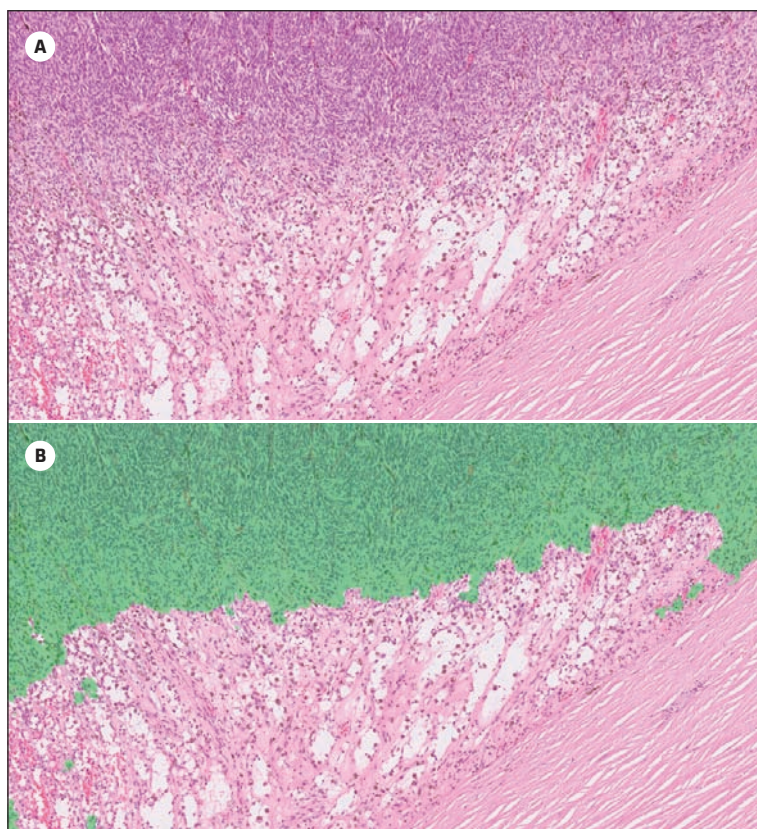
Možnosti nadaljnjega razvoja

Diagnostika in napoved prognoze

Uspešna avtomatska segmentacija tkiv in identifikacija tumorskega tkiva sta dobro izhodišče za nadaljnji razvoj. Kot smo omenili že v uvodu, bi na podlagi uspešno razvrščenih regij lahko program podal delovno in najverjetnejše diferencialne diagnoze. Pri slednjih bi lahko podal še stopnjo verjetnosti in jih po verjetnosti tudi razvrstil. Tako bi zdravnikom potencialno olajšali odločitve za dodatne teste ter jim ob negativnih ali neprepričljivih rezultatih testov pri-

hranili čas in miselni napor pri kasnejšem iskanju diferencialnih diagnoz.

Poleg diagnostike bi programsko opremo lahko razširili tudi v model napovedi prognoze, ko bi bila ustrezna diagnoza že postavljena. Model bi temeljil na že obstoječem, trenutnim kategorijam tkiv pa bi dodali še kategorije, kot so nekroza, krvavitve, vnetja itd. Poleg tega za posamezne regije ne bi obravnavali zgolj lokalne barvne porazdelitve, ampak bi za vsako sliko samodejno izračunali tudi druge parametre, za katere obstaja povezava s prognozo. Med pomembnejšimi prognostičnimi dejavniki, ki bi jih lahko dodatno upoštevali, so velikost tumorja, njegova lokacija v očesu, prevladujoč tip celic, velikost jeder celic



Slika 10. Primer manj uspešne razvrstitve. A – izvorna slika, B – slika, na kateri je z zeleno barvo označeno območje, prepoznano kot tumorsko tkivo.

(povprečna vrednost in standardni odklon površine, obsega in dolžine ter širine jedrc), povprečni premer desetih največjih jeder, prisotnost žilnih zank in mitotično aktivnost (2, 3, 5, 6, 10).

Uporaba naprednejših metod strojnega učenja

Po omembi možnosti nadaljnjega razvoja na področju diagnostike in napovedi prognoze se velja vrniti k izbiri metode strojnega učenja za namen razvrščanja posameznih tkiv na slikah preparatov. Za uporabo v histopatologiji je bilo do danes preizkušenih že veliko metod strojnega učenja. Pomembno se je zavedati, da so različne metode primerne za različne primere in da povsem univerzalna rešitev ne obstaja (26).

Predvsem prognostični dejavniki, kot sta npr. velikost jeder celic in lokacija tumorskega tkiva v očesu, vključujejo tudi prostorsko informacijo, kjer ni pomembna le lokalna porazdelitev barvnih odtenkov. Da bi segmentaciji dodali informacijo o možni prognozi, bi bilo treba poseči po naprednejših metodah strojnega učenja, ki bi namesto izračunanega histograma upoštevali celovito informacijo, ki jo ponuja slika.

