



Melanomannın yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi ile tespitinde ortama eklenen serumun sınıflandırma başarısı üzerine etkisinin incelenmesi

Investigation of the effect of serum added to the medium on the classification success in the detection of melanoma using surface-enhanced Raman spectroscopy

Fatma Uysal Çiloğlu^{*1} 

¹Erciyes Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, 38039, Kayseri Türkiye

Öz

Dünya genelinde ölüm oranları açısından ilk sıralarda yer alan melanomannın tespitinde kullanılan yöntemlerin dezavantajlarından dolayı yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doğrultuda yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (YZRS) güçlü ve alternatif bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada deri fibroblast, tümör ilişkili fibroblast ve melanoma hücrelerinin kültür aşamasında hücre kültür ortamına eklenen serumun hücrelerden toplanan YZRS spektrumlarının sınıflandırma başarısı üzerine etkisi araştırılmıştır. Serum eklenen ve eklenmeyen ortamda kültürlenilen hücrelerden elde edilen YZRS spektrumlarının; temel bileşen analizi (TBA), yeniden yapılanma bağımsız bileşen analizi (YYBBA) ve seyrek filtreleme (SF) yöntemleri kullanılarak öz nitelik çıkarımı gerçekleştirilmiştir. Çıkarılan öz nitelikleri sınıflandırmak için destek vektör makinası (DVM) ve k en yakın komşu (KEYK) algoritması kullanılmıştır. Serum eklenmeyen hücre kültür ortamlarında kültürlenilen hücrelerden toplanan spektrumların makine öğrenme teknikleri ile sınıflandırma işlemi gerçekleştirildiğinde sınıflandırma başarılarının serum eklenen gruba göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Serum eklenmeyen hücre grubunun sınıflandırma başarısı SF ile DVM kullanıldığında %96.4±0.4, TBA ile KEYK algoritması kullanıldığında %96.8±0.29 olarak bulunmuş olup serum eklenen ve eklenmeyen gruplara ait sınıflandırma başarısı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Melanoma, Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi, Temel bileşen analizi, Yeniden yapılanma bağımsız bileşen analizi, Seyrek filtreleme

1 Giriş

Hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyüp çoğalması sonucu meydana gelen kanser, dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olup ölüm nedenleri arasında başı çekmektedir [1,2]. Cilt kanseri veya melanoma, ciltteki pigment üreten hücreler olan melanositlerden kaynaklanan kötü huylu bir tümördür [3]. ABD ulusal kanser enstitüsü verilerine göre

Abstract

Due to the disadvantages of the methods used for the detection of melanoma, which ranks among the leading causes of death worldwide, there is a need for the development of new methods. In this context, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) emerges as a powerful and alternative technique. In this study, the effect of serum added to the cell culture medium during the culture of skin fibroblasts, tumor-associated fibroblasts, and melanoma cells on the classification success of SERS spectra collected from the cells was investigated. Feature extraction was performed using principal component analysis (PCA), reconstruction-independent component analysis (RICA), and sparse filtering (SF) methods on SERS spectra obtained from cells cultured in media with and without serum. Support vector machines (SVM) and k-nearest neighbors (KNN) algorithms were used to classify the extracted features. It was found that the classification accuracy of spectra collected from cells cultured in serum-free media was higher compared to those from the serum-added group when classified using machine learning techniques. The classification accuracy of the serum-free cell group was found to be 96.4±0.4% using SF with SVM and 96.8±0.29% using PCA with the KNN algorithm, with a statistically significant difference in classification accuracy between the serum-added and serum-free groups.

Keywords: Melanoma, Surface enhanced Raman spectroscopy, Principal component analysis, Reconstruction independent component analysis, sparse filtering

ABD'de yaygın kanser türleri içerisinde görülme sıklığı açısından 5. sırada yer alan melanomaya ait 2024 yılında 100.640 yeni vaka kaydedileceği aynı yıl içinde melanoma kaynaklı 8.290 ölüm meydana geleceği tahmin edilmektedir [4]. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi melanomada da erken teşhis son derece önemlidir. Melanoma tanısı tipik olarak klinik değerlendirme, görüntüleme testleri ve biyopsi prosedürlerinin bir kombinasyonunu içermektedir [5].

Bununla birlikte bu yöntemlerin kullanımı zaman alıcı olabilmekte ve girişimsel aşamalar gerektirebilmektedir. Bu nedenle hızlı ve yüksek doğrulukla sonuç verebilen ve mevcut yöntemlerin dezavantajlarını ortadan kaldıracak nitelikte yeni yöntemlere ihtiyaç vardır.

Yüzeyle Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS) son yıllarda oldukça artan popülerliğe sahip bir yöntem olup kanserin, patojenlerin ve hastalıkların hızlı tespitine yönelik yaygın şekilde kullanılmaktadır [6-9]. YZRS, Raman spektroskopinin sağladığı moleküler parmak izi özgülüğünü potansiyel tek molekül hassasiyetiyle birleştirir [10]. Bu teknik; örnek hazırlama sürecinin kolay olması, numuneye zarar vermemesi, yüksek maliyetli olmaması, kullanımı için eğitimli personel gerektirmemesi gibi avantajlara sahiptir [11]. Bununla birlikte benzer bileşimli numunelere ait spektrumların oldukça benzer olması elde edilen verilerin analizi için gelişmiş veri işleme algoritmalarının kullanımını zorunlu hale getirmektedir. Bu kapsamda gözetimli ve gözetimsiz makine öğrenme algoritmalarından sıklıkla faydalanılmaktadır [12]. Bu algoritmalar sayesinde son derece benzer spektral özelliklere sahip kanserli ve sağlıklı hücrelerin ayrıştırılması başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir [13].

Oldukça agresif ve metastatik özellik gösteren melanomanın YZRS ile tespitine yönelik çalışmalar literatürde rapor edilmiştir. Qiu vd. [14] tarafından gerçekleştirilen çalışmada melanosit ve melanoma hücrelerini ayırt etmek için hücrelere ait YZRS spektrumları katı yüzey altın nanoparçacıklar üzerinden toplanmıştır. Son derece benzer olan spektrumları sınıflandırmak için evrişimli sinir ağları kullanıldığında %98'lik bir sınıflandırma doğruluğu elde edilmiştir. Wang vd. [15] tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise 20 melanoma hastası ve 21 sağlıklı kişiden alınan kan serumu örneklerinden elde edilen hücre dışı veziküllerdeki protein biyobelirteçler mikroakışkan cihaz üzerinde yakalanarak YZRS spektrumları toplanmıştır. Melanom hastaları ve sağlıklı kişilere ait protein biyobelirteçleri YZRS sinyalleri arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Yousuff vd. [16] tarafından yapılan çalışmada sağlıklı ve melanoma grubu ayırtmak için YZRS ve makine öğrenme teknikleri birlikte kullanıldığında yüksek bir sınıflandırma başarısı elde edilmiştir. Erzina vd.'nin [17] yaptığı geniş kapsamlı çalışmada melanoma hücreleri, normal deri fibroblast hücreleri ve tümör ilişkili fibroblastlara ait YZRS spektrumları toplanarak bu hücre grupları evrişimli sinir ağları ile başarılı bir şekilde sınıflandırılmıştır.

