

Poznań, 10 września 2016

OCENA

Ocena rozprawy doktorskiej mgr fiz. med. Agnieszki Seraszek-Jaros z Zakładu Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

pt.: **"NOWE METODY OCENY MORFOMETRYCZNEJ CYFROWYCH PREPARATÓW HISTOLOGICZNYCH W OBRAZOWYCH BAZACH DANYCH"**

Dynamiczny rozwój technik informatycznych jaki dokonał się w ostatnich dekadach ubiegłego wieku przyczynił się do opracowania nowoczesnych technologii które umożliwiają pozyskiwanie obrazów preparatów histologicznych w zapisie cyfrowym i ich archiwizację w komputerowej bazie systemu. Cyfrowy zapis zeskanowanego preparatu nazwany preparatem wirtualnym z uwagi na wysoką jakość jest coraz szerzej wykorzystywany dla celów edukacyjnych, potrzeb diagnostycznych jak i do prowadzenia zaawansowanych badań naukowych. Ich zastosowanie do analiz komputerowych warunkuje postęp w morfometrii. Automatyczne systemy do ilościowej oceny wybranych cech morfologicznych, ekspresji biomarkerów są wyjątkowo ważnym narzędziem obiektywizującym obserwacje mikroskopowe. Etapy postępowania w analizie cyfrowych preparatów są ciągle udoskonalane, wzbogacane o nowe rozwiązania i programy uwzględniające oczekiwania i potrzeby badaczy. Tak więc tematyka badawcza podjęta przez Panią Agnieszkę Seraszek-Jaros jest poparta racjonalnymi potrzebami obiektywizacji analizy ilościowej preparatów cyfrowych. Praca dotyczy jednego z ważniejszych zadań analizy obrazów czyli etapu selekcji struktur, obiektów które będą przedmiotem analizy morfometrycznej. Jest to kolejna cenna propozycja wzbogacenia systemu do ilościowej oceny ekspresji markerów wychodząca z Zakładu Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej pod kierunkiem prof. Elżbiety Kaczmarek .

Manuskrypt posiada typowy dla tego rodzaju opracowań układ. Zawiera 92 strony tekstu, wraz z piśmiennictwem obejmującym 104 pozycje, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz bogatą dokumentację w postaci 13 tabel i 34 rycin wraz z ich częścią opisową. Dodatkowo w Załączniku zawarto 3 tabele o kolejnych numerach

14-16. Proporcje objętościowe rozdziałów pracy (wstęp łącznie z celem pracy - 21 stron, materiał i metody - 14 stron, wyniki z dokumentacją – 16 stron oraz 8 stron omówienia) wydają się być zachowane prawidłowo.

Wstęp jest dobrym i wyczerpującym wprowadzeniem czytelnika w zagadnienia będące tematem rozprawy. Wskazując na osiągnięcia technologiczne w dziedzinie wirtualnych preparatów i wirtualnej mikroskopii, ich wykorzystanie w wielu dziedzinach autorka podkreśla, że postęp w tym zakresie jest związany z możliwością rejestracji preparatów histologicznych przez wyspecjalizowane urządzenia zwane skanerami. Interesującym uzupełnieniem tych danych jest zestawienie aktualnie dostępnych typów skanerów oraz współpracujące z nimi oprogramowania. Kolejnym tematem, wiążącym się ściśle z tematem pracy są różne aspekty przygotowania cyfrowych preparatów histologicznych do ilościowej oceny. Autorka wyjaśnia podstawy teoretyczne analizy cyfrowych preparatów i zapoznaje czytelnika z zasadami wykonywania segmentacji obrazów cyfrowych w celu wyodrębnienia struktur morfologicznych z pozytywnym odczynem immunohistochemicznym. Wiele miejsca poświęca nowo opracowanym metodom segmentacji przez rozrost i przez podział, tj segmentacji metodą szachownicy oraz metodą multirozdzielczą które planuje wykorzystać w rozprawie. Ten etap przygotowania wirtualnego preparatu autorka opisuje szczegółowo co znacznie przybliży przyjęte postępowanie. Dobrym uzupełnieniem tematu jest zilustrowanie efektów działania algorytmu przez podział obrazu na kwadraty o zadanej wielkości w segmentacji met. szachownicy. W metodzie multirozdzielczej, która jest realizowana przez łączenie pikseli obrazu o zbliżonym stopniu podobieństwa wg takich cech jak kształt, kolor zwraca uwagę postępowanie zbliżone do postrzegania obrazów przez obserwatora. Dalsze etapy przygotowania preparatu do analiz związane z klasyfikacją pikseli do odpowiednich struktur, którą poprzedza utworzenie klas obiektów wg przyjętych kryteriów (poziom jasności, kształt, sąsiedztwo) są również czytelnie opisane i zobrazowane. Cenne informacje dla czytelnika znajduje on w kolejnym podrozdziale w którym doktorantka wymienia ogólnodostępne programy komputerowe służące do analiz morfologicznych, ilościowych obrazów cyfrowych o różnym stopniu zaawansowania uzupełniając te dane bogatą literaturą. Rozdział *Wstęp* kończy ciekawe podsumowanie historii badań morfometrycznych.