Med doslej najuspešnejšimi rešitvami na tem področju so sistemi, ki temeljijo na globokem učenju, kot so npr. globoke konvolucijske nevronske mreže v primeru študije pljučnih tkiv in pristop s šibko nadzorovanim globokim učenjem, ki ne zahteva ročnega označevanja obsežne množice učnih primerov (27, 28). Tovrstni primeri dosegajo zanesljivost zdravnikov specialistov patologije in resnično ponujajo možnost velikega časovnega prihranka, so pa tudi bolj kompleksni in zahtevajo več načrtovanja. Ob tem bi izpostavili prednost našega sistema, ki je enostavnejši in hkrati vseeno dosega zadovoljivo uspešnost, da bi bil lahko v podporo specialistu patologije pri sprejemanju odločitev.

Uporaba sistema pri drugih patoloških spremembah

Koncepti, ki stojijo za programskim okoljem in razvrščevalnim modelom, so prenosljivi tudi na druge patološke spremembe. Delovanje modela ni vezano na število različnih tkiv, pomembno je le, da se tkiva vizualno ločijo med sabo. Za vsako novo bolezensko spremembo, ki bi jo želeli obravnavati na tak način, je potrebna izgradnja baze podatkov ter učenje modela.

Uporaba hiperspektralnega slikanja

Digitalna patologija se v večji meri osredotoča na digitalizirane RGB-slike histoloških preparatov. Skupine, ki se raziskovalno ukvarjajo s patologijo, v svojih raziskavah obravnavajo tudi uporabo multispektralnega in hiperspektralnega slikanja ter morebitne prednosti teh tehnik pred običajnimi RGB-slikami (29). Hiperspektralna slika lahko za razliko od RGB-slike s tremi kanali vsebuje tudi več sto kanalov in tako ponuja veliko informacij, tudi v območjih izven vidne svetlobe, ki so človeškemu očesu nedosegljiva (30).

V tehniki hiperspektralnega slikanja leži velik potencial za nadaljnji razvoj okolja, opisanega v tem članku. Model bi imel na voljo večjo količino informacij, ki bi zajele tudi bolj občutljive in težje zaznavne lastnosti posameznih tkiv. Predpostavljamo, da bi na takšnih slikah model lahko s še večjo gotovostjo prepoznal posamezna tkiva, saj bi bil bolj občutljiv na podrobnosti, ki na običajni RGB-sliki morda sploh ne bi bile vidne (30). Vključevanje te tehnike v naše podporno okolje za zdaj presega okvir tega članka.

ZAKLJUČKI

V članku smo opisali postavitve okolja za delo s slikami, ki omogoča delo na daljavo, shranjevanje, organizacijo in analizo slik. Razvili smo program, ki na sliki označi izbrana tkiva, prepoznana z metodami strojnega učenja. Obetajo se tudi možnosti

nadaljnega razvoja v avtomatskem postavljanju diagnoze ali ocenjevanju prognoze. Koncepti, predstavljeni v članku, so upo-

rabni tudi za druge patološke spremembe in načine slikanja, kot npr. hiperspektralno slikanje.