Şu ana kadar melanomanın YZRS ile tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda ağırlıklı olarak hücre kültür ortamında büyütülen hücrelerin spektrumları toplanarak sağlıklı ve kanserli hücrelerin sınıflandırılması gerçekleştirilmiştir [14,17]. Kullanılacak hücre tipine bağlı olarak kültür ortamı parametreleri değişiklik gösterebilmektedir [18]. Hücre kültür ortamında bulunan aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve çeşitli iyonlar hücrede metabolik olayların gerçekleşmesi için gerekli ortamı sağlar [19]. Ayrıca serum içeren çözeltiler içerisinde bulunan hormonlar, proteinler, büyüme faktörleri gibi bileşenler hücre çoğalması için gereken bileşenlerdir [18]. Bununla

birlikte hücre kültür ortamında serum kullanımı bazı dezavantajları da beraberinde getirebilmektedir. Bu dezavantajların başında bileşiminin değişken olması ve virüs, mikoplazma, prion gibi kirletici kaynakları içermesi sayılabilir [20,21]. Pek çok hücre hattı serum içermeyen özel kültür ortamında büyütülebilmektedir [21]. Literatürde hücre kültür ortamı parametrelerinde yapılan değişikliklerin hücrelerden toplanan YZRS spektrumlarında bir değişiklik oluşturup oluşturmadığına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada hücre kültür ortamına eklenen serumun melanomanın tespitinde hücrelerden toplanan spektrumların sınıflandırma başarısı üzerine etkisi incelenmiştir. Serum eklenen ve eklenmeyen normal deri fibroblast hücreleri, tümör ilişkili fibroblast hücreleri ve melanoma hücrelerine ait YZRS spektrumlarının çeşitli makine öğrenme algoritmaları ile sınıflandırma işlemi gerçekleştirilerek ortama eklenen serumun sınıflandırma başarısı üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında Erzina vd. [17] tarafından yapılan çalışmada toplanan veri seti kullanılmıştır. Serum eklenen ve eklenmeyen ortamda kültürlenen hücrelere ait YZRS spektrumlarından temel bileşen analizi (TBA), yeniden yapılanma bağımsız bileşen analizi (YYBBA) ve seyrek filtreleme (SF) yöntemleri kullanılarak öz nitelik çıkarımı gerçekleştirilmiştir. Çıkarılan öz nitelikler destek vektör makinesi (DVM) ve k en yakın komşu (KEYK) algoritması ile sınıflandırılmıştır. Elde edilen sonuçlar hücre kültür ortamına serum eklenen ve eklenmeyen gruptan elde edilen sınıflandırma başarıları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, kanserli ve sağlıklı hücrelerin YZRS ile tespitinde hücrelerin hücre kültür ortamında büyütülmesi sırasında ortama eklenecek serum konusunda yol gösterici olacaktır.

2 Metot

2.1 Veri seti

Bu çalışmada erişime açık olarak sunulan bir veri seti kullanılmıştır. Sunulan veriler Erzina vd. tarafından yapılan çalışmadan elde edilmiştir ve verilerle ilgili ayrıntılı bilgilere ilgili referanstan ulaşılabilir [17]. Veri seti, deri fibroblast, tümör ilişkili fibroblast ve melanoma hücrelerine ait YZRS spektrumlarının ADT-NH₂, 4-ADT-COOH veya ADT-(COOH)₂ ile işlevselleştirilmiş Au nanoparçacık yüzey üzerinden toplanmasıyla elde edilmiştir. Hücre hattı veya birincil kültürden elde edilen hücrelerin kültür ortamında büyütülmesi sırasında örneklerin bir grubuna %10 fetal sıgır serumu eklenirken diğer gruba serum eklenmemiş ve her iki gruptan YZRS spektrumları toplanmıştır. Spektrumlar 785 nm dalga boylu lazer ile 33 mW lazer gücü altında toplanmıştır. Orijinal veri setinde spektrumlara ait taban hattı çıkarıldıktan sonra normalize edilmiştir. Verilerin parmak izi bölgesi olarak nitelendirilen bölgede yer alan 400-2500 cm⁻¹ bölgesi arasında kalan kısımları kullanılmıştır.

2.2 Veri analizi

Veri seti, hücre kültür ortamına %10 fetal sıgır serumu eklenen ve serum eklenmeyen ortamda büyüyen hücrelerden elde edilen spektrumlardan oluşmaktadır. Serum eklenen

ortamdan toplanan spektrumların 157 tanesi deri fibroblast hücrelerinden, 150 tanesi tümör ilişkili fibroblast hücrelerinden ve 322 tanesi melanoma hücrelerinden oluşmaktadır. Serum eklenmeyen ortamdan toplanan spektrumların 151 tanesi deri fibroblast hücrelerinden, 151 tanesi tümör ilişkili fibroblast hücrelerinden ve 308 tanesi melanoma hücrelerinden elde edilmiştir. Veri setinde toplam 1239 spektrum yer almaktadır.

Hücre kültür ortamına eklenen serumun sınıflandırma başarısı üzerine etkisini araştırmak için farklı öz nitelik çıkarım metotları ve sınıflandırıcılar kullanılmıştır. Sınıflandırıcı başarısı öz nitelik çıkarım metoduna büyük oranda bağlı olduğu için bu çalışmada farklı öz nitelik çıkarım metodlarından faydalanılmıştır. Burada kullanılan TBA ve YYBBA girdi verilerini çıktı özelliklerine dönüştürürken doğrusal bir dönüşüm kullanırken SF bu amaç için doğrusal olmayan bir dönüşüm kullanır. Böylece öz nitelik çıkarımında hem linear hem de linear olmayan öz nitelik çıkarım yöntemleri kullanılarak serum eklenen ve eklenmeyen grupların sınıflandırma başarıları kapsamlı şekilde kıyaslanmıştır.

2.2.1 Öz nitelik çıkarma

Veri setinden öz niteliklerin çıkarılması amacı ile TBA, YYBBA ve SF olmak üzere 3 farklı öz nitelik çıkarma yöntemi kullanılmıştır. TBA, Raman spektrumlarından anlamlı bilgi çıkarmak için sıklıkla başvurulan gözetimsiz bir makine öğrenme yöntemidir [22,23]. TBA ile çok boyutlu uzayda yer alan veri içerisindeki varyans mümkün olduğunca korunarak verinin daha küçük boyutlu uzaylara indirgenmesi gerçekleştirilir. Dönüşüm sonrası ilk temel bileşen en büyük varyansa sahiptir ve son temel bileşene doğru gidildikçe varyans azalır [24]. TBA ile veri içerisindeki doğrusal ilişkiler belirlenerek veriden doğrusal öz nitelikler çıkarılması sağlanır. YYBBA, bağımsız bileşen analizinden yola çıkılarak elde edilen gözetimsiz bir öz nitelik çıkarma yöntemidir ve bağımsız bileşen analizinde ortaya çıkan dezavantajların üstesinden gelebilmektedir. Bağımsız bileşen analizinin kısa tanımlaması için m adet örnekten oluşan bir veri seti $\{x^{(i)}\}_{i=1}^m$, $x^{(i)} \in \mathbb{R}^n$ şeklinde verilmiş olsun. Burada her bir örneği k adet bağımsız bileşen ile temsil etmek için Denklem (1)'de verilen ifadeyi minimum yapan ağırlık matrisi W 'nin bulunması gerekmektedir [25].

$$\min W, \quad \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^k g(W_j x^{(i)}), \quad WW^T = I \quad (1)$$

Burada verilen g linear olmayan yapıda konveks bir fonksiyondur ve genellikle $g(\cdot) := \log(\cosh(\cdot))$ ile tanımlanır. $W \in \mathbb{R}^{k \times n}$ olarak tanımlanan W ağırlık matrisidir ve k öz nitelik sayısını ifade etmektedir. Denklem (1)'de verilen W_j , W matrisindeki bir satırı göstermektedir. Burada verilen $WW^T=I$ ifadesi ortonormallik kısıtı olarak tanımlanmaktadır [25].

