



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Jenni Säilä

## **Tekoälyn hyödyntäminen patologian diagnostiikassa.**

Ki-67-värjättyjen keuhkokarsinoidinäytteiden  
analysointitulosten vertailu.

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Kliinisen asiantuntijuuden tutkinto-ohjelma digitaalisissa sosiaali- ja terveys-  
palveluissa (YAMK), S2118S6

Opinnäytetyö

22.03.2020

Tekijä(t) Otsikko	Jenni Säilä Tekoälyn hyödyntäminen patologian diagnostiikassa. Ki-67-värjättyjen keuhkokarsinoidinäytteiden analysointitulosten vertailu.
Sivumäärä Aika	42 sivua + 1 liitettä 22.3.2020
Tutkinto	Bioanalyttikko YAMK
Tutkinto-ohjelma	Kliinisen asiantuntijuuden tutkinto-ohjelma digitaalisissa sosiaali- ja terveystalouksissa (YAMK)
Suuntautumisvaihtoehto	Kliininen asiantuntija
Ohjaaja(t)	yliopettaja Riitta Lumme väitöskirjatutkija Tiina Vesterinen
<p>Patologin työssä immunohistokemiallisten näytteiden analysointi on hyvin työlästä ja aikaa vievää. Digipatologian kehityksen myötä on kehitetty automaattisia kuva-analyysiohjelmiä avuksi helpottamaan tätä tarkkuutta ja keskittymistä vaativaa rutiinityötä. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää tekoälypohjaisen kuva-analyysiohjelman Aiforian suoriutumista Ki-67 -värjättyjen keuhkokarsinoidinäytteiden analysoinnissa verrattuna patologin antamaan lausuntoon ja kahteen kuva-analyysiohjelmaan, QuPathiin ja ImmunoRation.</p> <p>Tutkimusmateriaali koostui viidestä Tissue Microarray (TMA) -lasista, joissa oli 127 keuhkokarsinoidikasvainta. TMA-lasit oli värjätty immunohistokemiallisesti (IHC) diaminobentsidini-leimatulla (DAB) Ki-67 vasta-aineella. Näytteet oli skannattu sähköiseen muotoon ja patologi oli analysoinut näytteet näyttöpöytätehtävällä. Tutkimuksessa opetettiin Aiforian Ki-67-algoritmi tunnistamaan keuhkokarsinoidinäytteistä DAB-leimatut Ki-67-positiiviset ja negatiiviset solut. Tutkimuksessa näytteet analysoitiin opetuksen jälkeen Aiforialla sekä verrokkiohjelmilla ImmunoRation ja QuPathilla. Näiden tuloksia verrattiin patologin antamiin tuloksiin sekä toisiinsa.</p> <p>Tutkimuksen tulosten perusteella tekoälypohjaisella kuva-analyysiohjelmalla Aiforialla saadut tulokset korreloivat näistä ohjelmista parhaiten patologin tulosten kanssa. Aiforian ja patologin tulosten korrelaatio oli 0,94, kun seuraavaksi vahvin korrelaatio patologin tulosten kanssa oli ImmunoRation tuloksilla 0,73. QuPathin tulosten korrelaatio patologin antamiin tuloksiin oli 0,60. Aiforian tulosten korrelaatio ImmunoRation tulosten kanssa oli 0,76 ja QuPathin tulosten kanssa 0,66.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella tekoälypohjaisella kuva-analyysiohjelmalla saadaan vastaavia tuloksia kuin patologin toteuttamalla manuaalisella menetelmällä. Aiforian avulla patologi voisi suorittaa työläisiä laskentatehtäviä nopeammin ja käyttää aikansa tehokkaammin muihin vaativiin tehtäviin. Aiforian tulosten korrelaatio patologin antamiin tuloksiin oli erittäin hyvä ja selvästi parempi kuin muilla testatuilla ohjelmilla.</p>	
Avainsanat	Digipatologia, tekoälypohjainen kuva-analyysi, automaattinen kuva-analyysi

Author(s) Title	Jenni Säilä Analysing Ki-67 Stained Pulmonary Carcinoid Tumors with Artificial Intelligence Based Automated Image Analysis Software. Comparison of the analysis results.
Number of Pages Date	42 pages + 1 appendices 22 March 2020
Degree	Master's Degree, Biomedical Laboratory Science
Degree Programme	Master's Degree in Clinical Expertise in Digital Health Care and Social Services
Specialisation option	Clinical Expertise
Instructor(s)	Riitta Lumme, Principal Lecturer Tiina Vesterinen, MSc, PhD Student
<p>Background: Analyzing of immunohistochemical stains is often time consuming, non-reproducible, and prone to both inter- and intra-observer subjectivity. The development of neural networks and deep learning has opened a new way to train computers to analyze immunohistochemical stains. The aim of this study was to determine how deep learning artificial intelligence (AI) based automated image analysis software Aiforia performs in analyzing Ki-67 labelled pulmonary carcinoid (PC) tumor samples.</p> <p>Methods: Study material consisted of five tissue microarray (TMA) slides including altogether 127 PC tumors. TMA slides were immunohistochemically labelled with a Ki-67 antibody. Stained slides were digitized with a whole slide scanner and analyzed by the pathologist on the computer screen. Aiforia was trained to recognize diaminobenzidine (DAB) stained Ki-67 positive cells as well as all tumor cells negative for Ki-67. The results retrieved from Aiforia's Ki-67 algorithm were compared to ImmunoRatio and QuPath image analysis software and the analysis of the pathologist served as the ground truth.</p> <p>Results: After training the Ki-67 algorithm, we first tested how the algorithm performed against manual analysis performed by the pathologist. The correlation was 0.94. After this, we compared Aiforia to Immunoratio and QuPath. The correlations were 0.76 and 0.66, respectively. Finally, ImmunoRatio and QuPath were compared to manual analysis with correlations 0.73 and 0.60, respectively.</p> <p>Conclusions: This study showed that deep learning AI based automated image analysis software yields similar results compared to human observer. It was superior compared to traditional image analysis software utilizing area based detection. Thus, this deep learning AI based Ki-67 algorithm can assist pathologists to perform laborious Ki-67 analysis in PC tumors quicker and then use the excess time for more demanding tasks.</p>	
Keywords	Digital pathology, AI based image analysis, automated image analysis

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Työn tarkoitus ja tavoitteet	2
3	Patologia ja digipatologia	3
3.1	Patologiasta lyhyesti	4
3.2	Histologisen näyteprosessin esittely	5
3.3	Digipatologian kehitys	6
3.4	Automaattinen kuva-analyysi	8
4	Tutkimusmateriaalit	11
4.1	Keuhkokarsinoidit	12
4.2	Ki-67-immunovärjäys ja -indeksi	13
4.3	TMA-näyte	14
5	Opinnäytetyön toteutus	15
5.1	Tekoälyn opettaminen	16
5.2	Näytteiden analysointi Aiforiolla	20
5.3	Näytteiden analysointi QuPath-ohjelmalla	20
5.4	Näytteiden analysointi ImmunoRatio-ohjelmalla	22
5.5	Tulosten analysointi	24
6	Tulokset ja niiden tarkastelu	25
7	Pohdinta	30
7.1	Eettiset kysymykset	30
7.2	Luotettavuuden tarkastelu	31
7.3	Pohdintaa tekoälyn opettamisesta	33
7.4	Tekoälypohjaisten analyysimenetelmien tulevaisuuden näkymiä	35
8	Johtopäätökset	35
	Lähteet	37
	Liitteet	
	Liite 1. Tulostaulukot	

## 1 Johdanto

YAMK-opinnäytetyön toimeksiantaja oli Helsingin yliopiston Neuroendokriinisten tuumorien tutkimusryhmä. Ryhmän johtajana toimii molekyylipatologian professori Johanna Arola ja opinnäytetyön ohjaajana väitöskirjatutkija Tiina Vesterinen. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää syväoppivaa tekoälyä hyödyntävän pilvipohjaisen kuva-analyysohjelman Aiforian käyttökelpoisuutta patologian diagnostiikassa. Aiforia on alkujaan vuonna 2013 Helsingin yliopiston erillislaitoksen, Suomen molekyyli lääketieteen instituutin, tutkijoiden perustama teknologiayritys, joka haluaa tuottaa laadukkaita apuvälineitä lääketieteen tutkimukseen ja diagnostiikkaan tekoälypohjaisen kuva-analytiikan keinoin (Aiforia 2019a). Työssä vertailtiin Aiforiaa kahteen perinteiseen kuva-analyysohjelmaan, jotka perustuvat kuvan värieröjen tunnistukseen.

Aiforiaan verrattavat ohjelmat olivat ImmunoRatio ja QuPath. ImmunoRatio on Tampereen yliopiston lääketieteellisen teknologian instituutissa kehitetty web-pohjainen analyysohjelma. Sillä voi analysoida esimerkiksi estrogeeni-, progesteroni- ja Ki-67-immunovärjättyjä syöpäkudosnäytteitä. Ohjelman käyttäminen on ilmaista, eikä se vaadi lisäohjelmien asentamista tietokoneelle. (Immunoratio 2019). QuPath on vapaaseen lähdekoodiin perustuva ohjelma, joka on kehitetty nopeuttamaan ja edistämään digitaalista patologiaa ja kudosmerkkiainevärjäysten tulkintaa. Ohjelma on kehitetty Belfastissa (Queens University, Centre for Cancer Research and Cell Biology) (Qupath 2019a). Nämä ohjelmat valikoituivat verrokkiohjelmiksi, koska toimeksiantajalla oli ennestään kokemusta näiden ohjelmien käytöstä.

Digipatologia on ajankohtainen aihe, koska kliinisessä patologiassa ei vielä ole käytössä vakiintuneita digitaalisia analyysimenetelmiä. Patologian analyysit on perinteisesti tehty manuaalisesti ja tulokset ovat vahvasti patologin subjektiivisen tulkinnan tulos. Nykypäivänä patologian näytteistä on saatavissa hyvin paljon erilaista informaatiota potilaan sairaudesta, hoitomahdollisuuksista ja ennusteesta. Näytteiden analysointi vain mikroskoopin avulla tai manuaalisesti tietokonenäytöltä on hyvin työlästä ja aikaa vievää. Näytteistä saatava lausunto perustuu kunkin patologin omaan subjektiiviseen näkemykseen, joten analyysistandardeja on vaikea määrittää.

Virtuaalimikroskopia on yksi osa-alue digipatologiasta. Virtuaalimikroskopian avulla näytteitä voi tarkastella tietokoneruudulta tai muulta näytöltä ja näytteiden jakaminen on nopeaa ja helppoa. Etenkin opetustarkoituksiin ja esimerkiksi internetpalavereihin siitä on paljon hyötyä. Digipatologiaa on hyödynnetty esimerkiksi Ruotsissa helpottamaan patologipulaa. Haasteena digipatologian yleistymiselle ovat alkuinvestointien kalleus ja suuren tietomäärän hallinta. Yhden näytelasin kuvatiedosto voi olla jopa 1000 megatavua. (Tolonen-Näpänkangas-Isola 2015:1981-1984.)

Digipatologian ja patologin yhteistyöllä voitaisiin saada merkittäviä etuja näytteiden tulkinnan oikeellisuudessa ja systemaattisuudessa. Tämän avulla mahdollistetaan potilaiden tehokasta hoitoa. Automaattisen kuva-analyysin avulla saadaan tasalaatuinen tulos, kun tietokone tekee aina samanlaisen tulkinnan ja on systemaattinen isojenkin näyttekokonaisuuksien analysoinnissa. Erilaisten analyysityökalujen avulla patologi saisi tarvitsemaansa informaatiota helposti esiin lasilta. Digitalisaation hyödyntäminen tuo myös nopeutta näytteiden analysointiin ja vapauttaa patologin aikaa sellaisten töiden tekemiseen mihin tietokone ei vielä pysty ja helpottaisi yhteistyötä patologioiden välillä. Digitaalisten lasien tarkastelu helpottaa näytelasin kokonaisrakenteiden hahmottamista ja parantaa kokonaisuudessaan näyteprosessia. Digitaalisten lasien vaatimukset voivat yhtenäistää ja parantaa näytteenvalmistusprosesseja ja tuoda tasalaatuisempia laseja käyttöön. Myös näytelasien säilytys on yksinkertaisempaa ja laatu pysyy parempana, kun digitoitujen lasien värjäytyvyys ei muutu tai haalistu. (Tolonen ym. 2015:1983-1985.)

Syväoppiva tekoäly on jatkuvasti kehittyvä ympäristö ja sen oppimiskyky on lähes rajaton. Pilvipohjainen järjestelmä on ajasta ja paikasta riippumaton ja näin ollen se on hyödynnettävissä milloin ja missä vain. Mikroskoopilla työskentelyn väheneminen parantaa myös työn ergonomiaa, kun näytteitä voidaan katsoa suoraan esimerkiksi tablettilta tai tietokoneen näytöltä. (Aiforia 2019a)

## **2 Työn tarkoitus ja tavoitteet**

Työn tarkoituksena oli selvittää syväoppivan tekoälypohjaisen kuva-analyysiohjelma Aiforian käytön mahdollisuutta kliinisen patologian diagnostiikan apuvälineenä. Opinnäy-

tetyöhön liittyi vahvasti myös tekoälyn opettaminen. Lisäksi olisi ollut mielenkiintoista selvittää tekoälyn opettamiseen liittyviä haasteita ja pohtia kokemusta Aiforian opetuksesta ja käytöstä, mutta ne kysymykset rajautuivat tutkimusfokuksen ulkopuolelle.

Markkinoilla on useita erilaisia kuva-analyysiohjelmia patologian apuvälineeksi. Tällä tutkimuksella haluttiin nimenomaan saada tietoa Aiforian soveltuvuudesta histologisten näytteiden tutkimisen apuvälineeksi. Vertailuun on otettu jo aiemmin tutkimuskäytössä olleet ohjelmat (ImmunoRatio ja QuPath), koska niistä on opinnäytetyön toimeksiantajalla jo ennestään kokemusta. Tutkimusaineistona olivat keuhkokarsinoidituumorit, koska neuroendokriinisten kasvaimien tutkimiseen on toimeksiantajataholla tutkimuksellisia intressejä. Näytteet oli värjätty Ki-67-vasta-aineella, koska se on tärkeä ennustetekijä monessa syövässä ja yleinen toimeksiantajan kiinnostuksen kohde.

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada tietoa automaattisen kuva-analyysin luotettavuudesta ja tarkkuudesta patologin apuvälineenä ja siitä, miten syväoppiva tekoälypohjainen ohjelma eroaa tuloksissa perinteisistä automaattisista kuva-analyysiohjelmista. Tavoitteena oli saada kliinisen patologian diagnostiikkaan hyvin toimiva apuväline, joka helpottaisi patologin työtä ja nopeuttaisi potilaan hoidon kannalta oleellisten tietojen saamista. Tällä opinnäytetyöllä kartoitettiin tekoälypohjaisen kuva-analyysiohjelman käyttöönoton mahdollisuutta rutiinidiagnostiikan apuvälineenä. Tissue microarray (TMA) -näytteiden lisäksi samanlainen testisarja pitäisi tehdä myös kokoleikkeillä ja eri kudoksilla, mutta se jää tämän opinnäytetyön ulkopuolelle.

Tutkimuskysymykset olivat

- Miten Aiforian Ki-67-algoritmin keuhkokarsinoidinäytteillä analysoitu tulos korreloi patologin tekemään analyysiin?
- Miten automaattisten kuva-analyysiohjelmien tulokset vastaavat toisiaan ja patologin saamia tuloksia?

### **3 Patologia ja digipatologia**

Tässä kappaleessa käydään läpi digipatologiaa ja sen kehitystä. Lisäksi selitetään lyhyesti patologian lähtökohtia ja histologiaa, sekä histologisen näytteen prosessia koska ne liittyvät oleellisesti siihen mistä digipatologiassa on kyse.

Digipatologian voisi yksinkertaisimmillaan määritellä olevan histologisten näytelasien muuttamista sähköiseen muotoon ja niiden tutkimista tietokoneen avulla. Yhden määritelmän mukaan digipatologia on monitieteinen ala, joka koostuu osaamisesta patologiassa, laboratorioanalytiikassa, informaatioteknologiassa, tietojenkäsittelyssä, tekniikassa ja biologiassa (Mea ym. 2017:1). Digipatologia koostuu siis monen eri tieteenalan osaamisesta. Toisen määritelmän mukaan digipatologia on patologian analyysin tekemistä digitaalisessa ympäristössä (Hart 2018:1). Vaikka jälkimmäinen määritelmä onkin aika paljon suppeampi, se kuitenkin sisältää myös ensimmäisen määritelmän. Yksinkertaisimmillaan voidaan ajatella, että digipatologia on perinteisen patologisen tutkimuksen tekemistä digitaalisessa ympäristössä. Kun avataan ajatusta vähän lisää, huomataan ensimmäisen määritelmän monitahoisuuden tulevan esiin. Tässä opinnäytetyössä digipatologia nähdään monitieteisenä eri ammattikuntien osaamista yhdistävänä tieteenalana. Digipatologia on koko ajan kehittyvä ja tehokkaampaan potilaiden hoitoon pyrkivä diagnostiikan osa-alue.

