

Joanna Jagielska

STATYSTYCZNA ANALIZA OBRAZÓW  
MORFOLOGICZNYCH I JEJ MOŻLIWOŚCI  
ZASTOSOWANIA W MIKROSKOPII WIRTUALNEJ

Rozprawa doktorska

Zakład Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej  
Katedra Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor

Prof. dr hab. Elżbieta Kaczmarek

Poznań 2014

**Słowa kluczowe:**

wirtualna mikroskopia, skanowanie preparatu histologicznego, przetwarzanie obrazów cyfrowych, próbkowanie preparatów cyfrowych, segmentacja reakcji histo- i immunohistochemicznej, segmentacja jąder komórkowych, morfometria, statystyczna walidacja akwizycji obrazów, statystyczna walidacja segmentacji obrazów

**Key words:**

virtual microscopy, whole slide scanning, digital image processing, sampling methods of virtual slides, segmentation of histo- and immunohistochemical reaction, segmentation of cell nuclei, morphometry, statistical validation of image acquisition, statistical validation of image segmentation

## WYKAZ SKRÓTÓW

**AOI** (ang. *area of interest*)- obszar zainteresowania w analizie obrazów

**H+E**- hematoksylina i eozyna

**HSI** (ang. *hue, saturation, intensity*)- (ton, nasycenie, jasność) model opisu przestrzeni barw

**HSV** (ang. *hue, saturation, value*)- (odcień barwy, nasycenie barwy, jasność barwy)- model kodowania barwy w obrazie cyfrowym

**MMP2**- metaloproteinaza-2 macierzy

**NAF** (ang. *the nuclear area factor*)- parametr jądrowy

**PCNA**- jądrowy antygen komórek proliferujących

**PIIINP**- aminokońcowy peptyd prokolagenowy

**RGB** (ang. *red, green, blue*) – sposób kodowania barw w obrazie analogowym i cyfrowym

**TIMP1**- tkankowy inhibitor metaloproteinazy-1

**VSI**- format zapisu obrazu w skanerze DotSlide

## SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW .....	5
Rozdział I. WSTĘP .....	8
I.1. Wprowadzenie .....	8
I.2. Akwizycja cyfrowych obrazów mikroskopowych .....	9
I.3. Mikroskop wirtualny.....	12
I.4. Mikroskopia wirtualna w edukacji i telemedycynie .....	16
I.5. Próbkowanie cyfrowych preparatów histologicznych .....	17
I.6. Szacowanie liczby podobrazów w ilościowych badaniach morfologicznych ...	19
I.7. Rozpoznawanie struktur morfologicznych w preparatach cyfrowych .....	20
I.8. Segmentacja metodą działów wodnych .....	23
I.9. Wybrane metody diagnostyki włóknienia wątroby .....	24
Rozdział II. CELE PRACY .....	28
II.1. Cele pracy .....	28
II.2. Uzasadnienie wyboru celów pracy .....	28
Rozdział III. Materiał i metody.....	30
III.1. Materiał badany.....	30
III.2. Metodyka badań .....	31
III.2.1. Akwizycja i archiwizacja preparatów cyfrowych .....	31
III.2.2. Rozpoznawanie struktur morfologicznych metodami komputerowej analizy obrazów mikroskopowych.....	32
III.2.2.1. Rozpoznawanie i analiza ilościowa struktur w autorskim programie <i>Filtr HSV</i> .....	33
III.2.2.2. Rozpoznawanie i analiza ilościowa struktur w programie <i>Image-Pro Premier</i> .....	36
III.2.3. Parametr jądrowy NAF .....	40
III.2.4. Badania pilotażowe .....	40

III.2.5. Próbkowanie preparatów cyfrowych.....	41
III.2.6. Analiza statystyczna wyników badań .....	42
Rozdział IV. WYNIKI.....	44
IV.1. Ocena ilościowa, półilościowa oraz elastograficzna stopnia włóknienia wątroby w grupie pilotażowej .....	44
IV.2. Ocena ilościowa włóknienia śródmiąższu wątroby na podstawie analizy preparatów cyfrowych z reakcją czerwieni Syriusza .....	46
IV.3. Ocena liczby i wielkości jąder komórkowych z immunopozytywną reakcją PCNA w ocenie materiału z nowotworem jelita grubego.....	52
IV.4. Ocena współczynnika jądrowego NAF .....	57
Rozdział V. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....	59
V.1. Rejestracja i próbkowanie preparatów cyfrowych .....	59
V.2. Analiza morfometryczna struktur morfologicznych przy pomocy programów do analizy obrazów .....	61
V.3. Ocena liczby struktur morfologicznych .....	63
V.4. Standardy cyfrowych obrazów histologicznych .....	64
Rozdział VI. WNIOSKI.....	67
STRESZCZENIE.....	68
SUMMARY .....	71
PIŚMIENNICTWO .....	73
ZAŁĄCZNIK.....	83
SPIS TABEL.....	101
SPIS RYCIN .....	103