Bağımsız bileşen analizinin bazı ortonormallik sorunları vardır. Bunun üstesinden gelmek için YYBBA'dan faydalanılır. YYBBA'nde ortonormallik kısıtı ortadan

kaldırılarak *yeniden yapılandırma maliyeti* adı verilen yumuşak bir ceza terimi uygulanmaktadır [26]. Buna ait eşitlik Denklem (2)'de verilmiştir. Denklem (2)'de verilen $\lambda > 0$ parametresi yeniden yapılandırma hatası ile seyreklik arasındaki dengeyi ifade etmektedir.

$$\min W, \quad \frac{\lambda}{m} \sum_{i=1}^m \|W^T W x^{(i)} - x^{(i)}\|_2^2 + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^k g(W_j x^{(i)}) \quad (2)$$

SF öz nitelik çıkarım yöntemi, az sayıda hiper parametreye sahip olması ve kullanımının kolay olması gibi özelliklerinden dolayı tercih edilen etkili bir yöntemdir. Seyrek filtreleme ilk olarak Ngiam vd. tarafından önerilmiştir [27]. Yöntem kısaca öz nitelik matrisine seyreklik optimizasyonu uygulayarak girdi örneklerinden seyrek öz nitelikleri öğrenmeyi amaçlamaktadır. Etiketli olarak verilen $\{x_i\}_{i=1}^N$ bir veri seti N örnek içeriyor ve $x_i \in \mathbb{R}^D$ olsun. SF yöntemi, Denklem (3) x_i 'leri $f_i \in \mathbb{R}^d$ 'ye eşleyerek yeni öz nitelikler elde edilmesini sağlar. Burada $h(\cdot)$ linear olmayan yapıda bir aktivasyon fonksiyonudur, d ise veriden çıkarılacak öz nitelik sayısını ifade eder. Buradaki $W \in \mathbb{R}^{d \times D}$ ise giriş ve çıkışı bağlayan ağırlık matrisidir [28].

$$f_i = h(W^T x_i) \quad (3)$$

SF yönteminin asıl görevi, her bir girdi örneği x_i 'nin karşılık gelen f_i ile iyi bir şekilde temsil edilebileceği optimal bir W 'yi öğrenmektir. Bu yöntemle ait amaç fonksiyonu Denklem (4)'te verildiği gibi formüle edilir. Denklem (4)'te verilen optimizasyon süreci aynı zamanda W matrisinin en uygun ağırlıklarının belirlenmesinin optimizasyon sürecini ifade etmektedir. Burada en uygun W matrisi belirlendikten sonra girdi verilerine ait öz nitelikler Denklem (3) vasıtasıyla çıkarılır [28].

$$\min_W J(W) = \sum_{i=1}^N \|\hat{f}_i\|_1 \quad (4)$$

Verilen öz nitelik çıkarma yöntemleri için 50 öz nitelik çıkarıldığında yüksek sınıflandırma doğruluğuna ulaşılmıştır. Öz nitelik sayısı 50'den fazla seçilse bile sınıflandırma doğruluğunda önemli bir değişim meydana gelmediği için her 3 öz nitelik çıkarma yönteminde de 50 öz nitelik çıkarılarak sınıflandırıcı girişlerine uygulanmıştır.

2.2.2 Sınıflandırma

Serum içeren ve içermeyen ortamlarda büyütülen deri fibroblast hücreleri, tümör ilişkili fibroblast hücreleri ve melanoma hücrelerine ait YZRS spektrumlarından farklı öz nitelik çıkarma yöntemleri kullanılarak elde edilen öz nitelikler sınıflandırılmıştır. Bu amaçla geleneksel sınıflandırma yöntemleri olan ve YZRS spektrumlarının sınıflandırılmasında oldukça başarılı sonuçlar veren DVM ve KEYK algoritmaları kullanılmıştır.

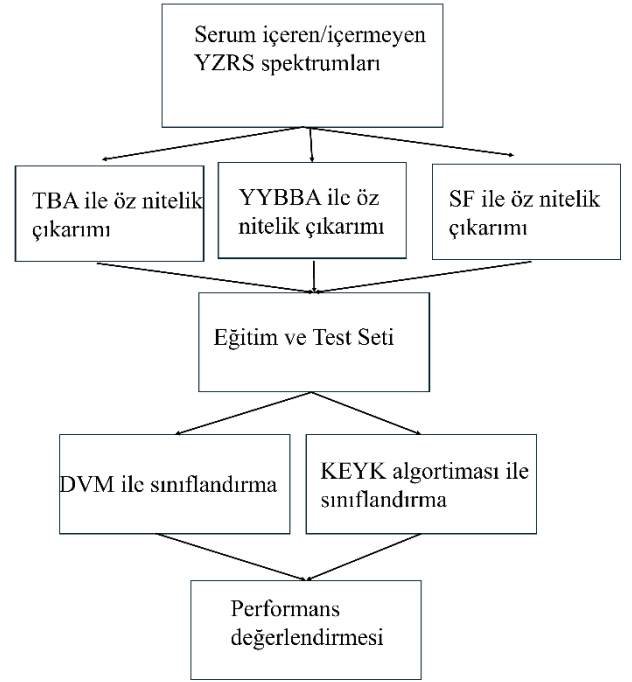
Serum eklenen ve eklenmeyen ortamlarda büyütülen hücrelere ait YZRS spektrumları öz nitelik çıkarma işleminden sonra 2 ayrı veri seti şeklinde sınıflandırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sınıflandırıcılara ait model parametreleri Tablo 1’de verilmiştir. Sınıflandırıcıların model parametreleri belirlenirken optimum parametreleri belirlemek için 10 kat çapraz doğrulama algoritmasından faydalanılmıştır. 10 kat çapraz doğrulama tekniğinde veri seti 10 eşit parçaya bölünüp her seferinde bir kısmı test verisi, kalanı eğitim verisi olarak kullanılır. Bu süreç 10 kez tekrarlanır ve modelin genel doğruluğu hesaplanır. KEYK algoritmasında da optimum k değeri, farklı k değerleri denenerek çapraz doğrulama sırasında en iyi performansı veren k değeri seçilerek belirlenmiştir. Sınıflandırıcı performanslarını değerlendirmek için karmaşıklık matrisleri üzerinden sınıflandırıcılara ait doğruluk değerleri hesaplanmıştır. Sınıflandırıcılar 50 kez çalıştırılmış ve sınıflandırıcı doğruluklarına ait ortalama \pm standart sapma değerleri bulunmuştur. Doğruluk değeri hesaplanırken karmaşıklık matrisi üzerindeki köşegen elemanları toplanarak matristeki elemanların toplamına bölünmüştür. Tüm veri analiz aşamaları MATLAB (The MathWorks, Natick, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Veri analizi için gerçekleştirilen aşamalar Şekil 1’deki blok diyagramda verilmiştir.