### 3.1 Patologiasta lyhyesti

Tutkimuksen aihe kuuluu patologian tutkimuksen piiriin. Tutkimusaihe kuvaa työskentelytapojen kehitystä ja muutosta patologiassa. Patologia tutkii rakenteellisia ja toiminnallisia muutoksia solu-, kudus-, ja elimistötasolla. Sana patologia tulee kreikan sanoista pathos eli kärsimys ja logos eli oppi. Suomenkielinen vastine patologialle on tautioppi. (Mäkinen - Lehto 2012.)

Patologia alkoi kehittyä ruumiinavausten pikkuhiljaa lisääntyessä Lähi-Idässä ja Länsi-Euroopassa 700-1400 -luvulla. Pohjan nykyaikaiselle patologialle loi italialainen Giovanni Morgagni 1700-luvulla. Myös mikroskoopin keksiminen 1500-luvulla ja solujen löytäminen mikroskoopin avulla vei patologian tieteenalaa eteenpäin 1800-luvulle tultaessa. 1859 julkaistiin nykyäänkin patologian perimmäisiin periaatteisiin tukeutuva väite, jonka mukaan solut olivat elämän perusyksikkö ja näin ollen sairauden syytä on haettava solutasolta. Tämä sama periaate pätee nykyiseenkin solu- ja molekyylipatologiaan ja sairauksien syiden ja hoitokeinojen löytämiseen. (Mäkinen - Lehto 2012.)

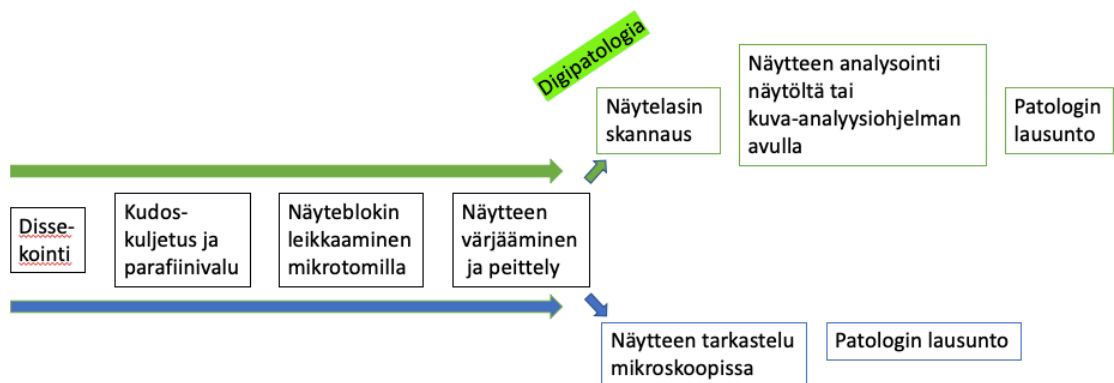
Valomikroskooppisen kudostutkimuksen perusmenetelmät on kehitetty jo 1800-1900 -luvulla. Kudosten käsittely ja värjääminen tutkimusta varten on peruseriaatteiltaan pysynyt samana, vaikka työmenetelmät ja välineet ovat kehittyneet vuosien saatossa. (Mäkinen 2012.)



### 3.2 Histologisen näyteprosessin esittely

Tutkimusnäytteet ovat perinteisen patologian tutkimusalan histologisia näytteitä, joita käytetään kudosis- ja solutaso- tutkimuksessa. Kudosisnäytteiden käsittelyprosessi on työläs ja monivaiheinen. Kudosisnäytteiden prosessointi vie aikaa ja vaatii paljon käsityötä, vaikka monet työvaiheet onkin koneellistettu. Ennen näyteleikkeen valmistusta kudospalan pitää kiinnittyä esimerkiksi upottamalla se formaliiniin, jotta hajoamisprosessit kudoksessa estyvät. Nousevan alkoholisarjan ja ksyleenin avulla tapahtuvan kudiskuljetuksen aikana näytteestä poistuu vesi ja rasva ja kudoksen rakenteet kovettuvat. Lopuksi näytteet valetaan parafiiniin. Näin rakenteet pysyvät mahdollisimman lähellä alkuperäistä ja näyte säilyy pitkään. Parafiiniblokkiin valetusta näytteestä saadaan leikatuksi ohuita (2-5µm paksuisia) leikkeitä. Leikkeet kiinnitetään lämmön avulla lasille ja värjätään halutulla tavalla ja peitellään. (Nurminen 2004.) Tämän jälkeen näytteitä on mahdollista tarkastella esimerkiksi valomikroskoopilla tai skannata sähköiseen muotoon ja analysoida niitä digipatologian keinoin (tietokoneen näytöltä tai kuva-analyysiohjelmia apuna käyttäen).

Näytelasien värjäämisen ja peittelyn jälkeen päästään digipatologian pariin skannaamalla näytelasit sähköiseen muotoon. Kaikki näytteen värjäystä edeltävät työvaiheet ovat samoja digipatologiassa ja perinteisessä mikroskopoinnissa. Kuviossa 1 on kuvattu näytteen käsittelyvaiheet perinteisessä ja digipatologiassa. Kuvio alkaa näytteen mikroleikkelystä eli dissekoinnista, koska siitä alkaa näyteblokin valmistus laboratorioissa ja aiemmat vaiheet kuten näytteenotto, fiksointi sekä mahdollinen muu esikäsittely, on rajattu kaaviosta pois.



Kuvio 1. Histologisen näytteen käsittelyprosessi tiivistetysti (digipatologia vs. perinteinen)

### 3.3 Digipatologian kehitys

Ensimmäiset tutkimukset automaattisen kuva-analyysin solu- ja mikroskooppikuvista on julkaistu jo 1960-luvulla (Madabhushi - Lee. 2016:2). Varsinaisesti digipatologia on saanut alkunsa noin 20 vuotta sitten. Digitaaliseen patologiaan ja kuvankäsittelyyn soveltuva tekniikka sai alun perin alkunsa satelliittien tuottaman karttatiedon käsittelyyn kehitetyistä ohjelmista 1990-luvulla. Ensimmäiset virtuaalimikroskopiaohjelmat kehitettiin 1990-luvun loppupuolella, jolloin myös ensimmäiset kaupalliset näytelasiskannerit tulivat markkinoille. (Pantanowitz ym. 2018:1-2). Nykyään on jo saatavilla useita ominaisuuksiltaan erilaisia skannereita alan moninaisiin tarpeisiin. Nykyskannereita voidaan käyttää suurien näytemäärien skannaamiseen eri suurennoksilla ja monille erilaisille näyte- ja värjäystyypeille. Voidaan käyttää kirkkaan kentän-, fluoresenssi- tai multispektraalimenetelmää. Skannereissa on automaattisia näytteentunnistusominaisuuksia, joiden avulla skannausaika on lyhentynyt ja näin tehokas näytteiden skannaaminen on mahdollista. (Zarella ym. 2019:222-223).

Digipatologian kehitystä pohtivassa Hartin artikkelissa on tuotu esiin digipatologian ja genomiikan tekniikan kehityksen yhtäläisyyksiä. Patologiassa tapahtui alkuun hitaasti kehitystä ja työtavat pysyivät samankaltaisina vuosikymmeniä. Nykyisen tekniikan kehittyminen mahdollisti digipatologian avulla tapahtuvan nopean muutoksen patologian työtapoihin. Muutosta verrataan geenien monistuksen nopeaan kehittymiseen ja tekniikan halpenemisen tuomiin mahdollisuuksiin. Kuvien digitalisointi tuo itsessään suuret mahdollisuudet työn tehostumiseen tietokoneohjelmien ja tekoälyn avulla. Suurten tiedostojen käsittelyn tekninen mahdollistuminen ja paljon muistia vaativien kuvien säilyttäminen on myös kustannuksiltaan tullut toteutettavammaksi. (Hart 2018:1-3.) Patologia on hitaan alun jälkeen nyt alkanut ottaa suuria askelia teknisen kehityksen myötä. Suurien tietomäärien tallentaminen on halventunut ja helpottunut pilvipalveluiden ansiosta. Muutenkin tekniset ratkaisut ovat kehittyneet ja hinnat ovat laskeneet sille tasolle, että ne ovat tulleet mahdollisiksi useammille tahoille. Varsinkin tutkimuksessa on jo nyt käytetty erilaisia digitaalisia työtapoja, mutta kliinisen patologian rutiinidiagnostiikkaan digipatologia on vasta tulossa. (Näpänkangas 2018.)

Digipatologian työtapojen implementoiminen rutiinidiagnostiikkaan on vielä monessa paikassa työn alla. Varsinkin Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa digipatologian käyttö valomikroskopian ohella lisääntyy jatkuvasti. Digipatologiaa hyödynnetään muun mu-

assa etäyhteydellä tehtävissä konsultaatioissa ja opetuksessa. Tällä tavoin on voitu toimia tehokkaasti pienemmilläkin resursseilla ja saatu helpotusta lääkäripulaan, ja pienemmästäkin tutkimusyksiköstä on voitu vaativissa tapauksissa pyytää toista mielipidettä. (Madabhushi - Lee 2016:1-2.) Esimerkiksi artikkelissa laajamittaisesta digipatologian käyttöönotosta ja prosessin validoinnista odotuksena oli, että digipatologia tuo helpotusta työergonomiaan, läpimenoaikaan, yhteistyöhön, tulostarkkuuteen, näytteiden saatavuuteen, koulutukseen, konsultaation saamiseen ja työn tehokkuuteen. Rutiinidiagnostiikan käyttöön saamiseksi tarvittiin investointeja tekniikkaan ja teknisiin ratkaisuihin. Digipatologian projektia varten piti hankkia näytelasiskanneri, tietokoneohjelmisto, tietokonenäyttöjä ja kannettavia tietokoneita, viivakoodinlukijoita, riittävät internetyhteydet sekä tietotekniikkapalvelut. Tekniikan toimivuutta ja sen hankintaa pidettiin projektin toteutuksen vaativimpana asiana. (Vodovnik - Aghdam 2018:5-8.) Muissa tutkimuksissa (esim. Williams ym. 2017:1712) on todettu, että suurimpana hidasteena digipatologian käyttöönotolle ovat juuri hinta-laatusuhde ja suuret alkuinvestoinnit sekä USA:ssa lupaasioiden edistymisen hitaus. Myös standardien ja yleisen konsensuksen puute laatukysymyksissä on hidastava tekijä. Joissain tapauksissa on myös patologioiden vastustus hidastanut digipatologian käyttöönottoa. (Williams - DaCosta - Goacher - Treanor 2017:1712; Zarella ym. 2019:222; Pantanowitz ym. 2018:1-4.)

Digipatologian käyttöönotossa yksittäisessä laboratoriossa huomattiin, että verrattuna perinteiseen valomikroskopointiin digitaalisten kuvien avulla prosessi oli useimmiten hieman nopeampi. Tulosten laatu oli hyvin yhteneväinen eikä diagnooseissa ollut merkittävää eroa. Kaikki projektiin kohdistuneet odotukset toteutuivat hyvin. Lopputuloksissa todettiin, että digipatologiasta oli hyötyä työergonomian, työn joustavuuden, diagnoosiaikojen, näytelasien nopean saatavuuden, kliinisten konferenssien, ylityön tekemisen, väliaikaisten työntekijöiden palkkaamisen, konsulttipalveluiden, etäraportoinnin, tuottavuuden ja läpimenoaikojen kannalta. Tärkeässä roolissa olivat hyvät tietoliikenneyhteydet, paremman ja laajemman näytteen tarkastelun mahdollistavat suuremmat näytöt, etätyöskentelyn mahdollisuus, mikä antoi joustoa ja vähensi työn keskeyttämistä. Myös fyysisten lasien käsittelyn poistuminen nopeutti työskentelyä. Joitain ongelmia tuottivat lasin tai skannauksen huono laatu ja tietoliikenneyhteyksien pätkiminen. Näiden vaikutus kokonaisuuteen oli kuitenkin pieni. (Vodovnik - Aghdam, 2018:5-8)

Harvassa patologian laboratoriossa maailmassa on otettu käyttöön laajamittainen näytelasien digitalisointi. Joitakin kokeiluja siitä on tehty ja artikkelin aiheesta julkaissut tut-

kimusryhmä päätti toteuttaa omassa laboratoriossaan kaikkien näytelasien digitalisoinnin ja yhdenmukaistaa laboratorion työnkulun niin, että jatkossa käytettäisiin vain digitaalisessa muodossa olevia kokoleikkeitä pois lukien jääleikkeet ja fluoresenssivärjäykset. Teknistä toteutusta varten tarvittiin riittävän tehokas skanneri, viivakoodinlukijat ja tallennusohjelma. Värjäysräkit yhdenmukaistettiin skannausrärkeihin niin, että välttyttiin ylimääräiseltä käsityöltä. Värjäysprosessin sekä lasien peittämisen ja kuivattamisen yhdenmukaistamisella päästiin vähäisiin skannausvirheisiin. Tutkimuksessa kävi ilmi, että koko laboratorioprosessin yhdenmukaistaminen ja yksinkertaistaminen on tärkeää digitalisointiprosessin onnistumiselle. (Fragetta - Garozzo - Zannoni - Pantanowitz - Rossi 2017:1-4.) Digitalisoinnin avulla päästään myös eroon näytelasien laajamittaisesta arkistoinnista ja lasien lähettelystä sekä turhasta käsittelystä. (Madabhushi - Lee 2016:2.)

### 3.4 Automaattinen kuva-analyysi

Tulevaisuudessa digipatologiaan tullaan saamaan uusia tekniikoita koneavusteisten analyysien tekemiseen. Nyt kehityksen kärjessä ovat konenäön, koneoppimisen ja syväoppivan tekoälyn avulla tehtävät analyysit. Myös 3D-mallintaminen tuo uusia ulottuvuuksia kudosten tarkasteluun. Uudet teknologiat asettavat omat vaatimuksensa näytteiden tekniselle laadulle ja vaativat optimointeja näytelasien valmistusprosessiin sekä värjäyksiin. (Zarella ym. 2019:230-232.) Korkealaatuiset näytteet ovat kaiken perusta. Näytteen huono laatu vaikuttaa tietenkin skannaustulokseen ja lopullisen kuvan analysointiin sekä automaattisessa kuva-analyysissä että manuaalisesti näytöltä tarkasteltaessa. Kudosten ja solujen rakenteellinen variaatio sairauden eri vaiheissa tuovat haasteita. Myös värjäys ja skannaus sekä eri analyysiohjelmien kuvan kokoon ja tarkkuuteen liittyvät tekniset vaatimukset ovat nekin haasteita yhteneväisten analyysien tekemiseen. (Janowczyk - Madabhushi 2016:1.)

Syväoppiva tekoäly hyödyntää koneoppimista syvien neuroverkkojen avulla. Koneoppimisessa voidaan käyttää ohjattua, ohjaamatonta ja vahvistavaa oppimista. Ohjattu oppiminen hyödyntää neuroverkkoja ja esimerkkien avulla ohjataan tekoälyä oppimaan halutut ominaisuudet esimerkiksi kuvantunnistuksessa. (VTT 2018.)

Suuresta potentiaalista tekoälyn ja syväoppivien neuroverkkojen hyödyntämisessä ja automaattisesta kuva-analyysistä saaduista hyvistä tuloksista huolimatta niiden laajamittaisessa käyttöönotossa on vielä hidasteita. Yksi suuri ongelmakohta on riittävien kuvapankkien puute. Tutkimuksessa on todettu, että nimenomaan annotoituja kuvapankkeja,

joissa solut olisi järjestelmällisesti nimetty, ei ole vielä saatavilla riittävästi. Jotta tekoälyn opettaminen olisi mahdollista, tarvitaan laaja kuvamateriaali erilaisista kudosten variaatioista ja niiden annotointi eli nimeäminen ja luokittelu vie paljon aikaa ja resursseja. Jatkossa voidaan kuitenkin hyödyntää valmiiksi opetettuja algoritmeja ja uudelleen opettaa niitä vanhojen opetusten pohjalta. Ongelmana tässä on se, että erilaisten analyysiparametrien säätäminen ei välttämättä ole ohjelman käyttäjälle ihan yksinkertaista ja siihen vaaditaan ohjelman kehittäjän osaamista. (Janowczyk – Madabhushi 2016:1-3.) Myös ohjaamattoman opettamisen (unsupervised learning) mahdollisuudet ovat käytettävissä hyödyksi, vaikka tähän mennessä ohjattu oppiminen onkin ollut uusista menetelmistä enemmän esillä.

Tekoälyalgoritmeilla voidaan päästä automatisoinnissa hyvään lopputulokseen ja näin nopeuttaa joitakin työvaiheita. Tekoälyalgoritmien päätöksentekoprosessiin tarvittaisiin lisää läpinäkyvyyttä, jotta saataisiin perusteltuja tuloksia ja vertailudatan totuudellisuutta olisi helpompi arvioida. (Tizhoosh - Pantanowitz. 2018:3-4.) Annotointivirheillä ja opetusdatan laadulla on suuri merkitys algoritmin lopputulokseen. Näitä asioita on vaikea selvittää ja analyysitulokset voi poiketa suurestikin tarkoitetusta. Tulosta voi vääristää paljonkin huonosti valittu opetusdata ja huolimattomat annotoinnit sekä väärän suurennoksen käyttö. (Janowczyk - Madabhushi 2016:4-5.) Vielä lähivuosina käytetään digitaalisia apuvälineitä varmasti apuna helpottamaan patologisten työtä. Itsenäisten analyysien tekemiseen rutiinidiagnostiikassa on tekoälylläkin vielä oppimista. Saatavilla on jo useita erilaisia avoimeen lähdekoodiin perustuvia ja kaupallisia kuva-analyysiohjelmia, mutta systemaattista näyttöä ja konsensusa niiden toimivuudesta ei ole. Ohjelman käytön valinta on henkilökohtaisten mieltymysten varassa ja laajamittaista validaatietietoa ei ole juuri saatavilla.