## Rozdział I. WSTĘP

### I.1. Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój technik mikroskopowych i informatycznych umożliwia w dzisiejszych czasach nie tylko rejestrację obrazów mikroskopowych wybranych w sposób subiektywny z preparatu histologicznego przy użyciu mikroskopów cyfrowych, ale całych preparatów histologicznych przy pomocy skanerów preparatów. Cyfrowy zapis zeskanowanego całego preparatu lub jego fragmentu istotnego diagnostycznie to preparat wirtualny, który zachowywany jest w komputerowej bazie obrazów morfologicznych. Ocena preparatu wirtualnego możliwa jest dzięki mikroskopii wirtualnej. Mikroskop wirtualny to system integrujący mikroskop optyczny oraz komputer z oprogramowaniem zapewniającym możliwość akwizycji cyfrowych obrazów wysokiej jakości i rozdzielczości całych preparatów histologicznych. Umożliwia on również składanie poszczególnych części obrazu w jednorodne kompozycje, przechowywanie danych w specjalistycznych bazach danych obrazowych i wyświetlanie próbek pobranych danych, czyli podobrazów, na lokalnym komputerze lub zdalnej stacji roboczej innego użytkownika w trybie *on line* lub *off line* bez konieczności fizycznego dostępu do preparatu. Wirtualny mikroskop dostarcza możliwości edukacyjne, gdzie grupa użytkowników może mieć indywidualny dostęp i manipulować tym samym materiałem tkankowym przygotowanym do oceny mikroskopowej w tym samym czasie, a także zdalne konsultacje w czasie rzeczywistym, gdzie lekarze nawet z różnych części świata widzą ten sam preparat przez Internet, przyjmując że został on zeskanowany i umieszczony w dostępnej bazie danych obrazowych (Hamilton i wsp., 2012).

Głównym problemem związanym z funkcjonalnością wirtualnych mikroskopów jest efektywność przeglądania obrazów o dużych rozmiarach z całych kolekcji obrazów. Przykładowo, używając cyfrowego mikroskopu pobieranie pojedynczego punktu (plamki) na preparacie daje na obrazie wielkość 1000x1000 pikseli, a do pobrania całego preparatu trzeba skanować wszystkie jego punkty. Na przykład, do pobrania obrazu próbki w powiększeniu 200x może być potrzebne wykonanie 50x70 tj. 3500 "skanów", co wymaga kilku gigabajtów danych. Stwarza to również duże trudności w ocenie ilościowej preparatów odnośnie ekspresji reakcji immuno- i histochemicznych,

czy zliczania struktur morfologicznych istotnych dla opisu morfologicznego tkanek prawidłowych bądź zmienionych. Czas obliczeń niezbędny od oceny morfometrycznej tak dużego obrazu jest zbyt długi na komputerach dużej mocy obliczeniowej, by był efektywny. Z tego powodu, przed rozpoczęciem analizy morfometrycznej należy dokonać wstępnego przygotowania wirtualnego preparatu cyfrowego w kilku etapach. Najpierw usunąć te fragmenty preparatu, które są bardzo złej jakości i nie powinny być przedmiotem oceny histopatologicznej, a następnie dokonać podziału preparatu na serie sąsiadujących ze sobą podobrazów wielkości standardowego cyfrowego obrazu mikroskopowego, z których wybierzemy losową próbę reprezentatywną dla badanego preparatu. Wybrane losowo podobrazy będą przedmiotem oceny morfometrycznej metodami cyfrowej analizy obrazów.

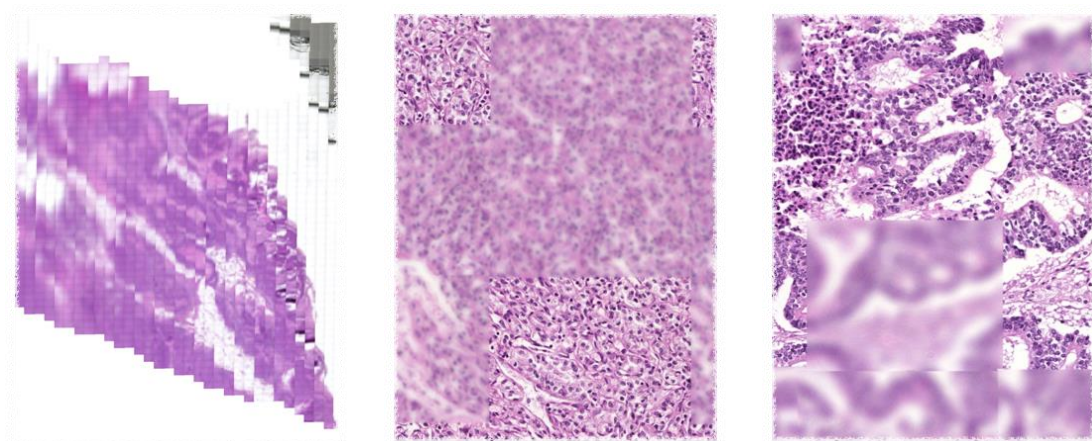
W niniejszej pracy postanowiłam zająć się metodyką próbkowania preparatów histologicznych przygotowanych metodą cyfrową, a także statystyczną oceną wpływu jakości akwizycji preparatów cyfrowych oraz metody próbkowania na wyniki morfometryczne.

## **I.2. Akwizycja cyfrowych obrazów mikroskopowych**

Rejestracja cyfrowych obrazów mikroskopowych stała się możliwa dzięki wprowadzeniu w wiązkę optyczną mikroskopu świetlnego kamery cyfrowej podłączonej do komputerowej karty archiwizacji obrazów. Obraz cyfrowy (mapa bitowa) reprezentowany jest przez macierz liczb, w której każdemu elementowi odpowiadającemu jednemu pikselowi obrazu przyporządkowane są współrzędne jego położenia w obrazie oraz barwa w określonej przestrzeni kolorów (np. RGB, HSI, odcieni szarości). Obecnie wykorzystuje się w mikroskopii kamery cyfrowe z matrycą CCD składającej się z elementów światłoczułych równomiernie rozmieszczonych na płycie. Liczba elementów światłoczułych wpływa na rozdzielczość rejestrowanego obrazu. Zwiększanie ich liczby jest jednak ograniczone zdolnością rozdzielczą mikroskopu, stąd bardzo istotną informacją jest rozdzielczość mierzona liczbą mikrometrów przypadających na 1 piksel obrazu (Gabril i wsp., 2010, Giansanti i wsp., 2010, Filipiak i wsp., 2011).