Tablo 1. Sınıflandırıcı modellerini oluşturmak için kullanılan parametreler

Sınıflandırıcı	Parametre	Değeri
DVM	Çekirdek fonksiyon	Polinom
	Çekirdek derecesi	2
	Box constraint	1
	Çekirdek ölçeği	1
	Çözücü	Sıralı minimal optimizasyon
KEYK	Komşu sayısı	1
	Uzaklık ölçümü	Öklid mesafesi
	Mesafe ağırlıklandırma fonksiyonu	Equal

2.2.3 İstatistiksel analiz

Melanoma tespitinde hücre kültür ortamına serum eklenen ve eklenmeyen hücrelerden toplanan YZRS spektrumlarının sınıflandırma başarısı üzerine etkisini araştırmak için Mann-Whitney U test kullanılmıştır. Bu test iki grup arasında fark olup olmadığını test etmek için kullanılan parametrik olmayan bir testtir [29]. Elde edilen veriler, normal dağılıma uymadığından bu testin kullanımı uygun bulunmuştur. Serum içeren ve içermeyen verilerin farklı öz nitelik çıkarım yöntemleri ile elde edilen sınıflandırıcı doğrulukları arasında fark olup olmadığını araştırmak için Mann-Whitney U test %95 güven düzeyinde gerçekleştirilmiştir. Böylece $p < 0.05$ için gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 1. Serum içeren ve içermeyen ortamda büyütülen hücrelerden elde edilen YZRS spektrumlarının veri analizine ait blok diyagram

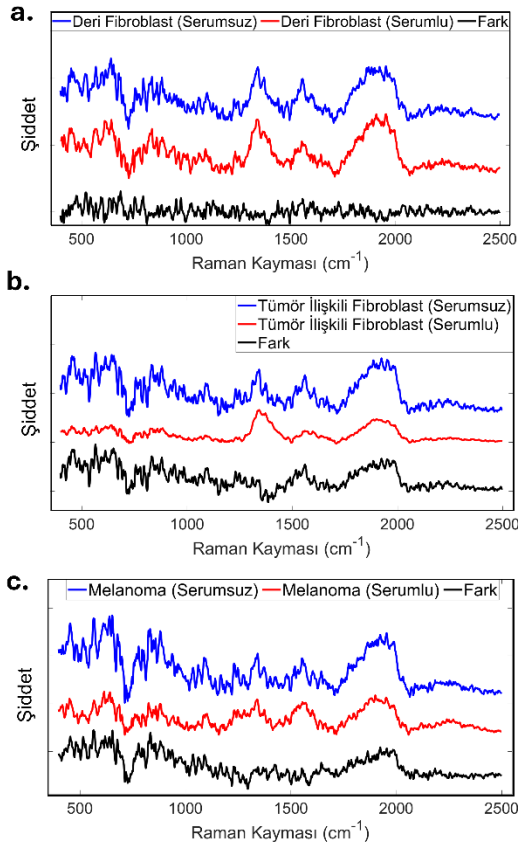
3 Bulgular ve tartışma

3.1 Serum eklenen ve eklenmeyen ortamlarda büyütülen hücrelere ait YZRS spektrumları

Hücre kültür ortamına eklenen serumun normal deri fibroblast, tümör ilişkili fibroblast ve melanoma hücrelerine etkisini incelemek için hücrelerden toplanan YZRS spektrumlarının ortalamalarına ait grafikler Şekil 2a, 2b ve 2c’de verilmiştir. Şekil 2a’da normal deri fibroblast hücrelerinin kültür ortamına serum eklenmeden (%0 serum) ve serum eklenerek (%10 serum) büyütüldüğünde elde edilen YZRS spektrumlarının ortalaması verilmiştir. Verilen şekilde serum eklenen ve eklenmeyen gruplar arasındaki en az farklılığın Şekil 2a’da görülen normal deri fibroblast hücreleri arasında olduğu görülmektedir. Şekil 2a’daki fark spektrumu incelendiğinde iki grup için Raman kaymalarına ait dalga boyları büyük oranda aynı konumlarda olmakla birlikte spektral pik şiddetlerinde az miktarda da olsa farklılıklar olduğu görülmektedir. Şekil 2b’de verilen tümör ilişkili fibroblast hücrelerine ait serum eklenen ve eklenmeyen kültürlerden elde edilen ortalama YZRS spektrumları incelendiğinde hem spektral piklerin konumları hem de şiddetleri arasında önemli farklılıklar mevcuttur. Burada, serum eklenmeyen tümör ilişkili fibroblast hücreleri serum eklenen hücre kültür ortamına göre daha belirgin ve şiddetli Raman spektrumları elde edilmiştir. Burada 400-1250 cm^{-1} bölgesinde yer alan piklerin şiddeti serum eklenen örneklerde oldukça düşük seviyede seyretmektedir. Bu bölgedeki YZRS piklerinin oluşmasına katkı veren çok sayıda biyomolekül mevcuttur. Bunlara polisakkarit, nükleik asit, protein gibi yapılar örnek olarak verilebilir [30]. 1330 cm^{-1} civarındaki spektral bölge literatürde DNA ve

fosfolipitler ile ilişkilendirilmiştir [31]. 1560 cm^{-1} civarındaki pik ise triptofan ve COO^- kaynaklı olarak ortaya çıkmaktadır [30]. Şekil 2c’de verilen melanoma hücrelerine ait ortalama YZRS spektrumlarında serum eklenmeyen hücrelerin spektrumlarında diğer hücre türlerinde olduğu gibi pik şiddetlerinde önemli farklılıklar görülmektedir. Şekil 2’de serum eklenen ve eklenmeyen hücre gruplarına ait YZRS spektrumlarında özellikle tümör ilişkili hücreler ve melanoma hücrelerinde spektrumların farklılaştığı görülmektedir.

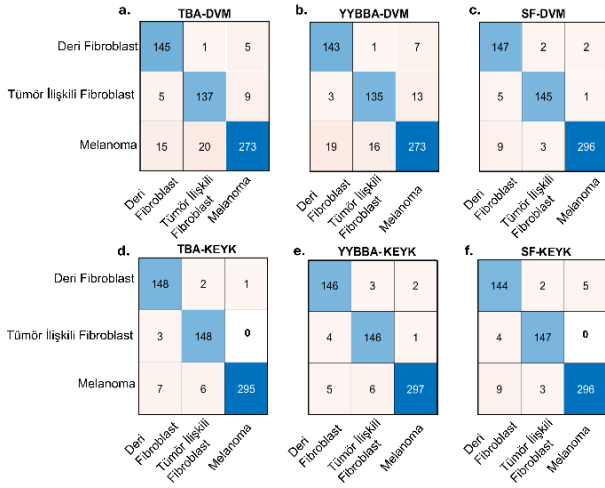
Hücre kültür ortamına serum eklenmesi, serum içeriğinde bulunan çeşitli besinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve proteinler gibi bileşenlerden dolayı serum eklenen ve eklenmeyen hücre gruplarının biyokimyasal yapısını ve metabolik faaliyetlerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Serum içeriğinde bulunan yüksek miktarda protein ve aminoasit, hücrelerin biyokimyasal aktiviteleri ve protein sentezi üzerinde önemli etkiye sahip olabilmektedir. Ayrıca serum içeriğinde bulunan lipid ve karbonhidrat gibi moleküller hücre zar yapısında ve enerji depolama ya da harcama süreçlerinde değişikliğe neden olabilmektedir [32,33]. Bütün bu değişiklikler göz önüne alındığında hücre kültür ortamına serum eklenen ve eklenmeyen hücrelerin YZRS spektrumların da farklılıklar görüleceği açıktır.