Tekoälyavusteisista digipatologian ohjelmista odotetaan paljon ja niiden on jo näytetty tuottavan erittäin hyviä tuloksia. Esimerkiksi tumien tunnistamiseen opetettu algoritmi (avoimeen lähdekoodiin pohjautuva ohjelma Caffe) onnistui tunnistamaan jopa 98% testialueen tumista oikein valituilla analyysiasetuksilla. (Janowczyk - Madabhushi 2016:8.)

Digitaalisia työkaluja patologiassa tarvitaan esimerkiksi kudosten segmentointiin, biomarkkereiden määrittämiseen ja erilaisten harvinaisten toimintojen ilmenemisen havainnointiin. Näitä toimintoja varten on kehitetty erilaisia kuva-analyysiohjelmia ja niihin perustuvia tukiohjelmia. Usein ongelmana on skannattujen näytteiden suuri koko ja ohjel-

mien ongelmat käsitellä tätä valtavaa tietomäärää. Esimerkiksi ImageJ on pitkään käytössä ollut vapaaseen lähdekoodiin perustuva kuva-analyysiohjelma. (Mea - Baroni - Piltutti - Di Loreto 2017:1-2.) Erilaisten lisäosien, esimerkiksi makrojen avulla ImageJ-ohjelmasta on kehitetty erilaisia kuva-analyysiohjelmia, muun muassa ImmunoRatio.

Kun ajatellaan näiden työkalujen käyttöönottoa, myös sillä on merkitystä, miten tottunut patologi on digitaalisten apuvälineiden käyttöön. Kun digitaalisten apuvälineiden käyttö lisääntyy ja niiden käyttöön harjaannutaan, ongelmakohtiin löydetään ratkaisuja ja tekninen varmuus paranee.

Automaattisilla kuva-analyysiohjelmissa on tehty tutkimusta esimerkiksi syöpäpotilaiden ennusteen arvioimisessa. Sekä Aiforiolla että QuPathilla on tehty tutkimus, joissa molemmissa pyrittiin automaattisen kuva-analyysiohjelman avulla selvittämään potilaan ennustetta ja verrattiin patologin antamaa tulosta kuva-analyysiohjelman tuloksiin. Molemmissa tutkimuksissa tulokset olivat erittäin hyviä ja antoivat vahvasti viitteitä automaattisten kuva-analyysiohjelmien käyttökelpoisuudesta patologian apuvälineenä. Aiforian tekoälypohjainen kuva-analyysiohjelma pystyi ennustamaan opetuskuvadatan ja potilaiden elossaolotiedon perusteella keillä rintasyöpäpotilailla oli parempi ja keillä huonompi ennuste. Riskiluokitustarkkuus Aiforian tulosten perusteella oli 0,6 kun patologin tekemä riskiluokitustarkkuus oli 0,58. Ongelmana tässä tekoälypohjaisessa analyysissä on se, että ohjelma ei varsinaisesti kerro, mitkä tekijät kuvissa olivat ne ennusteeseen vaikuttavat ominaisuudet. (Turkki ym. 2019:42-50.) QuPathin avulla on tehty tutkimus, jossa analysoitiin useita eri biomarkkereita ja niiden tulosten pohjalta arvioitiin paksusuolisyöpäpotilaiden ennustetta. Tutkimusotos koostui luokkien 2 ja 3 potilasnäytteistä. Potilasnäytteistä tehdyt TMA-lasit värjättiin eri kudokset merkkiaineilla ja analyysituloksia arvioitiin potilaiden selviämistietojen ja muiden potilaan seurantatietojen perusteella. Tulosten pohjalta tutkijat totesivat QuPathin hyväksi apuvälineeksi tarkkuutta ja aikaa vaativien analyysien nopeampaan ja tehokkaampaan toteuttamiseen ja potilaan ennusteen arvioimiseen. (Bankhead ym. 2017:2-4)

ImmunoRatio-ohjelmalla on tehty tutkimus, jossa verrattiin manuaalisesti ja tietokoneavusteisesti ImageJ:n kuva-analyysiapuvälineen avulla laskettua Ki-67-indeksiä ImmunoRatiolla laskettuun indeksiin. Tutkijat olivat tyytyväisiä tuloksiin, vaikka menetelmien välinen korrelaatio jäikin vähäiseksi (noin 0,3). Prosentuaaliset tulokset olivat kuitenkin tutkimuksen tekijöiden mielestä hyvät. Heidän näkemyksensä mukaan Immuno-

Ratiota voisi käyttää patologin apuna, mutta ei itsenäisesti. Haasteena he kokivat näytteen laadun ja kuvien analyysiparametrien säätämisen. Lopputuloksena he näkivät, että ImmunoRatio tuo lisäarvoa analyysin nopeutena, tarkkuutena ja toistettavuutena vaikkakin vaatii vielä asiantuntijan arvion tuloksista. (Gonzales-Gonzales ym. 2016:3-6.) Toisessa tutkimuksessa verrattiin patologioiden NET-kasvaimista (neuroendokriiniset kasvaimet) analysoimaa Ki-67-indeksiä ImmunoRatiolla tehtyyn analyysiin. Tässä tutkimuksessa tultiin siihen tulokseen, että ImmunoRatio korreloi erittäin hyvin (korrelaatiokerroin yli 0,9) patologin perinteisesti laskemaan Ki-67-indeksiin. Siinä ImmunoRation todettiin olevan systemaattinen ja hyvä apuväline patologin työssä. Patologin analyysi oli tehty WHO:n suositusten mukaan, jolloin patologi laskee vähintään 2 000 kasvainsolua valitulta Hot spot -alueelta ja arvioi Ki-67-positiivisten solujen osuuden kaikista kasvainsoluista. (Remes-Tuominen-Helin-Isola-Arola 2012:1360-1362.)

Aiforian laskenta-algoritmin ja ihmisen tekemän laskennan välistä tarkkuutta on vertailtu dopamiinineuronien laskennassa. Tutkimuksessa käytettiin hiiren ja rotan aivoista valmistettuja leikkeitä. Näytteet värjättiin ja skannattiin sähköiseen muotoon ja samoista näytealueista laskettiin dopamiinineuronit sekä Aiforiolla että manuaalisesti näytöltä. Tuloksissa todettiin, että Aiforian kuva-analyysi oli erittäin yhdenmukainen ihmisen analysoimiin tuloksiin verrattuna. Korrelaatio analyysien välillä oli 0,98. Positiivisena asiana nähtiin, että Aiforian algoritmia voitaisiin halutessa kehittää vielä lisää antamalla algoritmille lisää opetusta. Myös analyysin nopeutta, käytettävyyttä ja ohjelman saatavuutta pidettiin automaattisen kuva-analyysin lisäarvoa tuottavina ominaisuuksina. (Penttinen ym. 2018:4-6.)

#### **4 Tutkimusmateriaalit**

Tutkimusmateriaali on koottu Helsingin biopankista ja kaikkiaan tutkimuksessa oli mukana näytteet 131 keuhkokarsinoidikasvaimesta. Helsingin biopankki on Suomen suurin biopankki ja sen ovat perustaneet HUS Helsingin yliopistollinen sairaala, Helsingin yliopisto, Kymenlaakson sairaanhoito- ja sosiaalipalvelujen kuntayhtymä, Etelä-Karjalan sosiaali- ja terveystyöpiiri. Päijät-Hämeen hyvinvointiyhtymä liittyi toimintaan mukaan vuonna 2018. Helsingin biopankissa on talletettuna yli miljoonan potilaan näytteitä. Biopankkiin kerätään ja siellä säilytetään ihmisperäisiä näytteitä ja niihin liittyviä tietoja lääketieteellistä tutkimusta varten. Biopankin tehtävänä on auttaa uusien lääkkeiden ja

hoitomuotojen kehittämisessä. (Helsinginbiopankki 2020a.) Biopankkien toimintaa säätelevät erityisesti Biopankkilaki, EU:n yleinen tietosuojasetus ja Tietosuojalaki. Biopankkien toimintaa ohjaa ja valvoo Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea. Keskeisiä toimijoita ovat myös Valtakunnallinen lääketieteellinen tutkimuseettinen toimikunta TUKIJA ja alueelliset eettiset toimikunnat. (Suomen biopankit 2020.)

Keuhkokarsinoidikasvaimet oli koottu TMA-laseille (kudossirublokista leikattu leike) ja lähes jokaista kasvainta kohden oli kaksi halkaisijaltaan 1mm:n näytettä. Analysoitavaa materiaalia oli noin 262 näytettä. Osa näytteistä oli käsittelyvaiheessa irronnut lasilta tai jo tekovaiheessa epäonnistunut. Joistakin kasvaimista oli vain yksi näyte. Näytteet oli värjätty immunohistokemiallisesti Ki-67-vasta-aineella ja skannattu sähköiseen muotoon.

Tutkimuslupaa opinnäytetyötä varten ei tarvinnut erikseen hakea, koska työ on osa isompaa tutkimuskokonaisuutta (Biomarkkerit keuhkon karsinoidituumoreissa), johon lupa on jo olemassa. Tutkimuksessa käytettävien näytteiden tiedot on koodattu siten, että yksilöityjä potilastietoja ei voi tutkimusaineistosta tunnistaa.

Tutkimuksessa näytteet analysoitiin laskemalla kasvainten Ki-67-indeksit neljällä eri tavalla ja näitä indeksejä vertailtiin keskenään. Patologin tekemät analyysit on tehty noudattaen WHO:n (World Health Organization) suositusta neuroendokriinisten kasvainten Ki-67-indeksin laskemisesta. Patologin analysoimat tulokset ovat kokonaistuloksia jokaiselle kasvaimelle. Tulokset on annettu muodossa 0,5, 1, 2 jne. kokonaislukuina. Tulos 0,5 tarkoittaa, että tulos on alle 1. Kuva-analyysiohjelmista saatiin tulokset jokaiselle näytteelle erikseen ja niistä laskettiin kasvainkohtaiset keskiarvot, joita vertailtiin patologin antamiin tuloksiin.

#### 4.1 Keuhkokarsinoidit

Neuroendokriinisiä kasvaimia (NET) on erilaisia ja ne voivat ilmetä lähes missä tahansa elimessä. Yhteistä niille on, että ne ovat saaneet alkunsa diffuusin neuroendokriinisen järjestelmän soluista, joita on siroteltuna eri puolilla elimistöä. Osa NET-kasvaimista aiheuttaa hormoneja tuottaessaan koko kehoon vaikuttavia oireita, suurin osa on kuitenkin oireettomia. NET-kasvaimet ovat verrattain harvinaisia, mutta määrä on nousussa. Tyypillisimmät paikat NET-kasvainten ilmenemiselle ovat ruoansulatuselimistö ja keuhkot. NET-kasvaimia hoidetaan ensisijaisesti leikkaushoidolla ja hyvin onnistuneen



leikkaushoidon jälkeen ei lääkehoitoa välttämättä tarvita. Tarvittaessa lääkkeillä voidaan hidastaa kasvaimen kasvua ja pienentää kasvaimen kokoa. (Salmela 2013)

Keuhkokarsinoidit kuuluvat NET-kasvaimiin ja ovat harvinainen keuhkosyövän alatyyppejä, jonka ennuste on useimmiten hyvä. Keuhkokarsinoidit voidaan jakaa tyypillisiin ja atyyppisiin karsinoideihin. Niitä on kaikista keuhkosyöväistä vain noin 1 prosentti. (Vesterinen ym. 2018:1109.)

Keuhkokarsinoidien jako tyypillisiin ja atyyppisiin karsinoideihin tapahtuu histologisten ominaisuuksien perusteella. Suurin osa keuhkokarsinoideista luokitellaan tyypilliseksi matalan maligniteetin kasvaimiksi, ja pieni osa kasvaimista on aggressiivisempia atyyppisiä kasvaimia. Potilaan ennusteen kannalta on tärkeää selvittää karsinoidin tyyppi, sillä niiden käyttäytyminen ja hoito eroavat toisistaan. Vesterisen tekemän tutkimuksen perusteella metastaasit, kasvaimen koko, histologinen alatyyppejä ja Ki-67-indeksi vaikuttivat potilaan selviytymiseen sairaudesta. (Vesterinen ym. 2018:1113-1115.) Ki-67-indeksi korreloi voimakkaasti keuhkokarsinoidinäytteiden histologisen alatyypin mukaan ja voi vaikuttaa potilaan ennusteeseen (Clay ym. 2017:584).

Keuhkokarsinoidit ja muut neuroendokriiniset syövät ovat lisääntyneet viime vuosikymmeninä. Lisääntymisen syyksi arvellaan muun muassa parantuneita kuvantamismenetelmiä ja lääkäreiden yleisen tietoisuuden kasvua neuroendokriinisistä syöväistä. (Vesterinen ym. 2018:1109.)

#### 4.2 Ki-67-immunovärijäys ja -indeksi

Ki-67-värijäys on immunohistokemiallinen värijäys. Immunohistokemiallisella värijäyksellä tarkoitetaan antigeenin osoittamista kudoksenleikkeestä. Se perustuu tietyn spesifisen vasta-aineen sitoutumiseen antigeeniin tai muuhun proteiiniin. (Ristimäki, Franssila, Kosma 2013.) Erilaisilla leimausmenetelmillä saadaan vasta-aine havaittavaksi mikroskoopissa tai kuvantamismenetelmillä. Ki-67-värijäystä käytetään kasvaimen proliferatiomerkkinä. Proliferaatiolla tarkoitetaan kasvainsolujen lisääntymistä. Ki-67-antigeeni ilmenee solun tumassa kaikissa solusyklin aktiivivaiheissa (G1, S, G2 ja mitosi), mutta ei lepovaiheessa (G0). Ki-67-värijäyksellä voidaan siis osoittaa solujen jakautuminen ja siten syöpäkasvaimen kasvuaktiivisuus. Mitä enemmän syöpäkudoksessa on Ki-67-värijäytyneitä soluja, sitä aktiivisemmin syöpäsolut jakautuvat (Ki-67-indeksi). Ki-67-indeksin

määritys on yleisesti käytetty tutkimus syöpäsolujen kasvun, leviämisen ja erilaistumisen arviointiin. (Richardsen ym. 2017:1-2.)

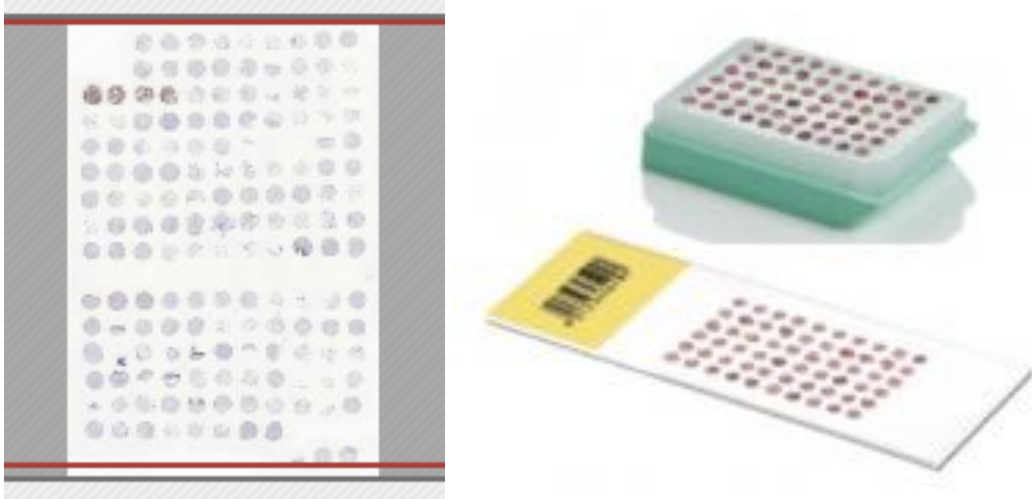
Ki-67-indeksi on DAB-värjäytyneiden kasvainsolusolujen osuus kasvainsolujen kokonaismäärästä tutkitulla alueella. Ki-67-indeksi on siis positiivisten solujen prosenttiosuus kokonaissolumäärästä näytekohtaisesti. WHO:n Suosituksen mukaan laskenta tehdään voimakkaimmin tumavärjäytyneeltä alueelta (hotspot) ja siitä lasketaan 500-2000 solua. Ki-67-markkerin tunnistamiseen vaikuttaa värjäytyvyyden syvyys, joka riippuu esimerkiksi teknisistä värjäykseen liittyvistä tekijöistä sekä solusyklin vaiheesta. ”Hotspoteista” tehty Ki-67-indeksin arvio on tarkempi kuin sattumanvarainen lähestymistapa. Tämän vuoksi myös WHO:n ohjeissa ”hotspotista” laskettu Ki-67-indeksi on suositeltava toimintatapa. (Cavalcanti - Gönen - Klimstra 2016:5-6)

Ki-67-indeksi määritetään Ki-67-positiivisten kasvaintumien osuudesta kaikista kasvaintumista. Ki-67-aktiivisuuden perusteella voidaan erottaa hitaasti etenevät matalan maligniteetin kasvaimet aggressiivisemmista korkeamman maligniteetin kasvaimista. Potilaan ennustekijänä Ki-67-indeksillä on monissa syövissä tärkeä rooli, näin myös neuroendokriinisissä kasvaimissa. (Marchio ym. 2017:713-714; Clay ym 2017:579-580.)