W praktyce histopatologicznej istnieje jednak potrzeba archiwizowania nie tylko wybranych fragmentów preparatu w postaci kilku lub kilkunastu obrazów cyfrowych,

ale całej jego powierzchni. W tym celu stworzono systemy mikroskopowe wyposażone nie tylko w kamerę, ale również w zmechanizowany stolik, którego ruch jest kontrolowany elektronicznie. Oprogramowanie sterujące takim systemem pozwala podzielić automatycznie powierzchnię całego preparatu na równe pola, najczęściej kwadraty lub prostokąty i utworzyć siatkę np. 10x10 obrazów, z których każdy jest rejestrowany z marginesem kilkunastu lub kilkudziesięciu pikseli. Zarejestrowane obrazy są następnie łączone (ang. *stitching*) przy zastosowaniu techniki nakładających się części (ang. *overlapping parts*) sąsiadujących obrazów (ryc.1). W rezultacie rejestrowania kolejnych obrazów wprowadzanych przez ruchomy stolik w wiązkę optyczną mikroskopu powstaje obraz całego preparatu histologicznego (ang. *whole slide image*), który jest archiwizowany na twardym dysku komputera.

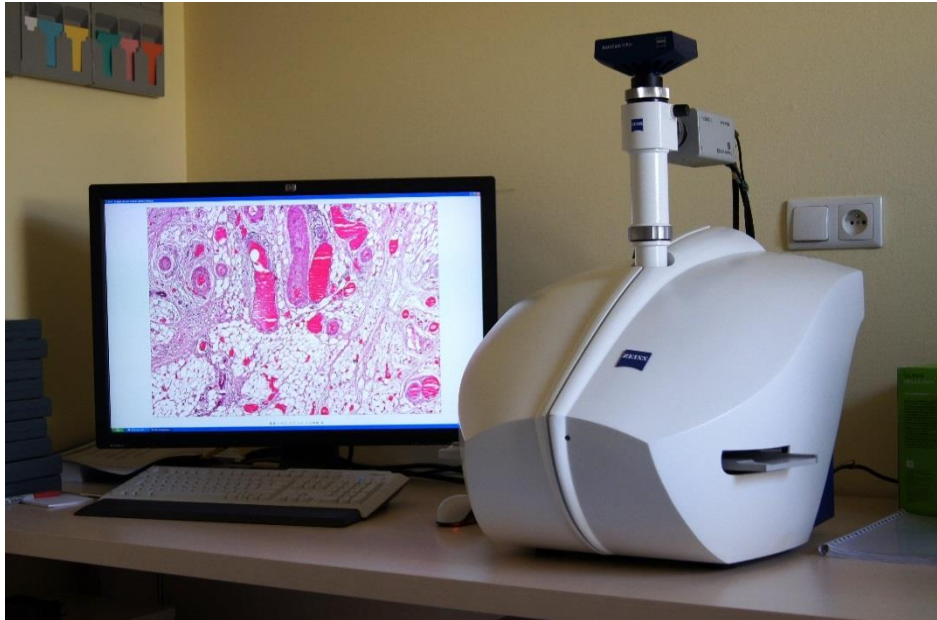


Ryc. 1. Fragment zeskanowanego preparatu histologicznego z widocznym podziałem na równe pola. Miejsca łączenia poszczególnych przyległych pól tego preparatu przy różnych powiększeniach przedstawiono na dwóch sąsiednich zdjęciach.

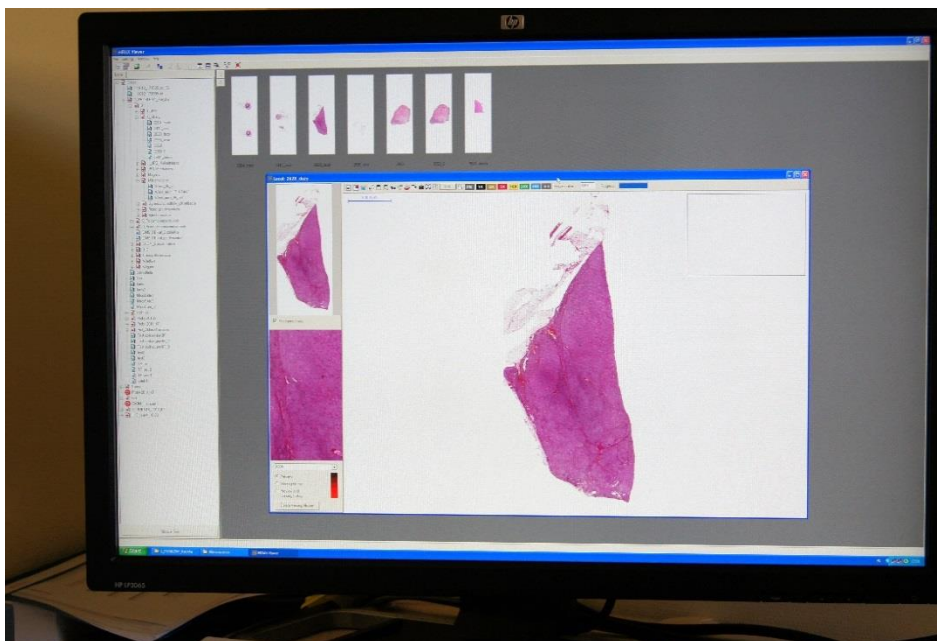
Rosnące oczekiwania użytkowników oraz rozwój technik optoelektronicznych przyczyniły się do stworzenia urządzeń łączących funkcję mikroskopu optycznego i kamery cyfrowej: skanerów preparatów histologicznych. Część mechaniczna skanera pobiera szkiełko podstawowe, na którym znajduje się preparat histologiczny z podajnika, który może pomieścić nawet kilkadziesiąt szkiełek i umieszcza je na ruchomym stoliku sterowanym elektronicznie (ryc.2). Rejestracja całego preparatu histologicznego wymaga konieczności odróżnienia go od tła. Jest to możliwe dzięki zainstalowanej w skanerze kamerze podglądowej, która szybko rejestruje obraz całego preparatu (ryc.3). Te części obrazu, których barwa i jasność zawierają się w