Şekil 2. Serum içermeyen ve serum içeren ortamlarda büyütülen a. normal deri fibroblast, b. tümör ilişkili fibroblast ve c. melanoma hücrelerine ait ortalama ve fark YZRS spektrumları

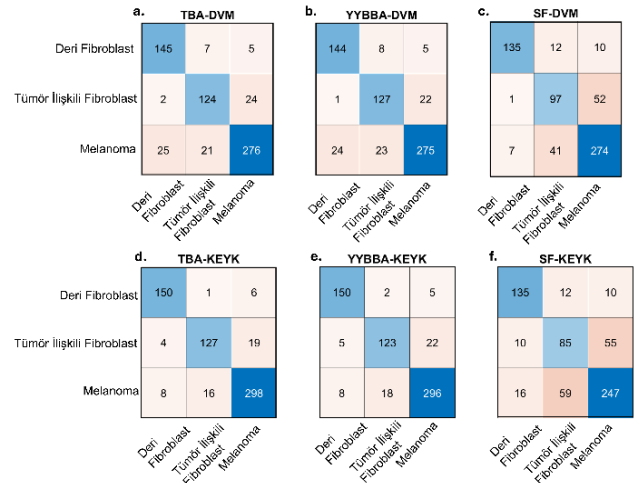
3.2 Serum eklenen ve eklenmeyen hücre kültür ortamlarında büyütülen hücrelerin sınıflandırılması

Hücre kültür ortamına serum eklenen ve eklenmeyen 3 grup hücrenin sınıflandırma başarılarını araştırmak için öncelikle hücrelere ait spektrumlardan öz nitelik çıkarma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sınıflandırıcıların sınıflandırma başarısı çıkarılan öz niteliklere bağlı olduğundan 3 farklı öz nitelik çıkarma yöntemi kullanılmıştır. TBA, YYBBA ve SF öz nitelik çıkarma yöntemleri kullanılarak serum içeren ve içermeyen hücre gruplarından 50 öz nitelik çıkarılıp DVM ve KEYK sınıflandırıcılarının girişlerine uygulanmıştır. Sınıflandırıcı performansları 10 kat çapraz doğrulama yöntemi kullanılarak objektif olarak değerlendirilmiştir. Hücre kültür ortamına serum eklenmeyen hücrelerden elde edilen YZRS spektrumlarına ait sınıflandırıcı performanslarını gösteren karmaşıklık matrisi Şekil 3’te görülmektedir. Verilen matriste satırlar her bir sınıf etiketine ait gerçek sayıları, sütunlar ise ilgili sınıf etiketine ait model tarafından tahmin edilen sayıları göstermektedir. Matrisin köşegeni üzerinde yer alan sayılar sınıflandırıcı tarafından doğru olarak sınıflandırılan sınıf etiketine ait sayıları göstermektedir. TBA, YYBBA ve SF ile öz nitelik çıkarımı yapıp DVM ile sınıflandırılan örnekler için karmaşıklık matrisi Şekil 3a, 3b ve 3c’de verilmiştir. TBA-DVM için 91 ± 0.5 , YYBBA-DVM 90.3 ± 0.63 ve SF-DVM 96.4 ± 0.4 sınıflandırma doğruluğu elde edilmiştir. Şekil 3d, 3e ve 3f’de ise TBA, YYBBA ve SF ile öz nitelik çıkarımı yapıp KEYK algoritması ile sınıflandırılan örnekler için karmaşıklık matrisleri verilmiştir. TBA-KEYK için 96.8 ± 0.29 , YYBBA-KEYK için 96.5 ± 0.24 ve SF-KEYK için 96.2 ± 0.19 sınıflandırma doğruluğu bulunmuştur. Sınıflandırma sonuçları Tablo 2’de verilmiştir. Burada verilen sonuçlar değerlendirildiğinde KEYK algoritmasının serum içermeyen ortamda kültürlenmiş hücrelerden elde edilen spektrumların sınıflandırılmasında 3 öz nitelik çıkarma yöntemi kullanıldığında da yüksek bir sınıflandırma başarısı verdiği görülmektedir. DVM ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde SF ile çıkarılan öz nitelikler en yüksek sınıflandırma başarısını verirken TBA ve YYBBA yöntemlerinden elde edilen öz niteliklerin sınıflandırma başarısı SF’ye kıyasla bir miktar düşük olarak elde edilmiştir. Melanomanın tespitinde, serum içermeyen ortamda kültürlenmiş hücrelerden elde edilen YZRS spektrumlarını sınıflandırmak için YYBBA ve SF öz nitelik çıkarma yöntemleri DVM ve KEYK algoritmalarıyla birlikte kullanıldığında oldukça yüksek sınıflandırma doğrulukları bulunmuştur. Bununla birlikte en yüksek sınıflandırma doğruluğu TBA ve KEYK algoritması birlikte kullanıldığında elde edilmiştir. Şekil 3d’de deri fibroblast hücrelerine ait 3 spektrum, tümör ilişkili fibroblastta ait 3 spektrum ve melanomaya ait 13 spektrum yanlış olarak sınıflandırılmıştır. Böylece 1239 spektrumdan yalnızca 19 spektrum yanlış sınıflandırılarak oldukça yüksek bir sınıflandırma başarısı elde edilmiştir.



Şekil 3. Serum eklenmeyen ortamda büyütülen hücrelere ait YZRS spektrumlarının farklı öz nitelik çıkarma yöntemleri ve sınıflandırıcılar kullanılarak elde edilen karmaşıklık matrisleri. a. TBA b. YYBBA c. SF ile öz nitelik çıkarımı yapıp DVM ile sınıflandırılan örneklerin sınıflandırma sonuçları. d. TBA e. YYBBA f. SF ile öz nitelik çıkarımı yapıp KEYK ile sınıflandırılan örneklerin sınıflandırma sonuçları

Şekil 4'te serum içeren kültür ortamında büyütülen örneklerden elde edilen YZRS spektrumlarının sınıflandırma sonuçlarına ait karmaşıklık matrisleri görülmektedir. Bu kısımda toplanan YZRS spektrumlarının TBA, YYBBA ve SF ile öz nitelik çıkarımı yapıldıktan sonra DVM ve KEYK sınıflandırıcıları ile sınıflandırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4a, 4b ve 4c'de spektrumların TBA, YYBBA ve SF öz nitelik çıkarma yöntemleri ile öz nitelikleri çıkarıldıktan sonra DVM ile sınıflandırılması neticesinde elde edilen karmaşıklık matrisleri verilmiştir. TBA-DVM %86.8±0.79, YYBBA-DVM için %86.6±0.64 ve SF-DVM için %80.5±0.72 sınıflandırma doğruluğu elde edilmiştir. Şekil 4d, 4e ve 4f'de ise spektrumların öz nitelikleri çıkarıldıktan sonra KEYK algoritması kullanılarak sınıflandırılması neticesinde elde edilen karmaşıklık matrisleri verilmiştir. Burada da TBA-KEYK için %91.4±0.36, YYBBA-KEYK için %90.5±0.44 ve SF-KEYK için %74±0.66. sınıflandırma doğrulukları elde edilmiştir. Sınıflandırma sonuçları Tablo 2'de görülmektedir. Serum içeren ortamda kültürlenmiş hücrelerden elde edilen spektrumların sınıflandırma başarıları incelendiğinde en başarılı sonucu %91.4±0.36 doğruluk ile TBA ile öz nitelik çıkarımı yapıp KEYK algoritması kullanılarak sınıflandırılan örneklerden elde edilmiştir. Buna ait karmaşıklık matrisi Şekil 4d'de deri fibroblast hücrelerine ait 7 spektrum, tümör ilişkili fibroblastta ait 23 spektrum ve melanomaya ait 24 spektrum yanlış olarak sınıflandırılmıştır. Böylece 1239 spektrumdan 54 spektrum yanlış sınıflandırılmıştır. Bu çalışma kapsamında kullanılan veri setinde hem serum eklenen hem de eklenmeyen ortamdan toplanan YZRS spektrumlarında melanoma hücrelerinden toplanan YZRS spektrumlarının



Şekil 4. Serum eklenen ortamda büyütülen hücrelere ait YZRS spektrumlarının farklı öz nitelik çıkarma yöntemleri ve sınıflandırıcılar kullanılarak elde edilen karmaşıklık matrisleri a. TBA b. YYBBA c. SF ile öz nitelik çıkarımı yapıp DVM ile sınıflandırılan örneklerin sınıflandırma sonuçları. d. TBA e. YYBBA f. SF ile öz nitelik çıkarımı yapıp KEYK ile sınıflandırılan örneklerin sınıflandırma sonuçları