W przedłożonej do oceny rozprawie Pani mgr Agnieszka Seraszek-Jaros pojęła próbę obiektywizacji / optymalizacji metod ilościowej oceny ekspresji reakcji immunohistochemicznej uwzględniając dwa markery białko S-100 oraz Ki-67. W tym celu zaplanowała: (1) zastosować opisane we wstępie nowe metody segmentacji do wyodrębnienia produktów reakcji immunohistochemicznej; (2) przeprowadzić analizę ilościową ekspresji markerów po zastosowaniu obu metod segmentacji, oraz (3) porównać wyniki komputerowej analizy z wynikami oceny histologa w skali półilościowej. Cel pracy przedstawiony w rozprawie wyczerpuje wymogi stawiane tego typu badaniom. Nasuwa mi się uwaga, że w p. 2-gim korzystniej byłoby wyrazić zamiar porównania obu metod segmentacji na podstawie analizy ilościowej ekspresji badanych markerów.

W rozdziale "**Materiał i metody**" autorka przedstawia źródło materiału do badań, który stanowią archiwalne preparaty histologiczne z pozytywną reakcją immunocytochemiczną na białko S100 w pęcherzykach żółciowych oraz antygenu proliferacyjnego Ki-67 w nowotworach jelita grubego i odbytnicy. Materiał ten jest wprawdzie udostępniony przez Katedrę Histologii i Embriologii ale znajdziemy w tym podrozdziale istotne szczegóły dot. warunków pobrania materiału od pacjentów, procedury pozyskania preparatów histologicznych, reakcji immunohistochemicznych. Kolejne podrozdziały dotyczą ściśle tematu pracy. Informują o aparaturze skanującej preparaty, programach komputerowych jakie zastosowano do przetwarzania obrazów, do technik segmentacji oraz analizy ilościowej. Opisy w tym względzie są adekwatne do rozwiązania założeń i wyczerpująco informują czytelnika o przyjętym postępowaniu. Doktorantka szczegółowo wyjaśnia zasady przeprowadzania dwóch technik segmentacji zastosowanych w pracy tj. szachownicowej i multirozdzielczej dla tych samych obrazów w celu wyodrębnienia reakcji immunocytochemicznych a następnie oceny ilościowej ekspresji markerów oraz pomiaru pola powierzchni skrawka. Parametry techniki segmentacji multirozdzielczej doktorantka ustaliła na podstawie badań pilotażowych dokumentując ich wyniki w tabelach. Podrozdział ten jest wzbogacony o schematy zasad segmentacji, ilustrowany przykładowymi obrazami preparatów cyfrowych wykonanych przed i po zastosowaniu segmentacji. Na podstawie analizy ilościowej ekspresji białek doktorantka określiła udział procentowy poszczególnych reakcji dla obu technik segmentacji a dla ekspresji Ki-67 dodatkowo określiła odsetek komórek immunopozytywnych oraz ich udział

objętościowy. Do oceny zgodności wyników komputerowej analizy z wynikami oceny w skali półilościowej wykonanej przez histologa autorka wybrała reakcję Ki-67 co uważam za słuszną decyzję ponieważ jest to marker jądrowy co wiąże się z jednoznaczną lokalizacją odczynu. Rozdział ten kończy **Analiza statystyczna wyników badań** ze szczegółowym opisem wykorzystanych w pracy testów statystycznych.

Wyniki analizy porównawczej segmentacji szachownicowej oraz multirozdzielczej przeprowadzone na podstawie oceny ekspresji badanych markerów autorka przedstawia w sposób wiarygodny i wyczerpująco udokumentowany. Dokumentacja składająca się z tabel i rycin obrazuje wyniki z kolejnych etapów analiz ilościowych po zastosowaniu obu technik segmentacji jak i wyniki szczegółowych analiz statystycznych (współczynniki zgodności Cronbacha, wyniki korelacji rang Spearmana). Statystycznie istotne różnice pomiędzy wynikami po zastosowaniu obu segmentacji dotyczą udziału procentowego powierzchni reakcji zarówno S-100 jak i Ki-67 oraz udziału objętościowego jąder z ekspresją Ki-67. Ciekawą innowacją w tych badaniach jest przedstawienie wyników reakcji Ki-67 w skali Alfreda ponieważ zabieg ten przybliżył kryteria morfologiczne tej skali z kryteriami jakie są definiowane dla analizy półilościowej. Znalazło to wyraz w wysokiej korelacji jaką wykazała doktorantka pomiędzy wynikami w skali Alfreda a wynikami oceny półilościowej w IRS i Gatter, niezależnie od stosowanej techniki segmentacji. Powyższe postępowanie dla wyrażenia wyników analizy ilościowej, w przyszłości może zaowocować zwiększeniem przydatności metod morfometrycznych w rutynowej diagnostyce patologicznej.