#### 4.3 TMA-näyte

TMA-näyte eli kudossirublokki on useista eri kudospäätteistä rakennettu näyteblokki. Valituista näyteblokeista merkitään tutkimukseen haluttavat alueet yleensä kokoleikkeestä tehdyn hematoksyliini-eosiinivärjäyksen perusteella. Parafiiniblokeista punchataan eli rei'itetään automaattisella tai manuaalisella kudossirublokki-laitteella lieriöitä, jotka kiinnitetään tyhjiin parafiiniblokkiin. Halutuista näytteistä on muodostettu kartta, jonka perusteella kudossirublokki rakennetaan. Samaan blokkiin saadaan mahtumaan useita eri kudospäätteitä. TMA-blokkiin laitetaan mukaan yleensä myös kontrollinäytteet tietyistä tunnetuista kudoksista. (Voduc - Kenney - Nielsen 2008:1-2.)

TMA-blokin etuna on muun muassa se, että yhdellä värjäyksellä saadaan värjättyä useita eri näytteitä. Näin säästetään reagensseja ja aikaa. Näytteen tarkastelu on myös helpompaa, kun näytettä on aina yhdestä kudospäätteestä vain noin 0,6-2 mm halkaisijaltaan oleva alue. Myös eri näytteiden keskinäinen vertailu on helpompaa, kun värjäystulos on tasalaatuista ja näytteet ovat samalla lasilla. (Voduc - Kenney - Nielsen 2008:4-6.) Kuviossa 2 on esimerkki TMA-lasista.



Kuvio 2. Esimerkkikuvat TMA:sta. Vasemmalla skannattu TMA-lasi. Oikealla esimerkki TMA-blokista ja -lasista (Newcomersupply).

## 5 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön tekeminen alkoi syväoppivan tekoälypohjaisen kuva-analyysiohjelman käytön opettelulla. Opettelin neuroverkkojen opettamista Aiforian edustajan johdolla. Kävimme myös patologin kanssa tarkoin läpi kriteerit Ki-67-värjäyksen positiivisille ja negatiivisille soluille, jotta algoritmin opettaminen tapahtuisi mahdollisimman johdonmukaisesti. Tarkoituksena oli opettaa Aiforialle algoritmi Ki-67-värjäyksen analysoinnille keuhkokarsinoidinäytteillä. Aiforian opetusmateriaalina oli Suomen kuudesta sairaalabiopankista saaduista kasvaimista valmistetut TMA-lasit, kustakin biopankista yksi. Varsinaiset tutkimukseen käytetyt näytteet olivat Helsingin biopankista. Tutkimuslaseissa kasvaimia on kaikkiaan 131 kappaletta. TMA-lasit oli värjätty immunohistokemiallisesti Ki-67-värjäyksellä ja skannattu sähköiseen muotoon.

Sama tutkimusnäytekokonaisuus analysoitiin myös kahdella muulla automaattisella kuva-analyysiohjelmalla, QuPathilla ja ImmunoRatiolla. Näytteet analysoi myös patologia digitoituista kuvista katseluohjelman avulla, ilman kuva-analyysien apua. Tätä patologin analysoimaa tulosta käytettiin tutkimuksen ”ground truthina” ja kuva-analyysien tuloksia verrattiin tähän.

Kyseessä oli toiminnallinen tutkimus, jossa minun vastuullani oli Ki-67-laskenta-algoritmin opettaminen Aiforialle sekä saatujen tulosten analysointi. Opettamisen tuloksena syntyneellä algoritmilla analysoin keuhkokarsinoidikasvainten Ki-67-positiivisuuden ja vertasin saatua tulosta kahdella muulla ohjelmalla (ImmunoRatio ja QuPath) saamiini tuloksiin sekä patologin antamaan lausuntoon. Samalla sain kokemusta tekoälyn opettamisesta ja pohdin sen pohjalta Aiforian käytön etuja ja haasteita.

Tekoälyn opettamisessa on oltava äärimmäisen systemaattinen ja tarkka. Kone osaa tehdä tulkintoja vain siltä pohjalta, mitä sille on opetettu. Jos opetuksessa annotointeja tehdessä on oltu epäjohdonmukaisia, lopputulos on huono. Aiforia-analyysiohjelmasta saa hyödynnettyä tietoa koneen tekemistä analyyseistä ja niiden tarkkuudesta. Näiden tietojen avulla pystytään edelleen kehittämään algoritmia ja opettamaan sille lisää sellaisia tietoja, missä se on vielä epävarma.

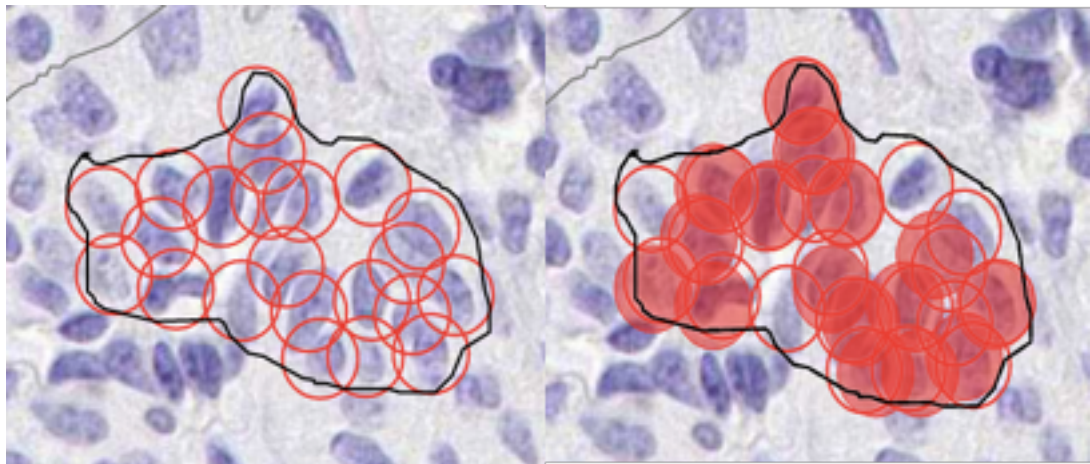
## 5.1 Tekoälyn opettaminen

Aiforian opettamista ja algoritmin luomista varten kävimme patologin kanssa läpi hänen näkemyksensä positiivisista ja negatiivisista soluista Ki-67-värjäyksessä. Teimme opetussarjan laseihin esimerkkialueita, joihin merkittiin positiiviset ja negatiiviset solut. Opetussarjana käytettiin yhtä TMA-lasia kustakin kuudesta suomalaisesta sairaalabiopankista. Näin saatiin opetussarjaan mahdollisimman kattavat esimerkit kaikista kasvainso-luvariaatioista.

Menetelmäksi positiivisten ja negatiivisten solujen tunnistukseen sovimme seuraavanlaisen toimintatavan: ensin katsotaan valitun alueen solut pienemmällä suurennoksella ja valitaan selvästi positiiviset solut, tämän jälkeen katsotaan epävarmoja soluja tarkem-malla suurennoksella ja valitaan niistä positiiviset solut. Positiivisen solun kriteerinä on se, että tuman taustasta ei kuulla yhtään sinistä väriä. Lopuksi merkitään negatiiviset solut.

Opetusta varten valitussa TMA-lasisarjassa oli kuusi objektilasia, yksi kustakin kuudesta eri suomalaisesta sairaalan yhteydessä toimivasta biopankista. Ki-67-algoritmin opetta-misen aloitin valitsemalla jokaisesta lasista useita kattavia alueita ja merkitsemällä niihin Ki-67-positiiviset ja -negatiiviset solut. Opetusalueet pidin mahdollisimman pieninä, jotta ne olisivat helposti tarkistettavissa ja systemaattisuus säilyisi koko opetusalueella. Ope-tusalueiden vierestä valitsin myös analyysialueen, jonka avulla pystyi kunkin opetuksen

jälkeen tarkistamaan algoritmin toimivuutta. Aluksi tein liian suuria opetusalueita, mutta kun kävin niiden tuloksia opetuksen jälkeen läpi, huomasin, että oli parempi tehdä useita pieniä opetusalueita kuin vähän ja suuria. Jaoin suurempia opetusalueita pienemmiksi niin, että niiden tarkastaminen oli helpompaa. Seuraavissa kuvissa kuviossa 3 on esimerkkikuvat algoritmin opetusalueista. Vasemmanpuoleisessa kuvassa näkyy punaisilla ympyröillä merkittynä mitä olen opettanut algoritmillemme ja oikeanpuoleisessa kuvassa näkyy punaisina läikkinä mitä algoritmi on oppinut.



Kuvio 3. Yksi opetusalue, jossa näkyy mitä algoritmillemme on opetettu (vas.) ja mitä se on oppinut (oik.).

Aloitin opetukset ensin pienemmällä solumäärällä ja vähäisemmällä toistoilla, kun harjoittelin itse vielä ohjelman käyttöä. Vähitellen lisäsin solumäärää ja suurensin opetuksia. Aiforialta tulleiden ohjeiden mukaan muokkasin opetusten asetuksia ja sain opetuksista parempia tuloksia. Opetusten pituus kasvoi loppua kohden 65 000 toistoon, jotta opetus jatkuisi niin pitkään kuin oppimista tapahtui. Jokaisen opetuksen jälkeen kävin manuaalisesti läpi kunkin opetusalueen ja tarkastin, miten hyvin algoritmi oli tunnistanut solut. Samalla tarkastin omat merkintäni ja niiden systemaattisuuden. Tarkastin myös analyysialueet ja kävin läpi, millaisissa soluissa on vielä tunnistusvaikeuksia ja saatoin lisätä opetusalueita tarpeen mukaan. Opetuksen loppuvaiheessa algoritmin yleistyvyyttä tarkasteltiin isommilta analyysialueilta. Näin sai paremman käsityksen siitä minkälaisen solujen tunnistuksessa algoritmillä on vielä vaikeuksia. Opetusten edetessä Aiforialle tuli uusia ohjelmistopäivityksiä, ja ne paransivat algoritmin oppimistuloksia ja -nopeutta.

Annotoitujen solujen määrä opetuksessa oli kaikkiaan melko suuri, 11 658 solua. Viimeisimmissä opetuksissa solujen määrästä positiivisia oli 354 ja negatiivisia 3 003. Alussa annotoin liian suuria alueita ja niissä systemaattisuus kärsi. Karsin suurimmat alueet pois opetuksesta loppua kohden, jotta sain ne hallittavampaan kokoon. Ki-67-positiiviset solut ohjelma oppi hyvin nopeasti ja virhetulkintoja tuli hyvin vähän. Negatiivisten solujen oppiminen oli ohjelmalle vaikeampaa. Negatiivisissa soluissa oli hyvin paljon enemmän variaatioita muodon ja värin suhteen. Algoritmin oli selvästi helpompi tunnistaa positiivisten solujen väri variaatiot. Koon ja muodon vaihtelut eivät vaikuttaneet kovinkaan paljon positiivisten solujen tunnistamiseen.

Algoritmin testaus suoritettiin ajamalla viisi rinnakkaista opetusta, joiden tuloksia verrattiin toisiinsa. Näissä tulokset näyttivät hyvin yhdenmukaisilta, joten algoritmi yleistyi hyvin. Tuloksista arvioitiin opetusten välistä toistettavuutta ja tulosten yhdenmukaisuutta. Taulukossa 1 on kuvattu rinnakkaisten testiajojen perusteella saatuja tuloksia.

Taulukko 1. Rinnakkaisten testiajojen tulokset.

Validointiajo	kokonaisvirhe %	väärät positiiviset %	väärät negatiiviset %	tarkkuus %	herkkyys %	F1 tulos %
Ajo 1	7,05	3,12	3,92	96,85	96,08	96,46
Ajo 2	7,22	3,36	3,86	96,92	96,14	96,38
Ajo 3	7,24	3,26	3,98	96,71	96,02	96,37
Ajo 4	7,43	3,48	3,95	96,51	96,05	96,26
Ajo 5	7,02	3,12	3,89	96,85	96,11	96,48
KA	7,192	3,268	3,92	96,768	96,08	96,39

Edellä olevassa taulukossa 1 kokonaisvirheprosentilla tarkoitetaan yhteenlaskettuna kaikkia vääriä positiivisia ja negatiivisia soluja kaikista analysoiduista soluista. Väärät positiiviset ovat kaikki virheellisesti tunnistettuja soluja. Väärät negatiiviset ovat kaikki virheellisesti tunnistamatta jääneitä soluja. Tarkkuussarake sisältää kaikki opetusalueen analyysitulokset verrattuna annotointeihin. Herkkyysarake sisältää analyysin löytämät annotaatioalueet opetusalueella. F1-tulos on tarkkuuden ja herkkyuden välinen harmoninen keskiarvo. (Aiforia 2020b).

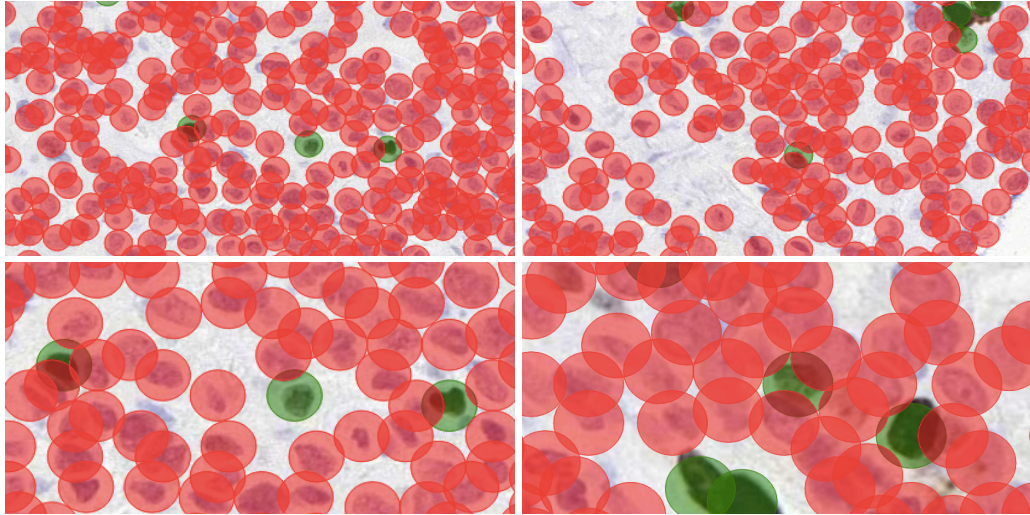
Opetusta jatkettiin korjailemalla annotointeja eli solujen merkintöjä virheprosenttien perusteella. Opetusmateriaalilla tehdyt testit käytiin läpi ja opetusalueilta, joissa oli suuret

virheprosentit, tarkastettiin annotointien oikeellisuus. Seuraavat opetukset tehtiin syvemmällä verkolla ja pidennettiin opetusta muuttamalla asetuksia. Analyysialueiden perusteella algoritmi tunnisti hyvin sekä positiiviset että negatiiviset solut. Virhettä tuli suurien ja pitkulaisten solujen kohdalla. Algoritmi tunnisti välillä pitkulaisia soluja kahdeksi tai kolmeksi soluksi. Seuraavassa kuviossa 4 on Aiforian analyysinäkymä viimeisimmän ajetun opetuksen tuloksille. Kuvassa näkyy kokonaisvirhe, sekä väärät positiiviset ja väärät negatiiviset sekä positiiviselle että negatiivisille soluille.

Total object error: 3.78 % >			
False positive: 1.58 %		False negative: 2.20 %	
Class	Error (FP / FN) %	Annotated	Results
positive >	0.28 (0.00 / 0.28)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
negative >	4.20 (1.76 / 2.43)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Kuvio 4. Analyysinäkymä Aiforiasta opetuksen tuloksille.

Tulosten perusteella päätettiin ottaa algoritmi testikäyttöön ja kokeilla, miten se käyttäytyy muilla kuin opetukseen käytetyillä näytteillä. Varsinaisina opetuksen ulkopuolisina testilaseina käytettiin osaa tutkimuksessa mukana olevista näytteistä. Ensimmäisten testiausten jälkeen tulokset vaikuttivat varsin rohkaisevilta. Algoritmin tarkkuutta tarkasteltiin manuaalisesti kuvien perusteella arvioimalla, kuinka hyvin algoritmi on tunnistanut solut oikein. Toisena arviointikeinona käytettiin vertailua samoista laseista QuPath-ohjelmalla tehtyihin analyyseihin. Ne korreloivat ensimmäisten testien perusteella hyvin. Näiden tulosten perusteella päätettiin ottaa algoritmi käyttöön ja analysoida tutkimusnäytteet. Kuviossa 5 on analyysialueelta otettuja kuvia, joiden perusteella päätettiin ottaa algoritmi käyttöön. Punaiset ympyrät ovat Aiforian tunnistamia negatiivisia soluja ja vihreät ympyrät ovat positiivisia soluja.



Kuvio 5. Aiforian tunnistamia soluja analyysialueella.