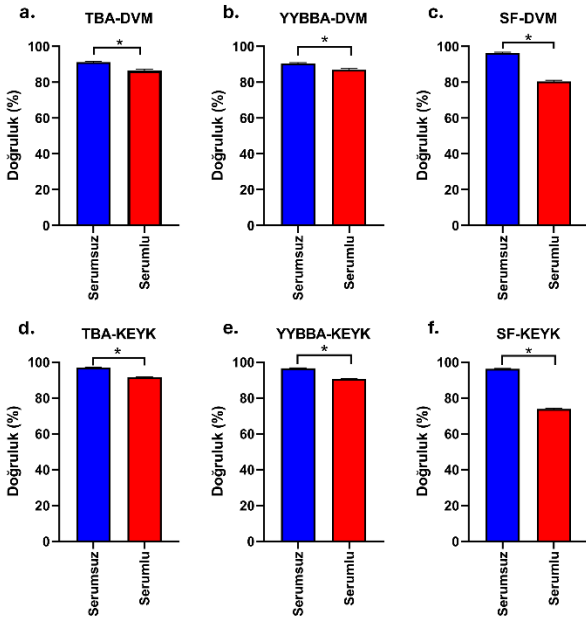
sayısı diğer hücre gruplarından fazladır. Şekil 3 ve 4'te verilen karmaşıklık matrisleri incelendiğinde sınıflar arasındaki bu dengesizliğin, sınıflandırıcı modellerinin dengesiz sınıflar lehine yanlış öğrenmesine yol açmadığı görülmektedir. Burada kullanılan çapraz doğrulama yöntemi sayesinde veri seti defalarca eğitim-test sürecine tabi tutulmaktadır. Dengesiz sınıflara sahip veri setlerinde, model bazen tesadüfen bir eğitim-test setinde iyi performans gösterebilir. Çapraz doğrulama, veri setini tekrar tekrar kullanarak bu durumu dengelemektedir.

Tablo 2. Serum eklenen ve eklenmeyen ortamda büyütülen hücrelere ait spektrumların sınıflandırma sonuçları

Serum eklenmeyen ortamda büyütülen hücrelere ait sınıflandırma doğruluğu (%) ± standart sapma sonuçları			
	TBA	YYBBA	SF
DVM	%91±0.5	%90.3±0.63	%96.4±0.4
KEYK	%96.8±0.29	%96.5±0.24	%96.2±0.19
Serum eklenen ortamda büyütülen hücrelere ait sınıflandırma doğruluğu (%) ± standart sapma sonuçları			
	TBA	YYBBA	SF
DVM	%86.8±0.79	%86.6±0.64	%80.5±0.72
KEYK	%91.4±0.36	%90.5±0.44	%74±0.66

Şekil 3 ve 4'te elde edilen sonuçlara göre melanomanın tespitinde serum eklenmeyen ortamda kültürlenmiş hücre gruplarından elde edilen spektrumların sınıflandırma sonuçlarının serum eklenen ortamda kültürlenmiş hücre

gruplarından elde edilen spektrumların sınıflandırma başarılarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte bu sonuçların istatistiksel analiz ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla Mann-Whitney U test kullanılmıştır. Şekil 5'te serum eklenen ve eklenmeyen ortamlarda kültürlenmiş hücrelerden elde edilen spektrumların 3 öz nitelik çıkarma yöntemi ile öz nitelikleri çıkarıldıktan sonra DVM ve KEYK algoritması ile bulunan sınıflandırma sonuçlarının Mann-Whitney U test ile istatistiksel analiz sonuçları görülmektedir. Verilen 6 durum için de $p < 0.001$ bulunmuştur. Bu durum serum eklenen ve eklenmeyen ortamlardan elde edilen spektrumların sınıflandırma başarıları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.



Şekil 5. Serum eklenen ve eklenmeyen ortamlarda kültürlenmiş hücrelerin TBA, YYBBA ve SF öz nitelik çıkarma yöntemleri ve DVM ve KEYK algoritmaları kullanılarak elde edilen sınıflandırma doğruluklarının Mann-Whitney U test ile bulunan istatistiksel analiz sonuçları. a. TBA b. YYBBA c. SF ile öz nitelik çıkarımı yapıp DVM ile sınıflandırılan serum içeren ve içermeyen örneklerin istatistiksel analiz sonuçları d. TBA e. YYBBA f. SF ile öz nitelik çıkarımı yapıp KEYK ile sınıflandırılan serum içeren ve içermeyen örneklerin istatistiksel analiz sonuçları. * $p < 0.001$ bulunmuştur.

Şu ana kadar verilen sonuçlar kapsamında hücre kültür ortamına serum eklenmeyen hücrelerden toplanan spektrumların daha yüksek sınıflandırma başarısına sahip olduğu görülmektedir. Farklı öz nitelik çıkarım yöntemleri sınıflandırıcı başarısını değiştirebildiğinden çalışma kapsamında TBA, YYBBA ve SF olmak üzere 3 farklı öz nitelik çıkarım yöntemine yer verilmiştir. Bu yöntemlerden TBA ve YYBBA verilerden doğrusal öz nitelikler çıkarırken SF doğrusal olmayan öz nitelikler çıkarmaktadır. Serum eklenmeyen grupta SF yöntemi kullanılarak öz nitelik çıkarımı yapıp DVM veya KEYK algoritmaları ile

sınıflandırıldığında diğer öz nitelik çıkarma metodları ile oldukça yakın sınıflandırma sonuçları elde edilmiştir. Öte yandan serum eklenen grupta SF yöntemi kullanılarak öz nitelik çıkarımı yapıp DVM veya KEYK algoritmaları ile sınıflandırıldığında diğer öz nitelik çıkarma metodlarından daha düşük sınıflandırma sonuçlarına ulaşılmıştır. Doğrusal olmayan öz nitelik çıkarım metodları bazı durumlarda doğrusal yöntemlerden daha yüksek sonuç sağlayabildiği gibi [22] bazı durumlarda da daha düşük sonuç verebilmektedir. Bu durum kullanılan veri setinin yapısına bağlı olarak değişebilmektedir. Serum eklenen hücrelere ait YZRS spektrumlarının sınıflandırılmasında KEYK algoritması ile birlikte kullanılan her 3 öz nitelik çıkarım yöntemi de birbirine oldukça yakın şekilde sınıflandırma doğruluğu sağlamıştır. Fakat en yüksek sınıflandırma doğruluğunu hem serum içeren hem de içermeyen grupta KEYK sınıflandırma algoritması ile birlikte kullanılan TBA öz nitelik çıkarım yönteminin sağladığı görülmektedir. TBA ile birlikte kullanılan KEYK sınıflandırma yöntemi YZRS spektrumlarının sınıflandırılmasında başarılı sonuçlar üretmektedir [34]. Burada kullanılan DVM ve KEYK algoritmaları birbirine yakın sınıflandırma sonuçları vermekle birlikte en yüksek sınıflandırma doğruluğunun KEYK algoritması tarafından sağlanmasının birkaç sebebi olabilir. Verilerin farklı sınıflara iyi ayrılmış olduğu, ancak bu ayrımın daha bölgesel düzeyde olduğu bir veri dağılımı söz konusuysa, KEYK algoritması bu bölgesel sınırları DVM'den daha iyi yakalamış olabilir. Bir diğer neden özellikle sınıfların birbirine karıştığı bölgelerde DVM'nin doğrusal olmayan sınırları, KEYK algoritmasının bölgesel komşu ilişkilerine göre daha zayıf performans göstermiş olabilir [35].