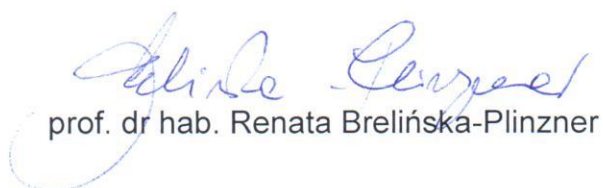
Wyniki przeprowadzonych badań autorka dyskutuje w rozdziale **"Dyskusja"** konfrontując je z publikacjami w recenzowanych czasopismach polskich i międzynarodowych. Dużo uwagi poświęca czynnikom wpływającym na interpretację obrazu, wymieniając zarówno procedury histologiczne, jak i samą reakcję immunohistochemiczną, które w znacznym stopniu decydują o jakości obrazu podobnie jak na wyniki oceny wpływa subiektywizm obserwatora. Jest to o tyle istotne, że w pełni uzasadnia próby doskonalenia już istniejących programów do analizy obrazu, jak i próby opracowania nowych algorytmów optymalizujących proces oceny obrazu mikroskopowego jakie podjęła doktorantka w swojej rozprawie. Dyskusję

kończy „Schemat algorytmów komputerowych stosowanych w celu wykrycia i analizy ilościowej reakcji”, który dla wielu czytelników wymaga jakiegoś omówienia w tekście.

W ocenianej pracy nie znalazłam usterek merytorycznych jeśli chodzi o adekwatność podejść badawczych i wykorzystywania informacji literaturowych. W tym względzie informacje zawarte w manuskrypcie wskazują na kompetencje autorki. Mam pewne uwagi dotyczące interpretacji wyników i precyzowania wniosków. Choć przedstawione przez Doktorantkę wyniki są obiecujące, to moim zdaniem nie są w pełni wykorzystane w dyskusji. Uważam bowiem, że zastosowanie 2. metod segmentacji do oceny ilościowej zakłada równocześnie, że uzyskane wyniki będą zbliżone albo że wyniki będą się istotnie różnić jak to wykazano w obecnej pracy. W mojej opinii stworzyło to znacznie większe pole rozważań niż znajduję w pracy. Zaznaczam jednak, że moje oczekiwania w tym temacie mogą znacznie odbiegać od spojrzenia informatyka. Najistotniejsze, przedyskutowane w pracy wyniki znalazły odbicie we wnioskach. Wnioski nie wybiegają poza zakres badań autora choć w moim odbiorze wniosek 3. jest zbliżony do 4. Odbiór pracy byłby znacznie bardziej przejrzysty, gdyby należycie zredagowany cel szczegółowy w p. 2 znalazł odpowiedź w kolejnym, dodatkowym wniosku będącym konsekwencją uzyskanych wyników badań tj. porównania obu segmentacji na podstawie analizy ilościowej. Moją uwagę zwrócił również pewien drobny błąd w opisie w rozdziale *Dyskusja* (str. 63 , w.11) z którego można wnosić, że „do oceny ekspresji Ki67 wprowadzono pomiar udziału objętości komórek immunopozytywnych” odnosząc to w dalszym tekście do pomiaru wielkości jader komórkowych. Z obowiązku recenzenta muszę również zauważyć, że dużym utrudnieniem dla czytelnika jest tytuł pracy a konkretnie sformułowanie „Nowe metody...” co można odczytać jako zapowiedź autorskiego programu (również str.61, w.9).

Należy podkreślić, że te drobne niedociągnięcia nie mają wpływu na moją opinię o ocenianej pracy, która jest konkretnym wkładem w rozwój metod ilościowej analizy ekspresji markerów i oceny obrazu mikroskopowego, opartych na automatycznym przetwarzaniu cyfrowych preparatów histologicznych w obrazowych bazach danych. Wdrożenie powyższych technik przyczyni się do obiektywizacji wyników badań mikroskopowych. Całokształt badań zaprezentowany w

manuskrypcie wskazuje na dojrzałość autora do stawiania i rozwiązywania problemów naukowych.. Dlatego też z satysfakcją stwierdzam, że walory badań i pracy, która spełnia wymogi rozprawy doktorskiej, stanowią wystarczającą podstawę do przedłożenia Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego I, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego wniosku o dopuszczenie mgr Agnieszki Seraszek-Jaros do dalszych etapów przewodu na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna.


prof. dr hab. Renata Brelińska-Plinzner