## 5.2 Näytteiden analysointi Aiforiolla

Tutkimusnäytteet analysoitiin Aiforiolla käyttäen opettamaani Ki-67-algoritmiä. Näytteiden valintaan laseilta käytettiin piirtotyökalua. Piirtotyökalun avulla valittiin lasilta halutut näytteet (ROI, Regions of Interest) ja nimettiin ne TMA-lasien spottien järjestysnumeroilla. Jokaisesta näytelasista saatiin tulokset kuvina ja taulukkomuodossa. Taulukossa olivat erikseen omilla riveillään negatiivisia ja positiivisia soluja koskevat tulokset. Ne yhdistettiin näytekohtaisesti samalle riville. Näin vertailu muiden näytteiden kanssa oli helpompaa.

Itse analyysin tekeminen Aiforiolla oli helppoa ja nopeaa. Halutut näytteet saatiin merkitä yksi kerrallaan ja analyysitulokset tulivat nopeasti. Myös tulosten tulostusmuoto oli käytännöllinen. Vain erilliset rivit negatiivisista ja positiivisista tuloksista lisäsivät työtä, eikä tieto ollut tarkoituksenmukainen minun opinnäytetyöni kannalta. Aiforiassa olisi myös ollut valittavana TMA-työkalu, jonka avulla ohjelma olisi erottanut TMA-spotit automaattisesti, mutta se ei toiminut halutusti. Piirtotyökalulla oikeiden spottien valinta oli melko helppoa.

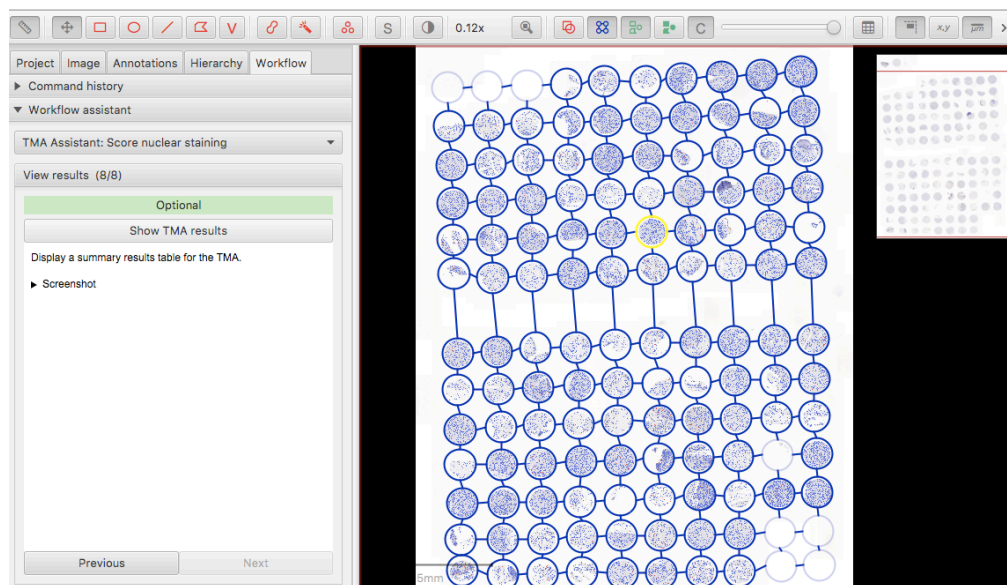
## 5.3 Näytteiden analysointi QuPath-ohjelmalla

QuPath on avoimeen lähdekoodiin perustuva ilmainen kuva-analyysiohjelma, joka on alun perin kehitetty Pohjois-Irlannissa (Queen`s University Belfast). Se on tarkoitettu

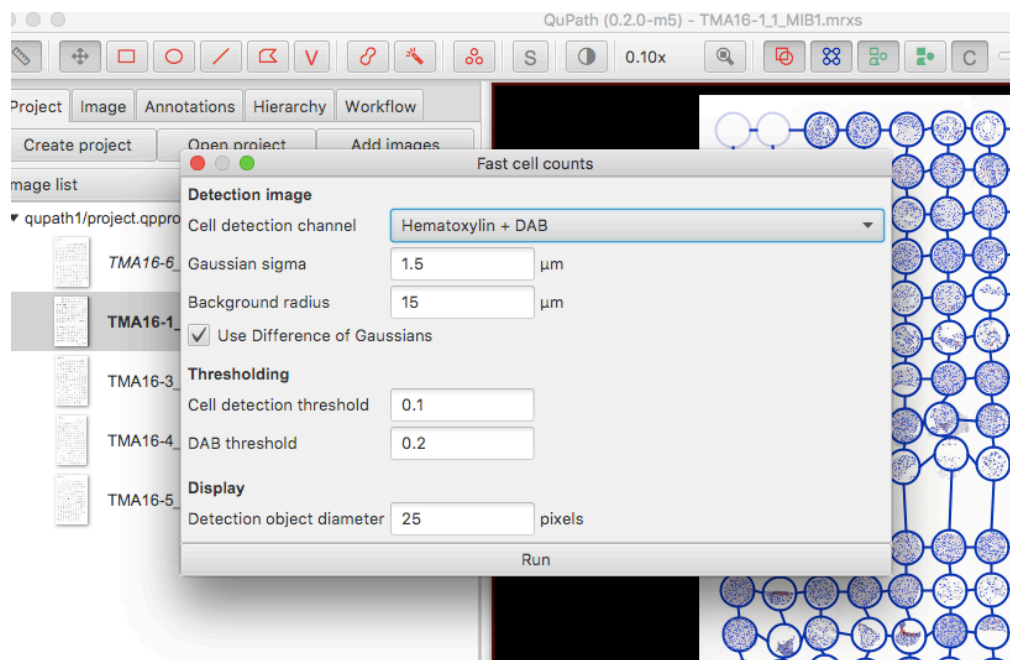


avuksi digipatologian kuva-analyyseihin. Ohjelman on tarkoitus olla helppokäyttöinen ja käyttäjien tarpeisiin mukautuva. Ohjelman toivotaan palvelevan sekä tutkijoiden että algoritmien kehittäjien tarpeita. QuPath ei lupaa kaupallista laatu- ja tukipalvelua. Se ei vastaa kliinisestä diagnostisesta laadusta vaan sopii paremminkin tutkimuskäyttöön. (QuPath 2019b.)

Tutkimusnäytteet analysoitiin QuPath-ohjelman versiolla 0.2.0. Ohjelman käyttöönoton apuna oli Helsingin yliopiston suupatologian laitokselle opiskelutyönä tehty käyttöohje. (Hämäläinen 2018.) Ohjeet eivät olleet aivan suoraan hyödynnettävissä, mutta niistä oli apua ohjelman käytön aloituksessa. QuPath-ohjelman työkalut olivat helppokäyttöisiä ja ohjelma opasti hyvin niiden käytössä. Ohjelmassa oli automaattinen TMA-tunnistin, jonka avulla tulokset kustakin TMA-spotista sai helposti. Tulokset saattoi tallentaa ohjelmasta taulukkomuodossa ja siirtää exceliin tulosten vertailua varten. Käytin näytelasin analysoimisessa QuPathin neuvomia työkaluja ja oletusasetuksia. Kommentisarja analyysiin oli: Analyze- Cell analysis- Fast cell count. Joidenkin lasien kohdalla jouduttiin käynnistämään analyysi useita kertoja, koska ohjelma jäi rullaamaan paikoilleen eikä ottanut käskyjä vastaan. En osaa sanoa oliko ongelma vain siinä, että tietokoneellani oli liikaa ohjelmia ja isoja tiedostoja vai oliko ongelma QuPathin toimivuudessa. Analyysit olivat nopeita silloin kun ne toimivat hyvin, mutta useat uusinta-ajot hidastivat työskentelyä. Seuraavissa kuvioissa 6 ja 7 on esimerkkikuvat QuPath-ohjelman analyysinäkymästä.



Kuvio 6. QuPath ohjelman analyysinäkymä



Kuvio 7. QuPathin analyysivalinta

QuPath-ohjelmalla analysoitiin kaikki viisi tutkimuksen verrokkilasia ja numeroitiin näytteet tuloksiin TMA-kartan perusteella. Näin oli helppo yhdistää oikeat näytteet keskenään muiden verrattavien näytteiden analyysituloksiin. Jokaiselle lasilla olevalle spotille annettiin järjestysnumero ja niiden avulla poimittiin kasvaimista otetut näytteet vertailuun.

#### 5.4 Näytteiden analysointi ImmunoRatio-ohjelmalla

ImmunoRatiota varten otettiin jokaisesta tutkimusnäytteestä kuva CaseViewer-ohjelmalla 13,5 suurennoksella. Yksi näyte oli vaikea rajata, joten sen tarkennukseen käytettiin 14,5 suurennoista. Koko määräytyi sen mukaan, että jokaisen näytespotin sai mahdollisimman tarkasti rajattua kuvaan ilman, että kuvaan tuli liikaa viereistä spottia. Jokainen kuva tallennettiin samalla numerolla, joita käytettiin QuPathissa ja Aiforiassa. Näin näytteiden yhdistäminen toisiinsa oli helpompaa. ImmunoRatio-analyysiä varten saatiin ohjeet analyysiparametrien säätämiseen ohjelman kehittäjältä. Niiden avulla saatiin helposti asetukset sellaisiksi, että ohjelma toimi melko hyvin. Jos olisin joutunut itse hakemaan kokeilemalla kaikki analyysiparametrit, niin olisi analyysiin mennyt hyvin paljon enemmän aikaa. Kuviossa 8 on ImmunoRation analyysinäkömästä esimerkkikuvat sekä käytetyt analyysiparametrit.

Drop image files here or [use the file browser](#)

TMA16-1\_143.jpg 2560 X 1548 Uploaded [Toggle mask editor](#) [Remove](#)

### Adjust analysis parameters

Sample ID (Optional)

Image scale ( $\mu\text{m}/\text{pixel}$ )

Hematoxylin intensity upper bound

Accepted hematoxylin-stained nucleus size range ( $\mu\text{m}^2$ )

DAB intensity upper bound

Accepted DAB-stained nucleus size range ( $\mu\text{m}^2$ )

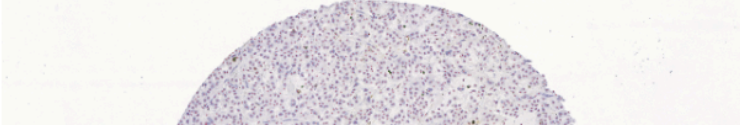
[Run Analysis](#) [Clear to defaults](#)

### Results

[Download CSV](#)

[Download image](#)

Total	H count = 4290	DAB count = 65	Res: 1.49%
TMA16-1_143.jpg	H count = 4290	DAB count = 65	Res: 1.49%



Hematoxylin intensity upper bound 200

DAB intensity upper bound 140

Image scale ( $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) 0,95

Accepted hematoxylin-stained nucleus size range ( $\mu\text{m}^2$ ) 59-1991

Accepted DAB-stained nucleus size range ( $\mu\text{m}^2$ ) 58-2007

Kuvio 8. ImmunoRatio analyysinäkymät sekä analyysiparametrit

ImmunoRatio toimi nopeasti, kun analysoi kerrallaan vain muutaman näytteen. Kun yritin analysoida useampia näytteitä samalla kertaa, ohjelma jäi jumiin ja jouduin analysoi-

maan näytteet uudelleen. Kahdesta kuuteen näytettä meni suhteellisen hyvin, mutta lopulta päädyin analysoimaan näytteet kahden näytteen sarjoina. Ensimmäiset näytteet analysoitiin yksitellen, mutta analysointi kaksi näytettä kerrallaan nopeutti työtä hieman. Tulokset tallentuivat analyysikohtaisesti kuva- ja taulukkomuodossa. Taulukoiden koaamiseen meni melko paljon aikaa, koska jokaisessa tulostaulukossa oli vain yksittäisen analyysiajon tulokset. Tulostaulukoiden kokoaminen oli siis melko työlästä ja vaati paljon tarkkuutta ja käsityötä. Valmiit analyysitulokset koottiin lasikohtaisesti excel-taulukoihin niille annettujen näytenumeroitten mukaan.

## 5.5 Tulosten analysointi

Analyysitulokset kerättiin excel-taulukoon. Jokaisesta näytelasista tehtiin omat laskentataulukot ja yhdistettiin kaikki analysoidut näytteet lasikohtaisesti omiin taulukoihinsa. Koska lähes jokaisesta kasvaimesta oli kaksi näytettä, niistä laskettiin spottien tulosten keskiarvo. Keskiarvoa pystyttiin sitten vertailemaan patologin analysoimiin kasvainkohtaisesti tuloksiin. Kuva-analyysiohjelmien välisiä tuloksia voitiin vertailla myös näytekohtaisesti jokaista spottia yksittäin.

Vertailuun otettiin mukaan vain näytteet, joissa oli tulos sekä patologin tekemästä analyysissä, että ohjelmilla tehdyistä analyyseistä. Kasvaimia pääsi mukaan vertailuun 127 kappaletta. Kaikki tulokset yhdistettiin samaan excel-taulukoon (liite 1) ja laskettiin SPSS-ohjelman avulla tulosten väliset korrelaatiot käyttäen Pearsonin korrelaatiokerrointa. Korrelaatioiden tilastollista merkitsevyyttä arvioitiin laskemalla korrelaatiokertoimien p-arvot. P-arvolla haetaan tukea sille, kuinka todennäköistä on saada vastaava korrelaatio ilman että perusjoukossa on korrelaatiota. Tilastollisella merkitsevyydellä pyritään näyttämään toteen, ettei saatu tulos ole sattumaa ja että tulos on yleistettävissä perusjoukkoon (Taanila 2019). Alhainen p-arvo kuvaa sattuman vähäistä osuutta tulokseen ja antaa tukea tuloksen yleistettävyydelle perusjoukkoon. Korkea p-arvo ei poista tuloksesta sattuman mahdollisuutta tuloksen selittäjänä. Tilastollisen merkitsevyyden yleensä käytettyjen raja-arvojen mukaan tulos on tilastollisesti merkitsevä, kun  $p \leq 0,05$  (Taanila 2019) ja erittäin merkitsevä, kun  $p \leq 0,001$  (Heikkilä 2014:7).

Kuvien avulla käytiin vielä läpi kaikki näytteet, joiden tuloksissa oli suurta poikkeamaa keskenään. Kunkin näytteen kohdalle kirjattiin huomiot näytteen laadusta ja mahdollisesta syystä tulosten suureen hajontaan.

## 6 Tulokset ja niiden tarkastelu

Tulosten perusteella voi todeta, että Aiforiolla tehty analyysi korreloi parhaiten patologin tekemään analyysiin. Aiforian ja patologin tulosten korrelaatio oli 0,94. Tämä tarkoittaa sitä, että tekoälypohjaisella kuva-analyysiohjelmalla on mahdollista saada hyvin samantaisia tuloksia kuin patologin tekemällä manuaalisella analyysillä. Seuraavassa taulukossa 2 on kuvattu kaikki analyysien väliset korrelaatiot.

Taulukko 2. Analyysien väliset korrelaatiot (n=127). (Pat=patologin analysoimat tulokset, AI=Aiforia, QP=QuPath, IR=ImmunoRatio, n=näytemäärä, sig=p-arvo)

		Pat	AI	QP	IR
Pat	Pearsonin korrelaatio	1	,942**	,601**	,732**
	p-arvo (2-suuntainen)		,000	,000	,000
	N	127	127	127	127
AI	Pearsonin korrelaatio	,942**	1	,658**	,760**
	p-arvo (2-suuntainen)	,000		,000	,000
	N	127	127	127	127
QP	Pearsonin korrelaatio	,601**	,658**	1	,912**
	p-arvo (2-suuntainen)	,000	,000		,000
	N	127	127	127	127
IR	Pearsonin korrelaatio	,732**	,760**	,912**	1
	p-arvo (2-suuntainen)	,000	,000	,000	
	N	127	127	127	127

\*\* . Korrelaatio on merkitsevä arvolla 0.01 (2-suuntainen).

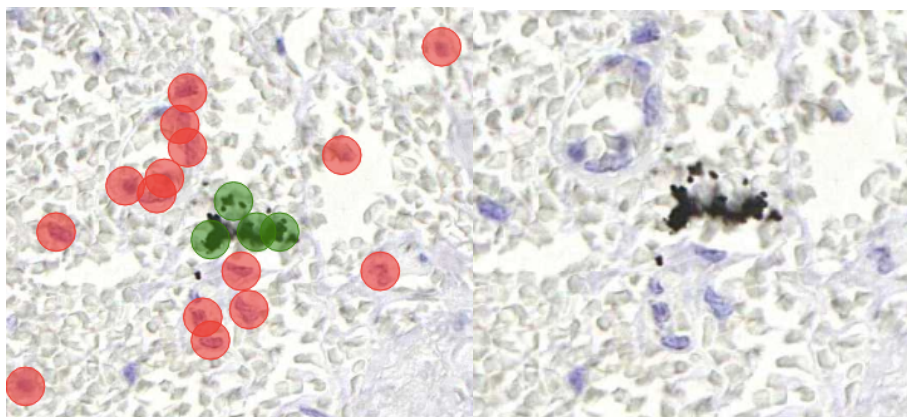
Taulukossa 2 olevien tulosten perusteella voidaan todeta, että Aiforian tulos korreloi erittäin hyvin patologin analyysiin verrattuna 0,94 (p-arvo < 0,001). P-arvon perusteella tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä. Todennäköisyys sille, että tulos johtuisi sattumasta, on hyvin pieni. Muihin ohjelmiin verrattuna Aiforia korreloi patologin tuloksiin parhaiten. Toiseksi parhaiten patologin tulosten kanssa korreloi ImmunoRatio 0,73 ja huonoiten QuPath 0,60. Kuva-analyysiohjelmien välisessä vertailussa parhaiten keskenään korreloivat ImmunoRatio ja QuPath 0,91. QuPathin ja ImmunoRation samankaltaisen toiminnon

taperiaatteen vuoksi oli odotettavissa, että niiden keskinäinen tulos oli näinkin yhdenmukainen. Tekoälyyn pohjautuvan Aiforian toimintaperiaate on erilainen, siten sen tuloksetkin poikkeavat ymmärrettävästi muista. Aiforian korrelaatio ImmunoRation oli 0,76 ja QuPathiin 0,66.