Hücre kültür ortamına serum eklenen hücrelerden elde edilen YZRS spektrumlarının sınıflandırma başarısının düşük olması çeşitli sebeplerden kaynaklanabilir. Serum; çeşitli proteinler, lipitler ve diğer biyomolekülleri içerir ve bunlar YZRS sinyaline katkıda bulunabilir. Bu ek bileşenler, spektral karmaşıklığı artırarak hücrel bileşenlere özgü sinyalleri izole etmeyi zorlaştırabilir. Örneğin, serumda bulunan besin maddelerinin ve proteinlerin hücreler tarafından alınmasındaki değişiklikler, hücre metabolizmasında ve zar kompozisyonunda değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle hücre kültür ortamına eklenen serum, hücrelerden toplanan YZRS spektrumlarını etkileyebilmektedir. Bu durum, sağlıklı ve kanserli hücrelerden toplanan spektrumların ayırt edilmesini zorlaştıracak şekilde spektrumda yeni piklerin oluşumu veya pik şiddetlerinde değişimlere sebep olmuş olabilir. Literatürde ortama eklenen serumun hücrelerden toplanan Raman ya da YZRS spektrumlarının üzerindeki etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yerine farklı kültür ortamından kaynaklanan biyokimyasal değişikliklerin Raman spektroskopisi ile tespitine dayalı bir çalışma mevcuttur [36]. Gargotti vd. tarafından yapılan bu çalışmada HeLa ölümsüzleştirilmiş insan servikal hücreleri ve HaCaT dermal hücreleri, üç farklı yüzeyde kültüre edilmiştir. Farklı yüzeylerde yetiştirilen her iki hücre tipi üzerinde gerçekleştirilen bu çalışma, in vitro hücre kültürü ortamının hücre döngüsü üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu

göstermiştir. Bakteri hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda ise bakterilerin büyütülmesi için kullanılan farklı besiyerlerinin bakteriden elde edilen spektrumlarda değişiklik meydana getirdiği rapor edilmiştir [37,38]. Mevcut çalışmalar, hücre kültür ortamında yapılan değişikliklerin hücreler üzerinde çeşitli biyokimyasal değişiklikler meydana getirdiğini ve bu değişikliklerin Raman ya da YZRS ile tespit edilebildiğini göstermektedir. Erzina vd. [17] tarafından gerçekleştirilen çalışmada toplanan ve halka açık olarak paylaşılan veri setinde hücre kültür ortamına serum eklenen ve eklenmeyen hücrelerden elde edilen YZRS spektrumlarında farklılıklar meydana geldiği görülmektedir. Fakat meydana gelen bu farklılıkların kanserli ve sağlıklı hücrelere ait spektrumların ayrıştırılmasında nasıl bir etki yaratacağı şu ana kadar araştırılmamıştır.

Bu çalışma kapsamında hücre kültür ortamına serum eklenerek ve eklenmeden kültürlenmiş normal deri fibroblast, tümör ilişkili fibroblast ve melanoma hücrelerine ait spektrumlarda meydana gelen farklılıkların hücrelerin makine öğrenme teknikleri ile ayırt edilme başarısına olan katkısı ölçülmüştür. Elde edilen bulgular serum eklenmeyen ortamda kültürlenmiş hücre gruplarından elde edilen YZRS spektrumlarının daha yüksek bir sınıflandırma başarısı ile ayırt edilebildiğini göstermiştir.

4 Sonuçlar

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında oldukça agresif bir kanser türü olan melanomanın YZRS ve makine öğrenme teknikleri ile tespitinde hücre kültür ortamına eklenen serumun sağlıklı, tümör ilişkili ve melanoma hücrelerinin sınıflandırılması üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaç için hücre kültür ortamına serum eklenen ve eklenmeyen hücrelerin YZRS spektrumları toplanarak farklı öz nitelik çıkarma metodları ile öz nitelik çıkarımı yapılmış ve DVM ve KEYK algoritmaları ile sınıflandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Serum eklenmeyen ortamda kültürlenmiş normal deri fibroblast, tümör ilişkili fibroblast ve melanoma hücrelerine ait YZRS spektrumlarından TBA, YYBBA ve SF yöntemleri ile öz nitelikler çıkarılıp sınıflandırıldığında serum eklenmeyen ortamdaki hücrelerden elde edilen YZRS spektrumlarının sınıflandırma başarısının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Burada TBA ve KEYK algoritması birlikte kullanıldığında sınıflandırma doğruluğu 96.8 ± 0.29 olarak elde edilmiştir. Serum içeren ve içermeyen ortamda kültürlenmiş hücre gruplarının sınıflandırma başarıları arasında istatistiksel açıdan da anlamlı bir fark bulunmuştur. Sonuç olarak melanomanın sağlıklı ve tümör ilişkili hücrelerden ayırt edilmesinde YZRS ve makine öğrenme teknikleri birlikte kullanıldığında oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Kültür aşamasında hücre ortamına serum eklenmeyen sağlıklı, tümör ilişkili fibroblast ve melanoma hücrelerinin YZRS spektrumlarının sınıflandırma başarısında serum eklenen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede fark bulunmuştur. Bununla birlikte burada serum eklenen ve eklenmeyen hücre gruplarından elde edilen YZRS spektrumlarındaki farklılaşmaları anlayabilmek için serumun hücre metabolizması üzerine etkisinin kapsamlı olarak araştırılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca bu

çalışma kapsamında yalnızca deri fibroblast, tümör ilişkili fibroblast ve melanoma hücrelerinden toplanan spektrumlar kullanılarak ortama eklenen serumun sınıflandırma başarısı üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların genelleştirilebilmesi için diğer hücre gruplarında yapılacak benzer çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan açık kaynaklı veri setini sağladıkları için Trelin A. vd.'ne teşekkür ederim.

Çıkar çatışması

Yazar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Benzerlik oranı: %7

Kaynaklar

- [1] X. Ma, H. Yu, Global Burden of Cancer, *Yale J Biol Med* 79, 85–94, 2006.
- [2] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 209–249, 2021.
- [3] C.C. Compton, D.R. Byrd, J. Garcia-Aguilar, S.H. Kurtzman, A. Olawaiye, M.K. AJCC Cancer Staging Manual and Handbook, Springer, New York, NY, 2012.
- [4] Melanoma of the Skin- Cancer Stat Facts, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> (Son Erişim 18 Ağustos 2024).
- [5] G.C. Karakousis, B.J. Czerniecki, *Diagnosis of Melanoma, PET Clinics* 6, 1–8, 2011.
- [6] Z. Al-Shaebi, F. Uysal Ciloglu, M. Nasser, M. Kahraman, O. Aydin, *Staphylococcus Aureus-Related antibiotic resistance detection using synergy of Surface-Enhanced Raman spectroscopy and deep learning, Biomedical Signal Processing and Control* 91, 105933, 2024.
- [7] M. Akdeniz, F.U. Ciloglu, C.U. Tunc, U. Yilmaz, D. Kanarya, P. Atalay, O. Aydin, Investigation of mammalian cells expressing SARS-CoV-2 proteins by surface-enhanced Raman scattering and multivariate analysis, *Analyst* 147, 1213–1221, 2022.
- [8] X. Li, G. Yang, S. Zhang, H. Ren, Advancing clinical cancer care: Unveiling the power of surface-enhanced Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy* 55, 429–444, 2024.
- [9] W. Li, C. Yang, H. Zhao, M. Sun, Z. Bao, Surface enhanced Raman spectroscopy on diagnosis of malignant tumors, *Applied Spectroscopy Reviews* 59, 678-709, 2023.
- [10] D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends, *Anal Bioanal Chem* 403, 27–54, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5631-x>.
- [11] X. Zhu, T. Xu, Q. Lin, Y. Duan, Technical Development of Raman Spectroscopy: From