wyznaczonym przedziale odpowiadającym preparatowi zostają sklasyfikowane jako obiekt, a pozostałe jako tło.



Ryc.2. Skaner preparatów histologicznych Mirax-Midi (Carl Zeiss) wraz z podajnikiem, który umożliwia automatyczne skanowanie preparatów.



Ryc. 3. Okno dialogowe programu Mirax Viewer (Carl Zeiss) prezentujące miniatury zeskanowanych preparatów oraz panoramę wybranego do analizy preparatu.

Możliwość wizualnej kontroli dzięki kamerze podglądowej pozwala na ocenę poprawności zdefiniowania przedziału barwy i jasności preparatu. Następnie za pomocą kamery o znacznie wyższej rozdzielczości i obiektywie powiększającym 20x lub 40x urządzenie skanuje wybrany uprzednio preparat. Skaner posiada funkcję autofocus pozwalającą na automatyczne ustawienie ostrości obrazu, dzięki czemu uzyskujemy bardzo dobrą czytelność całego preparatu. Zeskanowany obraz zostaje zachowany na twardym dysku komputera sterującego pracą skanera lub na dysku zewnętrznym.

### **I.3. Mikroskop wirtualny**

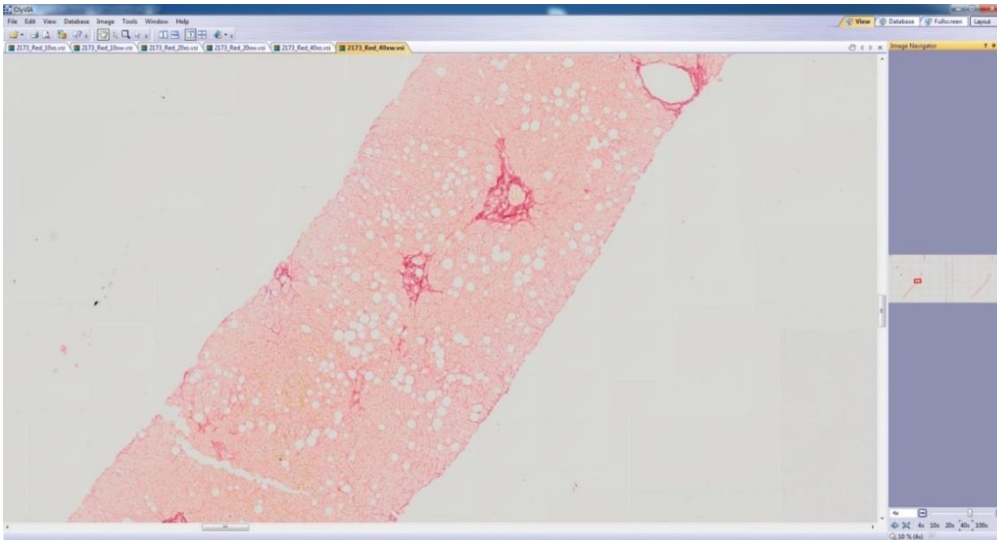
Mikroskop wirtualny to komputerowa emulacja mikroskopu świetlnego, a cały proces akwizycji, archiwizacji obrazów cyfrowych oraz oglądanie preparatów wirtualnych przez obserwatora (morfologa, telepatologa bądź innego specjalistę, a także studenta) to mikroskopia wirtualna (Coleman, 2009). Dostępne obecnie skanery preparatów lub systemy do mikroskopii wirtualnej, np. Aperio ScanScope, Carl Zeiss MiraxScan, Hamamatsu C9600 Nano Zoomer Digital Pathology (<http://www.aperio.com>, <http://www.zeiss.de/mirax>, <http://jp.hamamatsu.com/products>) wyróżniają się: możliwością skanowania wielu preparatów umieszczonych na szkiełkach podstawowych, doskonałą jakością obrazów cyfrowych i programami do ilościowej analizy obrazów (morfometrii, ilościowej immunohistochemii czy immunofluorescencji).

Cyfrowy zapis zeskanowanego preparatu zapisany w komputerowej bazie danych może być przeglądany i analizowany w dowolnie wybranym fragmencie skrawka, w szerokim zakresie powiększeń, bezpośrednio na monitorze komputerowym, bez konieczności używania mikroskopu (Feit i wsp., 2008, Rocha i wsp., 2009, Paulsen i wsp., 2010). Jest to możliwe dzięki internetowym przeglądarkom preparatów wirtualnych, np. Olympus web viewer, Aurora, Aperio. Możliwości i zalety tych trzech wymienionych przeglądarek są zróżnicowane, stąd ich wybór zależy od potrzeb i oczekiwań morfologów (Rojo i wsp., 2008). Analiza wybranego fragmentu obrazu przebiega przy dowolnym powiększeniu od 0,2x do 40x, które nie musi pokrywać się ze standardowymi powiększeniami obiektywów mikroskopowych (np. 5x, 10x, 20x, 40x). Specjalistyczne oprogramowanie, np.