Aiempiin tutkimuksiin verrattuna tässä tutkimuksessa saadut tulokset ovat hyvin samansuuntaisia. Tekoälypohjaisella kuva-analyysiohjelmalla ja sille opetetulla laskenta-algoritmilla on päästy hyvin samanlaisiin tuloksiin kuin ihmisen manuaalisesti tekemällä analyysillä. (Penttinen ym. 2018:4, Turkki ym. 2019:41). Aiforiolla tehdyllä dopamiinineuronitutkimuksen tulosten perusteella Aiforiolla voidaan saada erittäin hyvin ihmisen laskeisiin tuloksiin korreloivia tuloksia. Tutkimuksessa ihmisen tekemän laskennan ja Aiforian tulosten välinen korrelaatio oli rotan näytteillä 0,9 ja hiiren näytteillä 0,93. (Penttinen ym. 2018:4-5). Myös muista automaattisista kuva-analyysiohjelmista on aiempien tutkimusten perusteella ollut hyötyä ja ne ovat tehostaneet näytteiden analysointia. (Bankhead ym. 2017:1; Gonzales-Gonzales ym. 2016:1; Remes ym. 2012:1359) Vaikka esimerkiksi aiempi tutkimus ImmunoRatiolla (Gonzales-Gonzales ym. 2016:5) ei päässyt korrelaatioissa ihmisen tekemään analyysiin verrattuna kovin hyviin tuloksiin, niin tässä tutkimuksessa ImmunoRatio suoriutui huomattavasti paremmin. Automaattisista kuva-analyysiohjelmista ImmunoRation tulos oli tässä tutkimuksessa toiseksi paras. Myös Remes ym. saivat ImmunoRatiolla erittäin hyvän korrelaation (yli 0,9) Ki-67-indeksin laskemisessa patologin tulokseen verrattuna. (Remes ym. 2012. 1359). Aiemmissä tutkimuksissa tekoälypohjaisella automaattisella kuva-analyysiohjelmalla (Caffe) tehdyllä tuman-tunnistusalgoritmilla päästiin 98% tunnistamistuloksiin. (Janowczyk - Madabhushi 2016:8.)

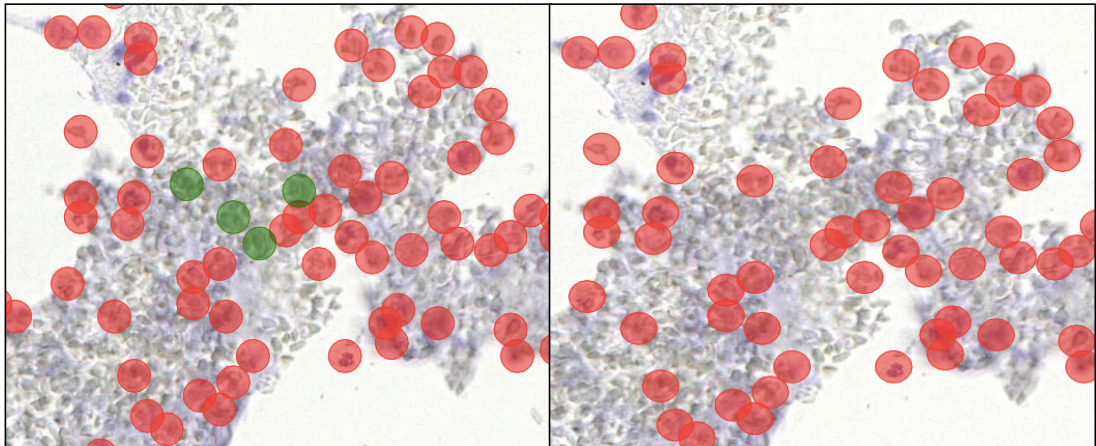
Suoraan tämän tutkimuksen mukaista aiempaa tutkimusta ei löytynyt. Automaattisilla kuva-analyysiohjelmilla on tehty erilaisia vertailuja, mutta solujen laskentaan perustuvia korrelaatioita ei tietokannoista tehdyistä hauista montaa löytynyt. Parhaiten tämän tutkimuksen kanssa oli verrattavissa Aiforiolla tehty dopamiinineuronitutkimus (Penttinen ym. 2018:1-8), jonka tulokset olivat hyvin linjassa tämän tutkimuksen Aiforian suoritumista koskevien tulosten kanssa. Monissa muissa julkaisuissa (esim. Turkki ym. 2019:41-52) tutkimusasetelma oli erilainen, mutta niistäkin tuloksista voidaan saada viitteitä samansuuntaisista tuloksista, vaikka mitattava asia olikin erilainen. Voidaan todeta, että automaattiset kuva-analyysiohjelmat ovat parhaillaan tutkimuksen kohteina ja niillä saadut tulokset ovat rohkaisevia. Automaattisten kuva-analyysiohjelmien välistä vertailua ei ole ilmeisesti tehty paljon, koska niitä käsitteleviä julkaisuja ei löytynyt.

Monissa tutkimuksissa (esim. Zarella ym. 2019:232) on käynyt ilmi, että näytteiden laadulla on digipatologiassa suuri merkitys. Kuva-analyysien vertailussa päästään tässä tutkimuksessa samaan lopputulokseen. Suurimmat erot kuva-analyysiohjelmien välillä tulevat esiin juuri 'huonojen/epäonnistuneiden' näytteiden kohdalla. Epäonnistunut värjäys ja värjäysartefakta lasilla lisäävät automaattisen kuva-analyysin laskentavirheitä. Myös näytteiden huono kiinnittyminen lasille ja siitä johtuva kudoksen repaleisuus ja ruttuisuus aiheuttavat virheitä automaattiseen kuva-analyysiin. Eri kuva-analyysiohjelmien välinen ero tuli parhaiten esiin juuri huonolaatuisempien näytteiden kohdalla. Parhaiten solujen tunnistamisessa onnistui Aiforia, silloinkin kun näytteessä oli huonoja kohtia. Ruttuisten näytteiden kohdalla Aiforia suoriutui hyvin, mutta värjäysartefakta oli Aiforiallekin vaikea tunnistaa. Tämä ero ilmeni hyvin, kun poistin tuloksista kaikki ruttuiset tai muuten epäedustavat näytteet ja laskin korrelaatiot patologin tuloksiin verrattuna. Aiforian korrelaatio ei parantunut paljonkaan, vaan oli nyt 0,95 kun taas QuPathin ja Immunoration tulokset paranivat huomattavasti. QuPathin ja patologin tulosten välinen korrelaatio oli nyt 0,81 ja Immunoratio 0,94. QuPath ja Immunoratio toimivat siis varsin hyvinä apuvälineinä automaattisessa kuva-analytiikassa, kun tehdään tarkat rajaukset halutusta analyysialueesta ja varmistetaan värjäyksen ja kudoksen hyvä laatu. Tämän perusteella voidaan todeta, että Aiforia toimii näistä ohjelmista parhaiten patologin tuloksiin verrattuna ja pystyy työskentelemään luotettavasti myös silloin, kun tarkkaa aluetta analyysille ei rajata. Huonommatkaan kudosalueet eivät juuri heikennä sen analysointikykyä. Hyvä puoli tekoälypohjaisessa ohjelmassa on juuri siinä, että algoritmiä voidaan opettaa lisää ja tuloksia näin ollen parantaa, kun huomataan joku systemaattinen virhe tai ongelma. Seuraavassa kuviossa 9 on esimerkki värjäysartefaktan aiheuttamasta väärästä positiivisesta tuloksesta Aiforia-ohjelmassa.



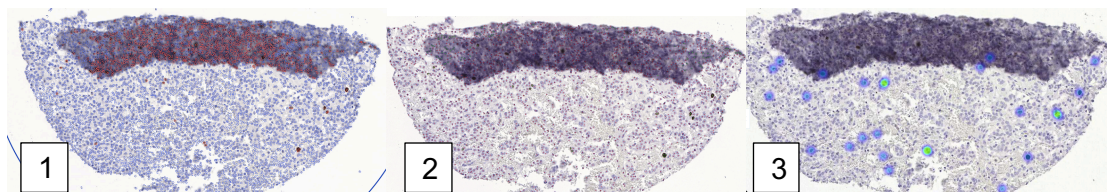
Kuvio 9. Värjäysartefaktan virheellinen tunnistaminen Aiforia-ohjelmassa.

Kuviossa 10 on esimerkki hyvin haalean ruskeasti värjäytyneen taustan aiheuttamasta väärästä positiivisesta tuloksesta Aiforialla. Tässäkin hieman epäonnistunut värjäys aiheuttaa tekoälylle tunnistusvirhettä, mutta lisää opettamalla voisi tällaisestakin virheestä päästä eroon.



Kuvio 10. Esimerkki väärin positiivisiksi tunnistetuista soluista Aiforialla haaleasti rusehtavaksi värjäytyneestä kudoksesta. Vasemmassa kuvassa väärät positiiviset, oikeassa kuvassa sama kohta ilman merkintöjä.

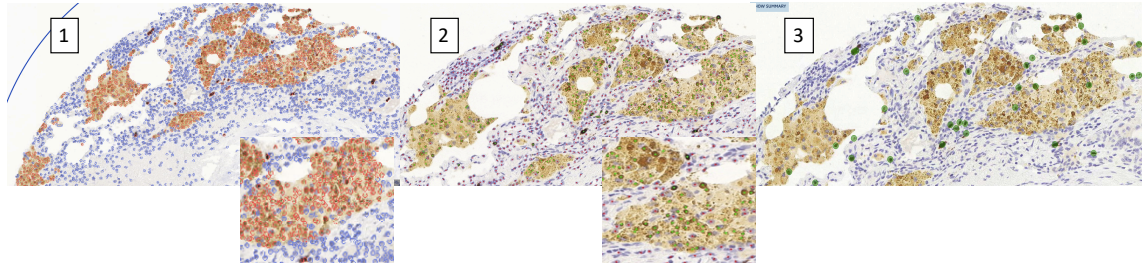
Kuviossa 11 on esitetty ruttuisesta näytteestä eri ohjelmien tekemä analyysitulokset. Kuvien perusteella voidaan havainnollistaa, kuinka paljon analyysivirhettä tulokseen voi tulla epäedustavan näytteen vuoksi. Aiforia on pystynyt parhaiten tunnistamaan oikeasti positiiviset solut huonolaatuisesta näytteestä.



Kuvio 11. Samasta näytteestä kuva (1) QuPath ohjelmasta, (2) ImmunoRatiosta ja (3) Aiforiasta. QuPathissa positiiviset solut merkitty punaisella, ImmunoRatiosta vihreällä ja Aiforiassa vihreällä/sinisellä. Tässä samassa näytteessä Ki-76-indeksit olivat QuPath 16.13 (kasvaimelle ka 8,4), ImmunoRatio 4.95 (kasvaimelle ka 3,1), Aiforia 1.11 (kasvaimelle ka 1,4). Patologin tulos kasvaimelle oli 1.



Kuviossa 12 esitellään esimerkkikuvasarja, jossa on hyvin nähtävillä miten paljon vähemmän vääriä positiivisia soluja Aiforia on laskenut muihin ohjelmiin verrattuna huonosti onnistuneen värjäyksen tuloksena hyvin voimakkaasti ruskeaksi värjäytyneeltä alueelta. Aiforian kuvasta on jätetty pois negatiivisten solujen tunnistus, jotta kuvaa olisi helpompi tulkita. Muissa kuvissa on myös negatiiviset solut merkitty.



Kuvio 12. Esimerkki värjäys/kudosartefaktan vaikutuksesta analyysitulokseen. Kuva 1. QuPath Ki-67-indeksi 16,51 (ka kasvaimelle 8,5) positiiviset solut punaisella, kuva 2. Immuno-Ratio Ki-67-indeksi 11,18 (ka kasvaimelle 5,8) positiiviset solut vihreällä, kuva 3. Aiforia Ki-67-indeksi 2,3 (ka kasvaimelle 1,4) positiiviset solut vihreällä. Patologin tulos kasvaimelle oli 1.

Tässä opinnäytetyössä saadut tulokset ovat vahvasti samansuuntaisia muiden aiheesta tehtyjen tutkimusten kanssa, vaikka täysin vastaavia tutkimuksia ei olekaan montaa julkaistu. Tutkimusten (esim. Bankhead ym. 2017:4) mukaan tekoälyä hyödyntävillä ohjelmissa saadaan apua vaativiin ja aikaa vieviin työtehtäviin. Sen avulla saadut tulokset ovat hyvin lähellä ihmisen saamia tuloksia. Tekniikka ja osaaminen kehittyvät koko ajan ja tekoälyn käytön etuna on sen joustavuus ja muokattavuus. Algoritmia voidaan tarpeen mukaan parantaa ja uudelleen opettaa erilaisten näytteiden analysointia varten. Hyvällä opetuksella algoritmista saadaan tehokas ja tasalaatuinen apuväline näytteiden työläseen analysointiin.

Lähivuosina tekoälyä hyödyntävä digipatologia on jo jonkinasteisesti rutiinikäytössä ja sen myötä parannetaan patologien työskentelyolosuhteita, yhdenmukaistetaan laboratorioden työtapoja ja tehostetaan potilaiden hoitoa.

Tässä opinnäytetyössä keskityttiin tekoälyä hyödyntävän Aiforian opettamiseen ja sen suoriutumiseen suhteessa patologin tekemään manuaaliseen analyysiin. Muut ohjelmat toimivat lähinnä verrokkeina.

Vaikka tekoälyn opettaminen oli aikaa vievä ja työläs prosessi, on tämän opinnäytetyön tulosten perusteella huolellisen työn avulla mahdollista päästä erittäin hyviin tuloksiin.

Tekoälystä on mahdollista kehittää tarkka apuväline patologiaan, mikä vähentää patologin manuaalista työtä merkittävästi. Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella tekoäly on tarkempi kuin muut tässä tutkimuksessa käytetyt analyysiohjelmat. Hyvin tehdyn tekoälyopetuksen pohjalta voidaan jatkossa muokata ja uudelleen opettaa tekoälypohjaista kuva-analyysiohjelmaa myös muiden kudoksenäytteiden analysointiin.

## 7 Pohdinta

Tässä luvussa pohdin opinnäytetyöni luotettavuutta, tutkimuksen otosta ja sen riittävyyttä sekä etiikkakysymyksiä. Käyn myös läpi kokonaisuudessaan työn suoritukseen ja tuloksiin liittyviä tekijöitä. Tekoälyn opettamiseen liittyviä kysymyksiä ja kokemuksia sekä siihen pohjautuvia ajatuksia tuon myös tässä luvussa esiin.

### 7.1 Eettiset kysymykset

Tässä kappaleessa pohdin opinnäytetyöhöni liittyviä eettisiä kysymyksiä. Eettiset pohdinnat liittyvät tutkimusmateriaaliin ja tutkimukseen liittyviin sidosryhmiin sekä tutkimuksen toteuttamiseen.

Opinnäytetyössäni vastaan tulleet eettiset kysymykset ovat esimerkiksi analysoitaviin näytteisiin liittyviä. Tutkimusnäytteeni ovat Helsingin Biopankilta kerätyjä näytteitä. Näytteiden käsittelyssä noudatetaan Biopankkilakia ja EU:n tietosuojasetusta. Näytteiden luovuttajilla on oikeus tietää, missä tutkimuksessa heidän näytteitään käytetään. Tiedon saa Helsingin Biopankista kysymällä ja biopankin internetsivuilla on tietoa kaikista meillä olevista tutkimuksista. (Helsinginbiopankki 2020b) Opinnäytetyöni on osa suurempaa tutkimuskokonaisuutta, jossa tutkitaan neuroendokriinisiä kasvaimia, joten minun ei ole tarvinnut hakea tutkimuslupaa tai eettisen lautakunnan lupaa, vaan ne on hoidettu aiemmin koko tutkimusprojektille.

Tutkimuksessa käytettävät näytteet on koodattu niin, että näytteiden luovuttajien henkilötietoja ei käsitellä. Tässä suhteessa potilaan henkilötiedot ovat hyvin suojassa eikä ole vaaraa, että julki tulisi mitään potilaita identifioivia tai arkaluontoisia tietoja.