LITERATURA

1. Mayo Clinic. Where eye melanoma occurs [internet]. Mayo Clinic, 2020 [citirano 13. oktober 2023]. Dostopno na: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/eye-melanoma/symptoms-causes/syc-20372371>
2. Beek van G, Koopmans AE, Verdijsk RM, et al. Diagnosis, histopathologic and genetic classification of uveal melanoma. In: Guy Huynh Thien Duc, Melanoma – From early detection to treatment. London: IntechOpen; 2013. p. 137–73. doi: 10.5772/53631.
3. Laver NV, McLaughlin ME, Duker JS. Ocular Melanoma. Arch Pathol Lab Med. 2010; 134 (12): 1778–84. doi: 10.5858/2009-0441-RAR.1.
4. Krantz BA, Dave N, Komatsubara KM, et al. Uveal melanoma: Epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. Clin Ophthalmol. 2017; 11: 279–89. doi: 10.2147/OPTH.S89591.
5. Kaliki S, Shields CL. Uveal melanoma: Relatively rare but deadly cancer. Eye (Lond). 2017; 31 (2): 241–57. doi: 10.1038/eye.2016.275.
6. McLean IW, Saraiva VS, Burnier MN Jr. Pathological and prognostic features of uveal melanomas. Can J Ophthalmol. 2004; 39 (4): 343–50. doi: 10.1016/s0008-4182(04)80004-8.
7. Xu Y, Lou L, Wang Y, et al. Epidemiological study of uveal melanoma from US surveillance, epidemiology, and end results program (2010–2015). J Ophthalmol. 2020; 3614039. doi: 10.1155/2020/3614039.
8. Virgili G, Gatta G, Ciccolallo L, et al. EUROCare Working Group. Incidence of uveal melanoma in Europe. Ophthalmology. 2007; 114 (12): 2309–15. doi: 10.1016/j.ophtha.2007.01.032.
9. Jancar B, Budihna M, Drnovsek-Olup B, et al. Prognostic factors of choroidal melanoma in Slovenia, 1986–2008. Radiol Oncol. 2016; 50 (1): 104–12. doi: 10.1515/raon-2015-0009.
10. Chattopadhyay C, Kim DW, Gombos DS, et al. Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. Cancer. 2016; 122 (15): 2299–312. doi: 10.1002/cncr.29727.
11. Kaliki S, Shields C, Shields J. Uveal melanoma: Estimating prognosis. Indian J Ophthalmol. 2015; 63 (2): 93–102. doi: 10.4103/0301-4738.154367.
12. Philips digital and computational pathology product portfolio [internet]. Koninklijke Philips NV, 2004–2020 [citirano 2020 Sep 1]. Dosegljivo na: <https://www.usa.philips.com/healthcare/solutions/pathology/pathology>
13. Proscia: Pathology software for the modern digital laboratory [internet]. Proscia Inc., 2020 [citirano 2020 Sep 1]. Dosegljivo na: <https://proscia.com/>
14. Alpaydin E. Introduction, Supervised learning, Kernel machines, Design and analysis of machine learning experiments. In: Alpaydin A. Introduction to machine learning. Cambridge: MIT press; 2020. p. 1–22, 23–50, 395–432, 597–642.
15. Deri L, Martinelli M, Buijlow T, et al. nDPI: Open-Source High-Speed Deep Packet Inspection. 2014. NDPI: Open-source high-speed deep packet inspection. IWCMC 2014 – 10th International Wireless Communications and Mobile Computing Conference, p. 617–22. doi: 10.1109/IWCMC.2014.6906427.
16. Allan C, Burel JM, Moore J, et al. OMERO: flexible, model-driven data management for experimental biology. Nat Methods. 2012; 9 (3): 245–53. doi: 10.1038/nmeth.1896.
17. Moore J, Linkert M, Blackburn C, et al. OMERO and Bio-Formats 5: Flexible access to large bioimaging datasets at scale. In: Ourselin S, Styner MA, uredniki. Medical Imaging 2015: Image Processing. Bellingham: SPIE-International Society for Optical Engineering. 2015; 941307: 37–42. doi: 10.1117/12.2086370.
18. OMERO 5.6.2 Documentation [internet]. The Open Microscopy Environment, 2000–2020 [citirano 2020 Sep 1]. Dosegljivo na: <https://docs.openmicroscopy.org/omero/5.6.2/>
19. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, et al. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. Mol Reprod Dev. 2015; 82 (7–8): 518–29. doi: 10.1002/mrd.22489.

20. Della Mea V, Baroni GL, Pilutti D, et al. SlideJ: An ImageJ plugin for automated processing of whole slide images. *PLoS One*. 2017; 12 (7): e0180540. doi: 10.1371/journal.pone.0180540.
21. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
22. Stritt M, Stalder AK, Vezzali E. Orbit image analysis: An open-source whole slide image analysis tool. *PLoS Comput Biol*. 2020; 16 (2): e1007313. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007313.
23. Noble WS. What is a support vector machine? *Nat Biotechnol*. 2006; 24 (12): 1565–7. doi: 10.1038/nbt1206-1565.
24. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python, *JMLR*. 2011; 12 (85): 2825–30.
25. Rowley HA, Baluja S, Kanade T. Human face detection in visual scenes. *Adv Neural Inf Process Syst* 8. 1996; 875–81.
26. Jimenez-del-Toro O, Otálora S, Andersson M, et al. Analysis of histopathology images: From traditional machine learning to deep learning. In: Depeursinge A, *Biomedical Texture Analysis*. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 281–314. doi: 10.1016/B978-0-12-812133-7.00010-7.
27. Coudray N, Ocampo PS, Sakellaropoulos T, et al. Classification and mutation prediction from non-small cell lung cancer histopathology images using deep learning. *Nat Med*. 2018; 24 (10): 1559–67. doi: 10.1038/s41591-018-0177-5.
28. Campanella G, Hanna MG, Geneslaw L, et al. Clinical-grade computational pathology using weakly supervised deep learning on whole slide images. *Nat Med*. 2019; 25 (8): 1301–9. doi: 10.1038/s41591-019-0508-1.
29. Ortega S, Halicek M, Fabelo H, et al. Hyperspectral and multispectral imaging in digital and computational pathology: A systematic review. *Biomed Opt Express*. 2020; 11 (6): 3195–233. doi: 10.1364/BOE.386338.
30. Amigo JM. Hyperspectral and multispectral imaging: Setting the scene. In: Amigo JM, *Data handling in Science and Technology*. Volume 32. Hyperspectral imaging. Amsterdam: Elsevier; 2020. p. 3–16. doi: 10.1016/B978-0-444-63977-6.00001-8.

Prispelo 11. 3. 2021