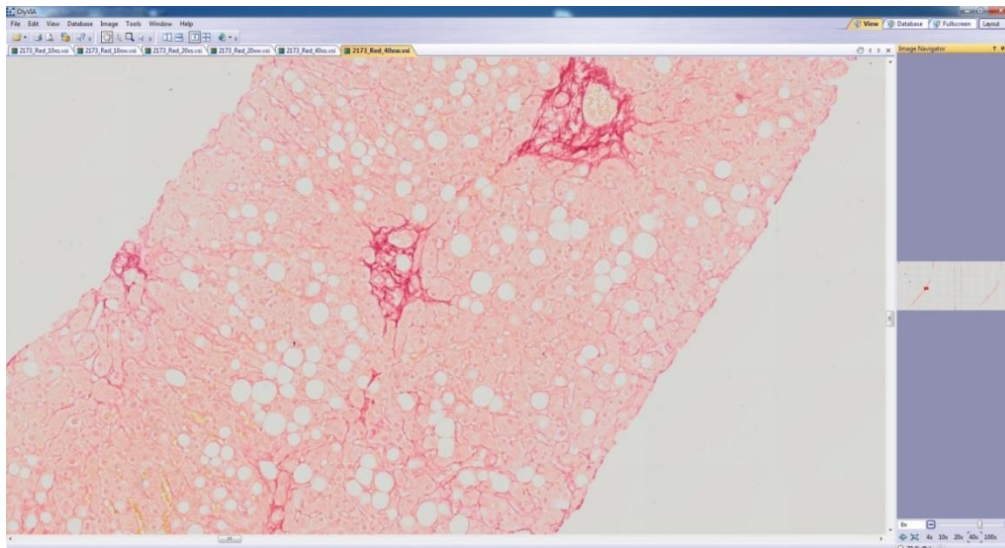
- OlyVia (<http://olyvia.software>),
- Panoramic Viewer ([http://www.3dhistech.com/panoramic\\_viewer](http://www.3dhistech.com/panoramic_viewer))
- Mirax Viewer (<http://mirax-viewer.software>)
- eSlideViewer (<http://www.aperio.com/lifescience/eslide/view>)
- NanoZoom Digital Pathology viewing software (<http://www.hamamatsu.com/jp/en/product/category/5002/5007/index.html>)

umożliwia obserwację panoramiczną całego preparatu, jak również szczegółową analizę wybranego fragmentu przy większym powiększeniu (ryc. 4 - 6).