- Instrumental to Advanced Combined Technologies, *Applied Spectroscopy Reviews* 49, 64–82, 2014. <https://doi.org/10.1080/05704928.2013.798801>.
- [12] Y. Qi, D. Hu, Y. Jiang, Z. Wu, M. Zheng, E.X. Chen, Y. Liang, M.A. Sadi, K. Zhang, Y.P. Chen, Recent Progresses in Machine Learning Assisted Raman Spectroscopy, *Advanced Optical Materials* 11, 2203104, 2023. <https://doi.org/10.1002/adom.202203104>.
- [13] H. Shin, S. Oh, S. Hong, M. Kang, D. Kang, Y. Ji, B.H. Choi, K.-W. Kang, H. Jeong, Y. Park, S. Hong, H.K. Kim, Y. Choi, Early-Stage Lung Cancer Diagnosis by Deep Learning-Based Spectroscopic Analysis of Circulating Exosomes, *ACS Nano* 14, 5435–5444, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b09119>.
- [14] X. Qiu, X. Wu, X. Fang, Q. Fu, P. Wang, X. Wang, S. Li, Y. Li, Raman spectroscopy combined with deep learning for rapid detection of melanoma at the single cell level, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 286, 122029, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122029>.
- [15] J. Wang, Y.-C. Kao, Q. Zhou, A. Wuethrich, M.S. Stark, H. Schaidler, H.P. Soyer, L.L. Lin, M. Trau, An Integrated Microfluidic-SERS Platform Enables Sensitive Phenotyping of Serum Extracellular Vesicles in Early Stage Melanomas, *Advanced Functional Materials* 32, 2010296, 2022. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010296>.
- [16] M. Yousuff, R. Babu, Deep autoencoder based hybrid dimensionality reduction approach for classification of SERS for melanoma cancer diagnostics, *Journal of Intelligent & Fuzzy Systems* 43, 7647–7661, 2022. <https://doi.org/10.3233/JIFS-212777>.
- [17] M. Erzina, A. Trelin, O. Guselnikova, B. Dvorankova, K. Strnadova, A. Perminova, P. Ulbrich, D. Mares, V. Jerabek, R. Elashnikov, V. Svorcik, O. Lyutakov, Precise cancer detection via the combination of functionalized SERS surfaces and convolutional neural network with independent inputs, *Sensors and Actuators B: Chemical* 308, 127660, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127660>.
- [18] H.E.E. Duruel, N.S. Çağan, S. Işık, F.E. Kayhan, Hücre Kültürlerine Genel Bakış, *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 47, 136–149, 2021. <https://doi.org/10.35238/sufefd.935531>
- [19] S. Weiskirchen, S.K. Schröder, E.M. Buhl, R. Weiskirchen, A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems, *Cells* 12, 682, 2023. <https://doi.org/10.3390/cells12050682>.
- [20] T. Yao, Y. Asayama, Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues, *Reprod Med Biol* 16, 99–117, 2017. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>.
- [21] A. Verma, M. Verma, A. Singh, Animal tissue culture principles and applications, *Animal Biotechnology* 269–293, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>.
- [22] F.U. Ciloglu, M. Hora, A. Gundogdu, M. Kahraman, M. Tokmakci, O. Aydin, SERS-based sensor with a machine learning based effective feature extraction technique for fast detection of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Analytica Chimica Acta* 1221 340094, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340094>.
- [23] A.H. Arslan, F.U. Ciloglu, U. Yilmaz, E. Simsek, O. Aydin, Discrimination of waterborne pathogens, *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with principal component analysis and hierarchical clustering, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 267, 120475, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120475>.
- [24] I. T. Jolliffe, *Principal Component Analysis*, 2nd Edition, Springer, 2002.
- [25] A. Hyvärinen, E. Oja, Independent component analysis: algorithms and applications, *Neural Networks* 13, 411–430, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0893-6080\(00\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0893-6080(00)00026-5).
- [26] Q. Le, A. Karpenko, J. Ngiam, A. Ng, ICA with Reconstruction Cost for Efficient Overcomplete Feature Learning, in: *Advances in Neural Information Processing Systems*, Curran Associates, Inc., 2011. <https://proceedings.neurips.cc/paper/2011/hash/233509073ed3432027d48b1a83f5fbd2-Abstract.html> (Son erişim 30 Nisan, 2024)
- [27] J. Ngiam, Z. Chen, S. Bhaskar, P. Koh, A. Ng, Sparse Filtering, in: *Advances in Neural Information Processing Systems*, Curran Associates, Inc., 2011. https://papers.nips.cc/paper_files/paper/2011/hash/192fc044e74dffe144f9ac5dc9f3395-Abstract.html (Son erişim 3 Mayıs, 2024).
- [28] Z. Zhang, Q. Yang, W. Zhou, A Feature Extraction Method Based on Sparse Filtering With Local Structure Preserved and Its Applications to Bearing Fault Diagnosis, *IEEE Access* 7, 160559–160572, 2019. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2951409>.
- [29] P.E. McKnight, J. Najab, Mann-Whitney U Test, in: *The Corsini Encyclopedia of Psychology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470479216.corpsy0524>.
- [30] A.C.S. Talari, Z. Movasaghi, S. Rehman, I. ur Rehman, Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews* 50, 46–111, 2015. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.923902>.
- [31] U. Utzinger, D.L. Heintzelman, A. Mahadevan-Jansen, A. Malpica, M. Follen, R. Richards-Kortum, Near-Infrared Raman Spectroscopy for in vivo Detection of Cervical Precancers, *Appl Spectrosc* 55, 955–959, 2001. <https://doi.org/10.1366/0003702011953018>.
- [32] J.P. Mather, P.E. Roberts, eds., *Serum-Free Culture*, in: *Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique*, Springer, 1998.
- [33] R.G. Werner, W. Noé, Mammalian cell cultures. Part I: Characterization, morphology and metabolism, *Arzneimittelforschung* 43, 1134–1139, 1993.

- [34] F.U. Ciloglu, A.M. Saridag, I.H. Kilic, M. Tokmakci, M. Kahraman, O. Aydin, Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy and machine learning techniques, *Analyst* 145, 7559–7570, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0AN00476F>.
- [35] Christopher M. Bishop, *Pattern Recognition and Machine Learning*, Springer New York, 2006.
- [36] M. Gargotti, E. Efeoglu, H.J. Byrne, A. Casey, Raman spectroscopy detects biochemical changes due to different cell culture environments in live cells in vitro, *Anal Bioanal Chem* 410, 7537–7550, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1371-5>.
- [37] C. Hanson, M.M. Bishop, J.T. Barney, E. Vargis, Effect of growth media and phase on Raman spectra and discrimination of mycobacteria, *Journal of Biophotonics* 12, e201900150, 2019. <https://doi.org/10.1002/jbio.201900150>.
- [38] K. Mlynáriková, O. Samek, S. Bernatová, F. Růžicka, J. Ježek, A. Hároniková, M. Šiler, P. Zemánek, V. Holá, Influence of Culture Media on Microbial Fingerprints Using Raman Spectroscopy, *Sensors* 15, 29635–29647, 2015. <https://doi.org/10.3390/s151129635>

Ekler

Veri Kullanılabilirliği: Bu çalışma kapsamında kullanılan veri seti aşağıdaki adreste halka açık şekilde paylaşılmıştır. <https://www.kaggle.com/datasets/andriitrelin/cells-raman-spectra>

Kısaltmalar

YZRS	Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi
TBA	Temel Bileşen Analizi
YYBBA	Yeniden Yapılanma Bağımsız Bileşen Analizi
SF	Seyrek Filtreleme
DVM	Destek Vektör Makinası
KEYK	K en Yakın Komşu