Yksi eettinen kysymys on myös se, että tutkimuksessa selvitetään kaupallisen yrityksen tuotteen toimivuutta tutkimukseen lahjoitettujen biopankkinäytteiden avulla. Onko tästä taloudellista hyötyä yritykselle? Toisaalta tavoitteena on kuitenkin saada potilaille parempaa hoitoa ja nopeampia diagnooseja. Tämä tavoite palvelee potilaiden etua ja on yhteiskunnallista ja henkilökohtaista lisäarvoa tuottavaa. Biopankkinäytteitä saa käyttää tutkimuksen lisäksi tuotekehitykseen ja katson opinnäytetyöni aiheen tuotekehitykseen liittyväksi, koska tavoitteena on saada patologiien käyttöön rutiinidiagnostiikkaan tasalaa- tuista analyysiä nopeasti tekevä apuväline. Biopankkilaissa ja elinlaissa on säädetty, että sairauden diagnosoinnin tai hoidon vuoksi irrotettuja kudoksia saa käyttää tutkimuksessa ja niitä voidaan siirtää biopankkiin. (Elimien, kudoksien ja solujen talteenotto 547/2007 §6; Biopankkilaki 688/2012 §13)

Kokonaisuudessa olen pyrkinyt ottamaan huomioon tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohjeistuksen hyvän tutkimustavan noudattamisesta. Huomioin omassa työskentelyssäni avoimuuden ja läpinäkyvyyden ja muun tieteellisen näytön aiheesta. (tenk.fi 2012:8). Tutkimustulosten analysoinnissa ja tulosten vertailussa olen pyrkinyt olemaan mahdollisimman objektiivinen ja tuomaan esiin työskentelytapani sekä tuloksista tekemäni tulkin- nat avoimesti.

## 7.2 Luotettavuuden tarkastelu

Kvantitatiivisen tutkimuksen olennaiset arviointikriteerit ovat tutkimuksen validiteetti ja reliabiliteetti. Validiteetilla arvioidaan tutkimuksen vastaavuutta sen tarkoituksen kan- nalta. Tutkitaanko sitä mitä uskotaan tutkittavan ja vastaavatko tutkimuskysymykset tar- koituksenmukaiseen kysymykseen? Onko valittu mittari oikea tuomaan esiin vastaukset tutkittavaan ilmiöön liittyviin kysymyksiin. (Hiltunen 2009). Tilastollisten menetelmien ja mittareiden valinnassa, on pidettävä vahvana mielessä työhön liittyvät tutkimuskysymyk- set. On valittava sellaiset mittarit, jotka vastaavat juuri opinnäytetyön tavoitteissa ja tar- koituksessa määritettyihin tutkimuskysymyksiin.

Reliabiliteetilla kuvataan tutkimuksen luotettavuutta. Reliabiliteetti kuvaa tutkimuksen toistettavuutta ja tulosten yhdenmukaisuutta. Saadaanko samankaltaisia tuloksia, kun tutkimus toistetaan eri näytteillä tai otoksella? Tällä voidaan arvioida tutkimuksen ja tu- losten luotettavuutta. (Hiltunen 2009). Luotettavuudessa tulee arvioida myös tutkittavien näytteiden soveltuvuutta tutkimukseen. Omassa tutkimuksessani näkisin tutkittavan ma-

teriaalin olevan hyvinkin soveltuva, koska koko tutkimuksen tulos rakentuu näytelähtöisesti. Tutkimuksessani halutaan nimenomaan tulokset näistä näytteistä, koska ne ovat oleellisia suurempaan kokonaisuuteen kuuluvassa tutkimuksessa.

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa täytyy pohtia otoskoon riittävyyttä (Vilkkä 2007:52). Kokonaisotannalla tutkimuksen otoskoko on 127. Onko 127 tuumoria riittävä määrä tuottamaan luotettavaa tulosta? Saako ohjelmien vertailulla niin paljon variaatiota 127 tuumorin tuloksista, että ne antaisivat todellisen kuvan ohjelmien analyysikyvyistä? Luotettavuutta tutkimussarjassa lisää se, että näytteitä on eri laseilta ja eri näyteblokeista. Opetuksessa käytettiin kuuden eri biopankin näytelaseja, joten opetusmateriaalissa oli laadullista vaihtelua ja näin ollen se antoi monipuolisemman pohjan opetukselle ja enemmän variaatiota opetussoluille.

Määrällisen tutkimuksen yksi tunnuspiirre on sen objektiivisuus, mikä edellyttää, ettei tutkijan henkilö vaikuta tutkimuksen lopputulokseen (Vilkkä 2007:13). Ongelman tässä tilanteessa muodostaa se, että kyseessä on myös toiminnallinen tutkimus, jossa olen itse aktiivisesti osallistumassa koneoppimisen kautta. Aiforian algoritmin opettamisessa yksi laatuun vaikuttava kysymys on, olenko pystynyt olemaan koneen opettamisessa riittävän johdonmukainen ja objektiivinen. Kone oppii analysoimaan näytteitä antamieni opetusten perusteella. Vaikka yritin olla hyvin tarkka ja antaa monipuolisesti erilaisia esimerkkejä, pystyinkö poistamaan koneoppimisesta oman näkemykseni vaikutuksen ja aikaansaamaan objektiivisesti tietoa käsittelevän algoritmin? Lopputulos saattaa vinoutua paljonkin, ellei algoritmin opettamisessa pysty olemaan tarpeeksi monipuolinen. Tätä ongelmaa yritin välttää käymällä ohjaajani kanssa läpi merkitsemäni opetusalueet ja varmistamalla, että näkemykseni on ollut johdonmukainen hänenkin mielestään. Ennen opetusten aloittamista kävimme yhdessä patologin kanssa läpi hänen näkemyksensä positiivisista ja negatiivisista soluista ja sen strategian perusteella olen pyrkinyt tekemään omaa työtäni. Yksi osa luotettavuuden parantamista ovat myös riittävän suuret toistot ja riittävä opetusalueiden ja solujen lukumäärä. Olen pyrkinyt ottamaan mukaan monipuolisesti opetusalueita kaikista opetuslaseista.

Tässä tutkimuksessa muiden automaattisten kuva-analyysiohjelmien tuloksiin saattaa vaikuttaa se, että ohjelmien käytöstä ei ollut aiempaa kokemusta. Analyysiparametrien säätämiseen perehtymisellä olisi voinut saada ImmunoRatiolla ja QuPathilla toisenlaisia tuloksia. Toisaalta tilanne tässä tutkimuksessa oli hieman samanlainen kuin mitä tahansa ohjelmia käyttöön otettaessa. Analyysiparametrien säätäminen vaatii tarkempaa

perehtymistä ohjelmien teknisiin ominaisuuksiin ja kyseisiä ohjelmia käyttävillä ei välttämättä ole syvällistä osaamista ja ymmärrystä näistä aihealueista. Tämän johdosta käyttäjät saattavat tyytyä käyttämään ohjelmien perusasetuksia ja tekemään analyysit niiden avulla. ImmunoRation analyysiparametreihin saatiin apua tässä tutkimuksessa ohjelman kehittäjältä, mutta tarkempia testauksia erilaisista säädöistä ei toteutettu.

Tuloksiin on vaikuttanut mahdollisesti myös analyysien tekotapa. Patologin analyysitulokset on tehty valituista ”hot spoteista” koko kasvaimen tutkimusalueelta. Automaattisten kuva-analyysiohjelmien tulokset on tehty kokonaisista TMA-spoteista vain kahden kasvainnäytteen perusteella. Analyysialueelta ei ole jätetty pois epäonnistuneita kohtia tai analyysin kannalta epäedustavia alueita. Näin ollen kokonaistuloksista voidaan vetää se johtopäätös, että Aiforia pystyy analysoimaan parhaiten kaikenlaisia alueita eikä tee virhearvioita myöskään epäedustavista tai epäonnistuneista näytealueista.

Oman opinnäytetyöni jälkeen olisi jatkotutkimuksena tarpeen tehdä testauksia erilaisilla kudoksilla. Näin voitaisiin saada vahvistusta minun opinnäytetyöni reliabiliteettiin, jos tulokset olisivat yhdenmukaisia.

### 7.3 Pohdintaa tekoälyn opettamisesta

Myös välineistön teknisten vaatimusten osalta voidaan todeta, että hyvinkin vähäisillä panostuksilla erityiseen tekniikkaan voidaan saada aikaan hyvää tulosta, kun työskennellään pilvipohjaisella ohjelmalla. Koko tekoälyn opetus tapahtui omalla kannettavalla Mac-tietokoneella ja sen näytöllä. Solujen värjäytyvyyden tulkintaan vaikutti paljon näytön asento ja kirkkaussäädöt sekä valaistus. Suurelta pöytäkoneen näytöltä värjäytyvyys saattoi näyttää hyvin erilaiselta. Siitä huolimatta opetustulos oli erittäin hyvä. Voi vain arvailla, miten hyvän tuloksen voisikaan saavuttaa, kun koko opetuksen tekisi suurelta näytöltä tasalaatuisessa valaistuksessa. Aiempien tutkimusten mukaan teknisten laitteiden ominaisuudet ovat suuressa roolissa digipatologian onnistuneessa toteuttamisessa. Osittain tämä pitääkin paikkansa varsinkin silloin, kun käytetään perinteisiä kuva-analyysiohjelmia. Silloin tarvitaan paljon muistia kuvatiedostojen tallentamiseen. Pilvipohjaisella ohjelmalla ja selaimella työskenneltäessä tärkeä tekninen seikka on hyvä ja varmatoiminen internetyhteys. ImmunoRatio toimii selainversiona eikä itse analyysi vaadi suurta kapasiteettia tietokoneelta, mutta kuvien ja tulosten tallentamiseen tarvittiin ulkoista kovalevyä, koska kuvatiedostojen tallentaminen vaatii paljon tilaa. QuPath-ohjelma toimi koneelle asennettuna ja myös sen tuloksia varten tarvittiin ulkoista kovalevyä, jotta

kaikki tuloskuvat saatiin tallennetuksi. Aiforiaa käytettiin vain selaimella ja kaikki kuvat ja tulokset ovat saatavilla selaimen kautta, joten mitään kuvatiedostoja ei tarvinnut tallentaa omalle koneelle, kun materiaalit oli ladattu pilveen.

Tekniset asiat toivat opettamiseen välillä pientä hankaluutta, mutta nämä ongelmat ovat kaikki helposti ratkaistavissa. Tietokonehiiren laadulla oli suuri merkitys työn sujuvuuden kannalta. Kun piirsi Aiforian opetuksessa opetusalueita ja merkitsi soluja, oli se optisella hiirellä melko vaikeaa. Omien merkintöjen ja annotointien korjailu oli erittäin työlästä ja tarkoitukseen soveltumattomalla hiirellä se oli vielä työläämpää. Helpompaa olisi ollut hankkia heti työn aluksi tarkkaan työhön soveltuva hiiri ja tehdä kaikki merkinnät alun perin tarkasti, ettei olisi tarvinnut jälkikäteen niitä korjailla. Myös isompi näyttö olisi voinut olla hyvä investointi. Sen avulla tarkat rajat olisi saanut paremmin näkyviin ja soluista olisi saanut isommat suurennokset.

Tekoälyn opettamisesta saamani kokemuksen perusteella uskon, että tekoälyn opettaminen on mahdollista toteuttaa erilaisille värjäyksille ja kudoksille, kun halutaan laajentaa automaattisen kuva-analyysin hyödyntämistä. Muun työn ohessa uuden algoritmin opettaminen ei varmastikaan onnistu, vaan siihen täytyy olla työntekijällä aikaa paneutua. Aiforia oli helppokäyttöinen ja itse opetustyön omaksui nopeasti, mutta riittävän solumäärän opettamiseen menee aikaa. En osaa sanoa, kuinka nopeasti Aiforan valmiita algoritmeja saisi uudelleen opetetuksi, mutta jos henkilö pystyy keskittymään työhönsä kunnonlla, niin opettaminenkin käy nopeammin. Jos opetuksen tekee joku muu kuin patologi, on tärkeää, että opetuksen suorittaja saa hyvän perehdytyksen patologin näkemyksestä solujen määrittelyyn. Opetuksen edistyessä olisi hyvä pitää välillä yhteisiä katsauksia analyysi- ja opetustuloksiin, jotta hyvä systemaattisuus säilyy ja opettajan näkemys soluista pysyy oikeana.

Algoritmin valmistumiseen olisi hyvä olla olemassa valmiit ”säännöt”, joiden mukaan voisi toimia. Ohjeessa olisi hyvä olla määriteltynä tietty tavoitetaso. Tällaiseen voisi sisältyä esimerkiksi joku tietty virhemarginaali analyysituloksissa ja opetustuloksissa. Hyvä apuväline olisi myös esimerkiksi tämän tutkimuksen mukainen verrokinäytesarja patologin tuloksista. Kun tekoälypohjainen kuva-analyysi otetaan rutiinikäyttöön, pitää algoritmilta luoda jonkinlainen validaatiosarja ja tulostenvarmennusmenetelmä.

Aiforialla on opetukseen olemassa hyvät tukipalvelut, josta saa nopeasti apua esimerkiksi erilaisten parametrien valintaan. Myös erilaisia tilanteita varten löytyy ohjeita ja opetusvideoita, joiden avulla pääsee eteenpäin.

#### 7.4 Tekoälypohjaisten analyysimenetelmien tulevaisuuden näkymiä

Tekoälypohjaisilla analyysimenetelmillä on tämän tutkimuksen tulosten perusteella hyvät edellytykset diagnostisiksi apuvälineiksi patologiaan. Tämän opinnäytetyön perusteella voi todeta, että tekoälypohjainen kuva-analyysi on tarkempi kuin perinteiset automaattiset kuva-analyysiohjelmat. Edelleen osa aiemmissa tutkimuksissa esiin tulleista ongelmista, kuten näytteiden laatu, on ratkaistava. Tekoälypohjainen kuva-analyysiohjelma suoriutui paremmin näytteiden vaihtelevasta laadusta kuin muut ohjelmat, mutta siinä suhteessa voisi kuitenkin olla vielä parannettavaa.

Aivan itsenäiseen diagnosointiin ei automaattisilla kuva-analyysiohjelmillä varmastikaan vielä päästä, mutta tämän opinnäytetyön ja muun aiemman tutkimuksen perusteella on selvää, että tekoälypohjaisilla menetelmillä saadaan luotettavaa apua diagnoosien tekemiseen. Aiforia tarjoaa patologeille luotettavasti nopeampia analyysejä, ja se auttaa lääkäreitä tekemään potilaiden hoidon kannalta parhaita päätöksiä tehokkaammin. Tekoälyn käyttö lisääntyy lähitulevaisuudessa varmasti kaikilla lääketieteen tutkimuksen ja hoidon alueilla. Tekoälyn avulla voidaan myös vastata resurssipulaan ja saada edelleen tehokasta ja hyvää hoitoa vähemmällä resursseilla. Lisää tällaista tutkimusta tarvitaan, jotta voidaan laajentaa tekoälyn käyttöä ja edelleen varmistaa mahdollisimman luotettava potilaiden hoidon tehokkuus ja kehitys. Hyvin opetetulla tekoälyalgoritmeilla saadaan luotettavaa, väsymätöntä, systemaattista ja nopeaa analyysitulosta patologin työskenteilyn apuvälineeksi.

## 8 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tulosten perusteella tekoälypohjainen kuva-analyysiohjelma Aiforia toimii paremmin Ki-67-värjättyjen keuhkokarsinoidinäytteiden analysoinnissa kuin perinteiset kuva-analyysiohjelmat ImmunoRatio ja QuPath patologin analyysiin verrattuna. Aiforia suoriutuu selvästi muita ohjelmia paremmin, kun analyysialuetta ei ole tarkasti rajattu vaan osassa näytteitä on myös epäonnistuneita näytealueita. Ohjelmien keskinäisessä

vertailussa hyvälaatuisissa näytteissä Aiforia ja ImmunoRatio suoriutuvat analyysistä lähes yhtä hyvin, mutta kun mukana ovat kaikki näytteet, on Aiforia selvästi paras. QuPath jäi heikoimmaksi kaikissa vertailuissa. Tekoälyalgoritmillä voidaan siis tuottaa vähemmällä vaivalla luotettavia analyysituloksia patologin työn tueksi.

Opinnäytetyön tuloksia voidaan hyödyntää automaattisten kuva-analyysiohjelmien käyttöönotossa. Kun halutaan valita diagnostiseen käyttöön apuvälineeksi automaattisia kuva-analyysiohjelmia, saadaan opinnäytetyöni tuloksista hyviä esimerkkejä näiden kolmen kuva-analyysiohjelman toiminnasta ja tekoälyn mahdollisuuksista. Ki-67-indeksin laskennan automatisoinnin mahdollistamiseen keuhkokarsinoidinäytteillä tällä opinnäytetyöllä saadaan vahvaa näyttöä. Jatkotutkimusaiheina olisi tärkeää tehdä samanlaisia vertailuja muillakin kasvainkudoksilla ja biomarkkereilla, jotta tuloksia voitaisiin yleistää patologian diagnostiikkaan.



## Lähteet

Aiforian internetsivu a<<https://www.aiforia.com>> luettu 12.2.2019

Aiforian internetsivu b<<https://fimmic.atlassian.net/wiki/spaces/SER/pages/461832227/How+to+read+training+region+verification>> Luettu 28.1.2020

Biopankkilaki 688/2012 §13 Verkojulkaisu  
<<https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2012/20120688#L3>> Luettu 24.9.2019

Bankhead, Peter - Loughrey, Maurice B - Fernández, José A. - Yvonne Dombrowski, Yvonne - McArt, Darragh G. - Dunne, Philip D. - McQuaid, Stephen - Gray, Ronan T. - Murray, Liam J. - Coleman, Helen G. - James, Jacqueline A. - Salto-Tellez, Manuel - Hamilton, Peter W. 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports* volume 7:16878:1-7

Cavalcanti, Marcela S. - Gönen, Mithat - Klimstra, David S. 2016. The ENETS/WHO grading system for neuroendocrine neoplasms of the gastroenteropancreatic system: a review of the current state, limitations and proposals for modifications. *International journal of endocrine oncology*, 3(3), 203–219.