**A**

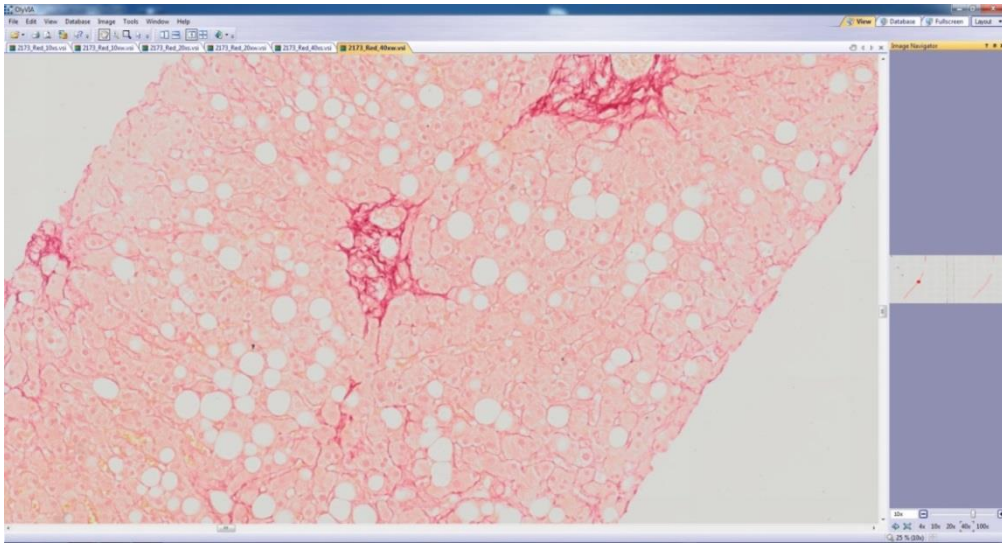


**B**

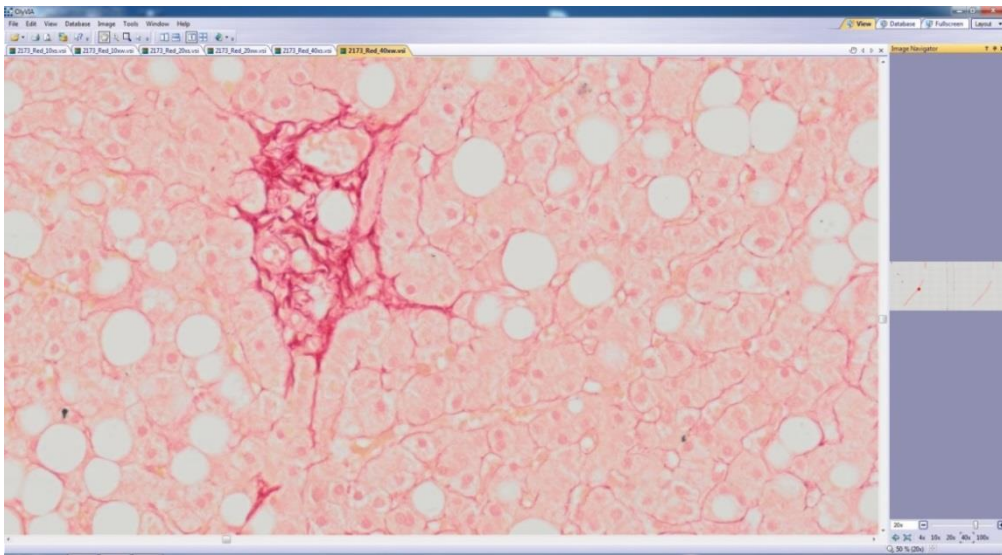


Ryc.4. Analiza wybranego fragmentu cyfrowego preparatu w programie OlyVia (Olympus) przy powiększeniach: (A) 4x i (B) 8x.

**A**

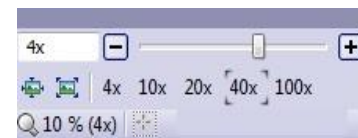
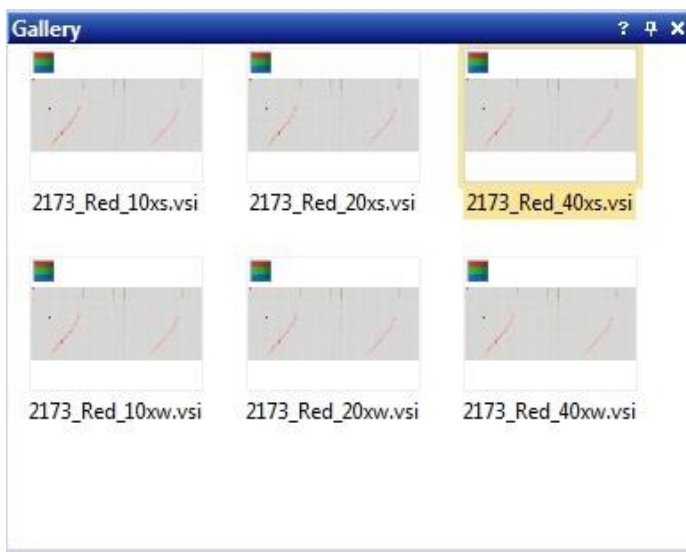
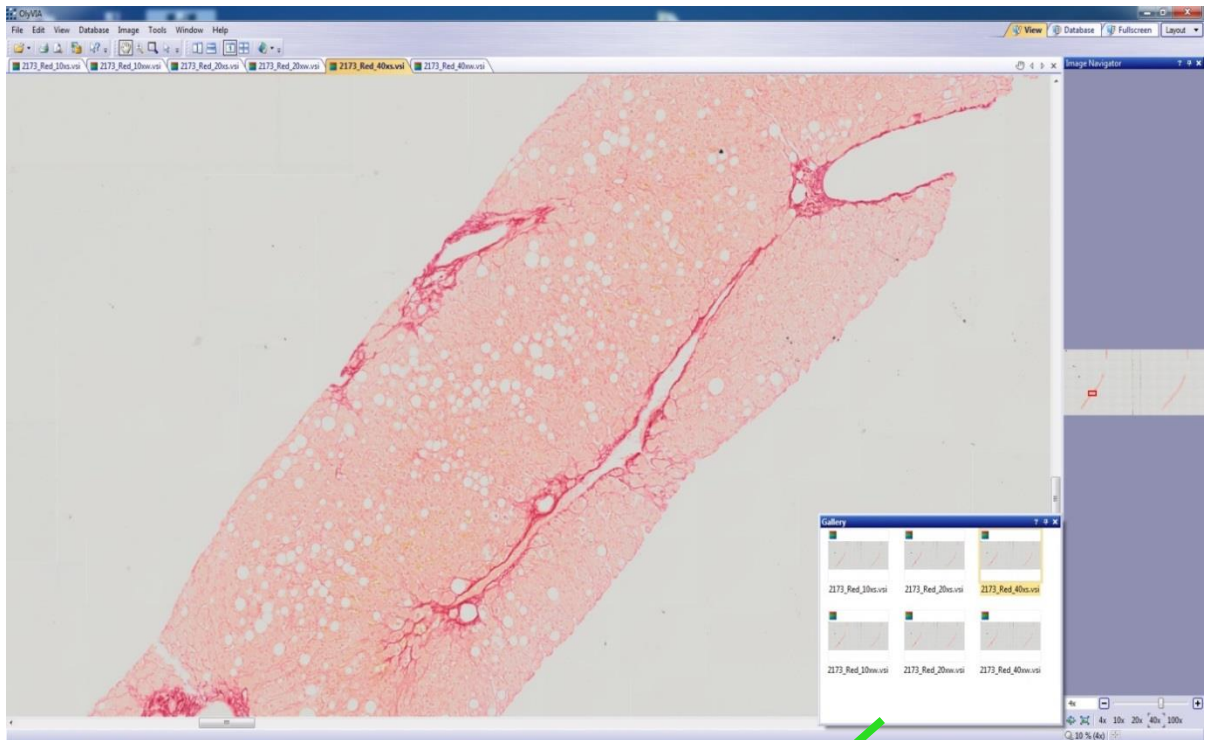


**B**



Ryc.5. Analiza wybranego fragmentu cyfrowego preparatu w programie OlyVia (Olympus) przy powiększeniach: (A) 10x i (B) 20x.





Ryc.6. Okno dialogowe w programie OlyVia (Olympus). W prawej części okna widoczna jest miniatura badanego preparatu, a czerwony prostokąt wskazuje wybrany fragment, który przy dowolnym powiększeniu (oznaczone strzałką) jest prezentowany w oknie głównym programu. Okno galerii (oznaczone strzałką) prezentuje miniaturki ikon analizowanych wirtualnych preparatów.

## I.4. Mikroskopia wirtualna w edukacji i telemedycynie

Mikroskopia wirtualna znalazła swoje zastosowanie w edukacji, telediagnostyce oraz telekonsultacjach, które mogą być prowadzone zarówno w czasie rzeczywistym, jak i w trybie *off line*. Integralną częścią rozwijającej się dynamicznie światowej telemedycyny stała się telepatologia. Rozwój technologii informatycznych i telekomunikacyjnych oraz integracji mikroskopii wirtualnej z informatycznymi systemami szpitalnymi stwarzają znacznie lepsze warunki współpracy patologa z klinicystami w codziennej praktyce (Marchevsky i wsp., 2006). Telepatologia to diagnostyka histopatologiczna na odległość, wykorzystująca technologie telekomunikacyjne do przesyłania obrazów patomorfologicznych między odległymi placówkami (Hitchcock, 2011). Jej zalety to:

- możliwość konsultacji i dyskusji na odległość między specjalistami klinicznymi,
- zdalna kontrola jakości (w relacji patolog i laboratorium referencyjne),
- edukacja,
- badania i współpraca naukowa.

Z uwagi na to, że budowa tkanek jest w szczególności podstawą nauczania histologii, czy patomorfologii, preparaty wirtualne wykorzystywane są w wielu ośrodkach naukowo-dydaktycznych do nauczania tych dyscyplin medycznych realizując również nauczanie przez Internet (*e-learning*). Taka metoda kształcenia jest odbierana jako narzędzie dydaktyczne poprawiające jakość kształcenia nie tylko przez nauczycieli tych przedmiotów, ale również przez studentów (Goldberg i wsp., 2007, Fónyad 2010, Merk i wsp., 2010). Wirtualne preparaty histologiczne dostępne w Internecie umożliwiają naukę poza laboratorium w czasie dogodnym dla studenta. Ponadto, wirtualna mikroskopia zapewnia łatwiejszy dostęp do preparatów “unikatowych” dokumentujących wyjątkowe przypadki zmian patomorfologicznych (Dee, 2009).

W Internecie dostępnych jest już wiele zasobów wirtualnych preparatów histologicznych, np. [www.path.uiowa.edu/virtualslidebox](http://www.path.uiowa.edu/virtualslidebox) (The University of Iowa City), [www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/virtualhistology.htm](http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/virtualhistology.htm) (Loyola University of Chicago), [http://www.webmicroscope.net/atlases/breast/brcatlas\\_start.asp](http://www.webmicroscope.net/atlases/breast/brcatlas_start.asp) (Digital Atlas of Breast Histopathology), [www.caom.pl](http://www.caom.pl) (Centrum Obrazów Morfologicznych w Katedrze Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu).

Wymiana opinii może odbywać się w obrębie jednej instytucji lub pomiędzy różnymi ośrodkami (wirtualne instytuty). W ten sposób udostępnianie wyników własnych obserwacji zawierających wysokiej jakości obrazy staje się efektywnym narzędziem upowszechniania wyników badań naukowych oraz prowadzenie merytorycznej dyskusji nad kierunkami dalszych etapów badań (Dee, 2006, Lundin, 2009, Nielsen i wsp., 2010).