Clay V. - Papaxoinis G. - Sanderson B. - Valle J.W. - Howell M. - Lamarca A. - Krysiak P. - Bishop P. - Nonaka D. - Mansoor W. 2017. Evaluation of diagnostic and prognostic significance of Ki-67 index in pulmonary carcinoid tumours. *Clinical and Translational Oncology* 19:579–586

Fraggetta, Filippo - Garozzo, Salvatore - Zannoni, Gian Franco - Pantanowitz, Liron - Rossi, Esther Diana 2017. Routine Digital Pathology Workflow: The Catania Experience. *Journal of Pathology Informatics* 8.1:51:1-6

González-González, Rogelio - Molina-Frechero, Nelly - Carreón-Burciaga, Ramon G. - López-Verdín, Sandra - Robles-Bonilla, Carlos - Pereira-Prado, Vanesa - Bologna-Molina, Ronell 2016. Comparison between Manual and Automated Methods for Ki-67 Immunoreexpression Quantification in Ameloblastomas. *Analytical Cellular Pathology* Volume 2016:1-8. Article ID 7486989

Hart, S. N. 2018. Will digital pathology be as disruptive as genomics? Journal of Pathology Informatics. 9.1:27

Heikkilä, Tarja 2014. Muuttujien väliset riippuvuudet – esimerkkejä. Edita Publishing Oy Verkkojulkaisu < <http://www.tilastollinentutkimus.fi/5.SPSS/Riippuvuudet.pdf>> Luettu 15.9.2019

Helsingin biopankin internetsivu a <<https://www.helsinginbiopankki.fi/fi/biopankki>> Luettu 19.2.2020

Helsingin biopankin internetsivu b <<https://www.helsinginbiopankki.fi/fi/suostumus-ja-suostumuksen-antajan-oikeudet>> Luettu 14.2.2020

Hiltunen Leena, 2009. Graduryhmä 18.2.2009. Jyväskylän Yliopisto. Verkkojulkaisu <[http://www.mit.jyu.fi/OPE/kurssit/Graduryhma/PDFt/validius\\_ja\\_reliabiliteetti.pdf](http://www.mit.jyu.fi/OPE/kurssit/Graduryhma/PDFt/validius_ja_reliabiliteetti.pdf)> Luettu 17.4.2019

Hämäläinen Juha, 2018. Immunohistologisten värjäysten digitaalinen analysointi – katsaus vaihtoehtoihin ja toteutus käyttäen QuPath-ohjelmistoa. Tutkielma. HELSINGIN YLIOPISTO Lääketieteellinen tiedekunta <[https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/278391/Hamalainen\\_Juha\\_Pro\\_gradu\\_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/278391/Hamalainen_Juha_Pro_gradu_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y)> Luettu 18.3.2019

Immunoratio internetsivu <<http://153.1.200.58:8080/immunoratio/?locale=fi>> Luettu 12.2.2019

Janowczyk, Andrew - Madabhushi, Anant 2016. Deep learning for digital pathology image analysis: A comprehensive tutorial with selected use cases. Journal of Pathology Informatics. 7:29:1-18

Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä: Elimien, kudoksien ja solujen talteenotto 547/2007 §6 Verkkojulkaisu <<https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2001/20010101#L3>> Luettu 15.4.2019

Madabhushi, Anant – Lee, George 2016. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis* 33:170–175.

Marchiò, Caterina - Gatti, Gaia - Massa, Federica - Bertero, Luca - Filosso, Pierluigi - Pelosi, Giuseppe - Cassoni, Paola - Volante, Marco - Papotti, Mauro 2017. Distinctive pathological and clinical features of lung carcinoids with high proliferation index. *Virchows Archiv: European Journal of Pathology* 471:713–720

Mea, Vincenzo Della - Baroni, Giulia L. - Pilutti, David - Di Loreto, Carla 2017. SlideJ: An ImageJ plugin for automated processing of whole slide images. *Plos one* 12(7):1-9

Mea, Vincenzo Della - Carbone, Antonino - Di Loreto, Carla - Bueno, Gloria - De Paoli, Paolo - García-Rojo, Marcial - de Mena, David - Gloghini, Annunziata - Ilyas, Mohammad - Laurinavicius, Arvydas - Rasmusson, Allan - Milione, Massimo - Dolcetti, Riccardo - Pagani, Marco - Stoppini, Andrea - Sulfaro, Sandro - Bartolo, Michelangelo - Mazzon, Emanuela - Soyer Peter H. - Pantanowitz, Liron 2017. Teaching Digital Pathology: The International School of Digital Pathology and Proposed Syllabus. *Journal of Pathology Informatics* 8.1:27

Mäkinen, Markus 2012. Histopatologinen diagnostiikka. Oppiportti: Kustannus Oy Duodecim Verkkojulkaisu <<https://www.oppiportti.fi/op/pat00730/do>> Luettu 24.9.2019

Mäkinen, Markus - Lehto, Veli-Pekka 2012. Patologian varhaisvaiheet. Oppiportti: Kustannus Oy Duodecim Verkkojulkaisu <<https://www.oppiportti.fi/op/pat00880/do>> Luettu 24.9.2019

Newcomersupply kuvatiedosto <<https://images.app.goo.gl/iG1U6EdPam5YZu4J9>> Luettu 17.3.2020

Nurminen, Jaana 2004. Bioanalyttikko-opiskelijoiden oppimateriaali. Turun ammattikorkeakoulu. Turku.

Näpänkangas, Juha 2018. Digitaalipatologia – mitä se on? *Lääkärilehti* 73;5:249. Verkkojulkaisu <<https://www-laakarilehti-fi.ezproxy.metropolia.fi/pdf/2018/SLL52018-249.pdf>> Luettu 15.11.2019

Pantanowitz, Liron - Sharma, Ashish - Carter, Alexis B. - Tahsin, Kurc - Sussman, Alan - Saltz, Joel 2018. Twenty Years of Digital Pathology: An Overview of the Road Travelled, What is on the Horizon, and the Emergence of Vendor-Neutral Archives. Journal of Pathology Informatics. 9:40:1-12

Penttinen, Anna-Maija - Parkkinen, Ilmari - Blom, Sami - Kopra, Jaakko - Andressoo, Jaan-Olle - Pitkänen, Kari - Voutilainen, Merja H. - Saarma, Mart - Airavaara, Mikko 2018. Implementation of deep neural networks to count dopamine neurons in substantia nigra. European Journal of Neuroscience. 48:2354-2361

Qupathin internetsivu a <<https://qupath.github.io/>> luettu 12.2.2019

QuPathin internetsivu b <<https://github.com/qupath/qupath/wiki/What-is-QuPath%3F>> luettu 20.11.2019

Remes, Satu Maria - Tuominen, Vilppu J. - Helin, Heikki - Isola, Jorma - Arola, Johanna 2012. Grading of Neuroendocrine Tumors With Ki-67 Requires High-quality Assessment Practices. The American Journal of Surgical Pathology 36:1359–1363

Richardsen, Elin - Andersen, Sigve - Al-Saad, Samer - Rakae, Mehrdad - Nordby, Yngve - Pedersen, Mona Irene - Ness, Nora - Grindstad, Thea - Movik, Ingeborg - Dønnem, Tom - Bremnes, Roy - Busund, Lill-Tove 2017. Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in a large prostatectomy cohort. Plos one, 12(11):1-13

Ristimäki, Ari - Franssila, Kaarle - Kosma, Veli-Matti 2013. Immunohistokemia ja -sytokemia. Syöpätaudit. Kustannus Oy Duodecim. Verkkojulkaisu <[https://www.oppiportti.fi/op/syt00086/do?p\\_haku=immunohistokemia#q=immunohistokemia](https://www.oppiportti.fi/op/syt00086/do?p_haku=immunohistokemia#q=immunohistokemia)> Luettu 22.3.2020

Salmela, Pasi 2013. Suomen endokrinologiyhdistys r.y:n internetsivut. Verkkojulkaisu <<https://www.endo.fi/tietoa-endokrinologisista-sairau/potilasohjeet/suoliston-neuroendokriininen-kas/>> luettu 4.9.2019

Suomen biopankit internetsivu <<https://www.biopankki.fi/biopankkilaki-ja-saately/>> Luettu 10.2.2020.

Taanila, Aki 2019. Akin menetelmäblogi. Verkkojulkaisu <<https://tilastoapu.wordpress.com/2011/11/01/10-korrelaatio-ja-sen-merkitsevyys/>> Luettu 17.3.2020

Tizhoosh, Hamid Reza - Pantanowitz Liron 2018. Artificial intelligence and digital pathology: Challenges and opportunities. Journal of Pathology Informatics 9:38:1-6

Tolonen, Teemu - Näpänkangas, Juha – Isola, Jorma 2015. Kliininen patologia virtuaalimikroskopian kynnyksellä. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 131(21):1981-7  
Verkkojulkaisu <<https://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo12517.pdf>> Luettu 17.3.2019

Turkki, Riku - Byckhov, Dmitrii - Lundin, Mikael - Isola, Jorma - Nordling, Stig - Kovanen, Panu E. - Verrill, Clare - von Smitten, Karl - Joensuu, Heikki · Lundin, Johan - Linder, Nina 2019. Breast cancer outcome prediction with tumour tissue images and machine learning. Breast Cancer Research and Treatment 177:41–52

Tutkimuseettinen toimikunta 2012. Verkkodokumentti <[https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_2012.pdf](https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf)> Luettu 17.4.2019

Vesterinen, Tiina - Mononen, Sanna - Salmenkivi, Kaisa - Mustonen, Harri - Ilonen, Ilkka - Knuuttila, Aija - Haglund, Caj - Arola, Johanna 2018. Clinicopathological indicators of survival among patients with pulmonary carcinoid tumor. Acta Oncologica 57:8:1109-1116

Vilka, Hanna 2007. Tutki ja mittaa, määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: kustannusosakeyhtiö Tammi

VTT:n julkaisu. Tekoälyn käsitekartta VN-TEAS projekti Tekoälyn kokonaisjäsenitys ja kansallinen osaamiskartoitus Yhteyshenkilö: Heikki Ailisto, tutkimusprofessori Teknologiantutkimuskeskus VTT Oy 14/06/2018. Verkkojulkaisu <<https://docplayer.fi/105146796-Tekoalyn-kasitekartta.html>> Luettu 3.9.2019

Vodovnik, Aleksandar - Aghdam, Mohammad Reza F. 2018. Complete Routine Remote Digital Pathology Services. *Journal of Pathology Informatics* 9:1:36.

Voduc, David - Kenney, Challayne - Nielsen, Torsten O. 2008. Tissue Microarrays in Clinical Oncology. *Seminars in Radiation Oncology* 18(2):89–97

Williams, Bethany J. - DaCosta, Philip - Goacher, Edward - Treanor, Darren 2017. A Systematic Analysis of Discordant Diagnoses in Digital Pathology Compared With Light Microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 141:12:1712-1718

Zarella, Mark D. - Bowman, Douglas - Aeffner, Famke - Farahani, Navid - Xthona, Albert - Absar, Syeda Fatima - Parwani, Anil - Bui, Marilyn - Hartman, Douglas J. 2019. A Practical Guide to Whole Slide Imaging A White Paper From the Digital Pathology Association. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 143:222-234

Tulostaulukot

nro	Patologin tul	AI tulos ka	QP tulos ka	IR tulos ka	yttehuomautus	nro	Patologin tul	AI tulos ka	QP tulos ka	IR tulos ka	yttehuomautus
1	0,5	0,5	0,4	0,4		65	1	1,0	0,9	0,9	
2	1	1,4	1,2	1,2		66	1	0,8	0,9	0,9	
3	0,5	0,3	0,2	0,2		67	2	1,1	1,1	1,1	vaaleasti värjättyneitä soluja
4	0,5	0,1	0,1	0,1		68	1	0,6	0,6	0,6	
5	4	3,7	3,6	3,8		69	1	1,4	8,5	5,8	artefaktaa, repaleinen näyte, poikkeava värjäytyvyys
6	0,5	0,9	0,8	0,8		70	2	1,4	1,8	1,6	
7	1	1,5	0,4	0,8	artefaktaa, repaleinen näyte	71	2	1,4	1,3	1,5	
8	0,5	0,4	0,3	0,4		72	0,5	0,5	0,5	0,6	
9	0,5	0,3	0,3	0,4		73	0,5	1,2	0,8	0,9	artefaktaa, epämääräisiä soluja
10	1	0,4	1,3	2,9	rutussa	74	0,5	0,3	0,3	0,4	
11	0,5	0,2	0,1	0,1		75	0,5	0,6	4,9	3,0	
12	0,5	0,5	0,2	0,6		76	0,5	0,3	0,3	0,3	
13	0,5	1,1	0,8	0,9		77	1	0,8	0,7	0,7	
14	1	0,3	0,2	0,3		78	1	0,9	0,9	0,9	
15	1	2,0	2,2	2,1		79	1	0,8	0,8	0,7	
16	0,5	0,6	0,4	0,4		80	1	0,6	0,6	0,6	
17	2	1,2	1,4	1,2		81	2	1,4	1,3	1,3	
18	1	0,7	0,8	0,7		82	0,5	0,6	0,6	0,5	
19	3	1,4	1,4	1,4		83	2	2,8	7,1	5,0	värjäysartefaktaa, näyte rutussa
20	3	2,8	2,5	2,6		84	2	1,9	2,0	2,0	
21	0,5	0,3	0,3	0,3		85	1	0,9	0,7	0,9	
22	0,5	0,4	0,4	0,5		86	3	3,0	3,8	3,3	
23	0,5	0,4	0,5	0,5		87	1	1,2	1,2	1,1	
24	1	0,8	0,6	0,9		88	1	1,4	1,2	1,3	
25	0,5	0,9	0,9	0,8		89	1	1,1	1,0	1,3	
26	2	1,3	1,2	1,4		90	0,5	0,5	0,5	0,5	
27	1	0,6	0,8	0,8		91	2	1,7	1,7	1,7	
28	0,5	0,3	0,2	0,2		92	0,5	0,3	0,2	0,2	
29	1	0,9	0,8	0,8		93	1	1,0	0,8	0,9	
30	3	2,8	2,5	2,7		94	1	0,5	0,3	0,4	
31	2	1,8	1,8	2,0		95	3	1,8	1,8	2,0	
32	2	2,1	2,0	2,1		96	1	0,7	0,7	0,8	
33	5	3,9	3,4	3,9		97	0,5	1,3	1,8	0,6	
34	1	0,8	0,7	0,8		98	0,5	0,6	0,4	0,4	
35	1	1,0	0,9	0,9		99	0,5	0,3	0,3	0,2	
36	3	1,9	1,6	2,1		100	1	0,8	1,0	1,0	
37	2	1,8	1,6	1,6		101	0,5	0,3	0,2	0,2	
38	0,5	0,5	0,4	0,5		102	0,5	0,3	0,2	0,2	
39	1	0,8	0,8	0,6		103	1	1,2	1,2	1,2	
40	0,5	0,5	0,5	0,4		104	0,5	0,3	0,3	0,2	
41	0,5	0,1	0,2	0,1		105	0,5	0,4	0,4	0,4	
42	2	1,4	1,5	2,8		106	0,5	0,5	0,3	0,3	
43	0,5	0,6	0,6	0,6		107	0,5	0,7	0,6	0,7	
44	1	0,8	9,3	11,0	rutussa	108	0,5	0,3	0,3	0,4	
45	2	1,3	1,2	1,2		109	1	0,9	0,8	1,2	
46	2	2,3	2,1	2,5		110	1	0,5	0,4	0,5	
47	0,5	0,8	0,8	1,0		111	1	1,5	1,4	1,1	
48	1	1,4	8,4	3,1	rutussa, hyvin vaaleasti värjätynyt taud	112	1	0,9	0,8	1,0	
49	0,5	0,3	0,3	0,3		113	4	3,2	2,6	3,0	
50	0,5	0,1	0,1	0,1		114	1	0,8	0,6	0,6	
51	0,5	0,6	0,5	0,4		115	1	0,1	0,1	0,1	
52	1	0,9	0,9	0,8		116	0,5	0,3	0,2	0,2	
53	2	1,7	9,5	4,5		117	1	0,4	0,4	0,4	
54	2	3,5	2,1	2,0		118	0,5	0,0	0,0	0,0	
55	0,5	0,4	0,3	0,3		119	0,5	0,2	0,2	0,2	
56	5	3,2	3,0	3,2		120	0,5	0,2	0,2	0,2	
57	15	10,8	12,2	12,8	isoja soluja, solurypäitä	121	0,5	0,2	0,2	0,3	
58	0,5	0,0	0,0	0,0		122	0,5	0,1	0,1	0,2	
59	0,5	0,5	0,4	0,4		123	1	0,7	0,5	0,6	
60	1	0,8	0,8	0,9		124	0,5	0,3	0,3	0,4	
61	0,5	0,4	0,4	0,4		125	0,5	0,2	0,1	0,4	
62	2	1,5	1,6	1,7		126	1	1,0	0,8	0,7	
63	0,5	0,8	0,6	0,6		127	1	0,4	4,6	2,2	
64	1	0,7	0,6	0,7							