## **I.5. Próbkowanie cyfrowych preparatów histologicznych**

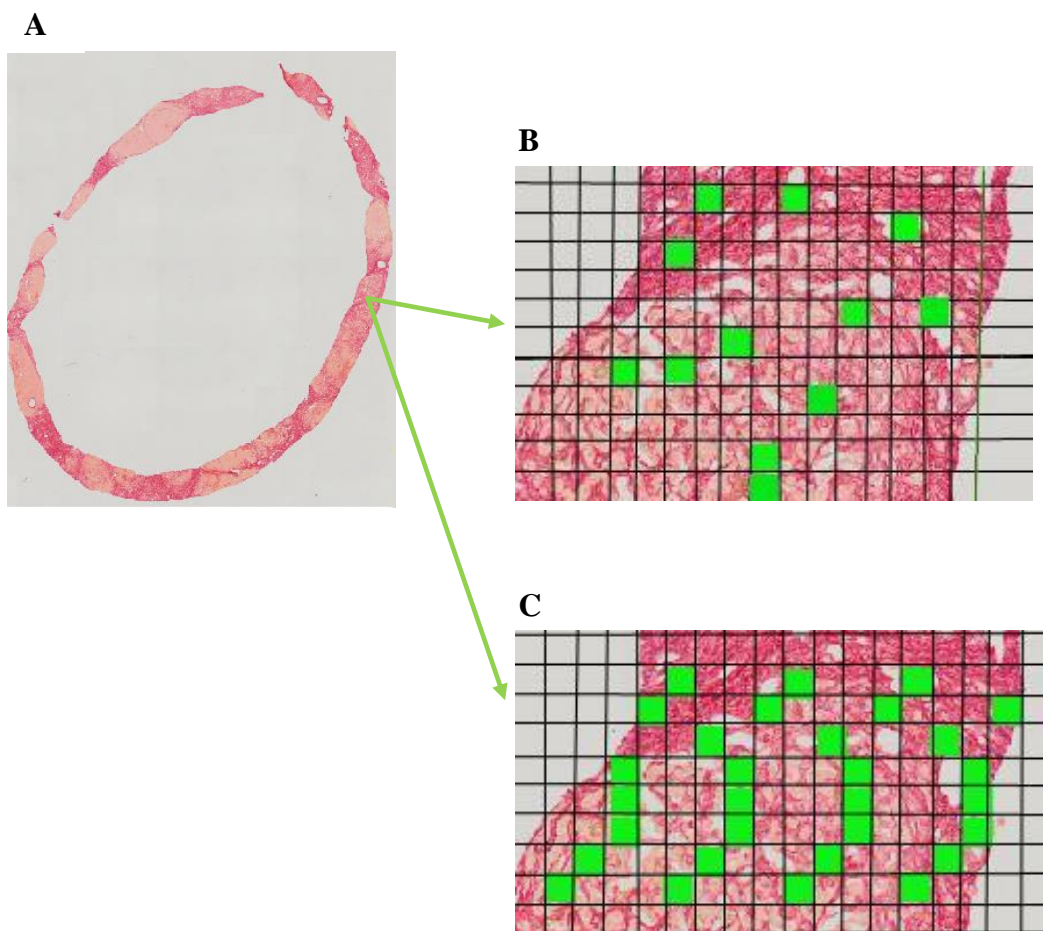
Ocena morfometryczna całego preparatu jest bardzo czasochłonna, a jeden preparat często nie wystarcza do postawienia diagnozy choroby, stąd szczególnie w razie konieczności oceny kilku preparatów z biopsji chorego warto dokonać ich próbkowania. Przyjmijmy, że każdy dobrej jakości preparat z jednego bioptatu jest próbką histologiczną, z której wybierzemy losowo podobrazy o rozmiarach standardowego zdjęcia mikroskopowego (pola widzenia). Zbiór wybranych podobrazów powinien stanowić reprezentatywną próbę badanego preparatu. Celowe włączanie lub usuwanie pewnych fragmentów obrazu (celowy wybór podobrazów) zwiększa w znaczący sposób obciążenie statystyczne wyników analizy.

Przyjmując, że próbą reprezentatywną analizowanego preparatu jest zbiór wybranych losowo jego podobrazów, możemy ocenić na przykład liczbę komórek, jąder komórkowych, w których określono zmiany morfologiczne bądź obszar ekspresji reakcji histo- i/lub immunohistochemicznej.

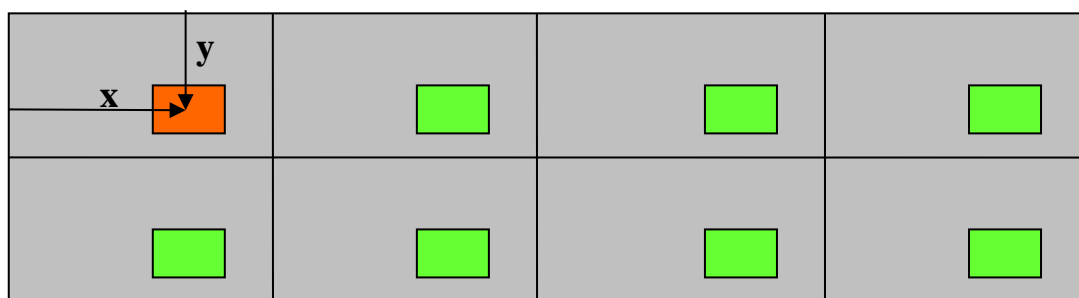
Preferowanym sposobem przygotowania próby reprezentatywnej preparatu histologicznego jest podział całego preparatu na kwadraty lub jednakowej wielkości prostokąty tworząc w ten sposób siatkę przylegających do siebie ponumerowanych kolejno podobrazów, które mogą być wybierane do analizy morfometrycznej metodą losowania prostego lub losowania systematycznego (ryc.7).

Losowanie proste polega na wyborze podobrazów o numerze wskazanym przez generator liczb losowych z przedziału liczb od 1 do  $n$ , gdzie  $n$  oznacza liczbę kwadratów (prostokątów) siatki.

Losowanie systematyczne polega na wyborze co  $k$ -tego kwadratu (prostokąta) siatki (ryc.8).



Ryc.7. Próbkowanie preparatów histopatologicznych, materiał z biopsji wątroby wybarwiony czerwienią Syriusza (A). Próbkowanie preparatu wirtualnego w powiększeniu: losowe proste (B), losowe systematyczne (C).



Ryc.8. Systematyczne próbkowanie losowe podobrazów preparatu. Najpierw losujemy lokalizację pierwszego podobrazu. Następne podobrazy są wybierane systematycznie (każdy k-ty podobraz) (Russo, 2007).



## I.6. Szacowanie liczby podobrazów w ilościowych badaniach morfologicznych

W badaniach ilościowych istotne jest określenie niezbędnej wielkości próby. Im większa próba, tym bardziej dokładne oszacowanie, jednak wzrost wielkości próby wiąże się także ze wzrostem kosztów i czasochłonności badań. Chcąc tego uniknąć, zmiernym jest do wyznaczenia minimalnej liczby podobrazów, która umożliwi nam ocenę badanego materiału histologicznego na określonym poziomie ufności. Obliczając wielkość próby musimy określić charakterystykę interesującej nas cechy. W ocenie rozległości zmian na podstawie powierzchni reakcji histochemicznej, czy udziału procentowego tej reakcji w analizowanym preparacie (zmienna ciągła w ujęciu statystycznym) możemy wyznaczyć średni procent reakcji jako parametr ją opisujący. Zakładamy 95% pewności, że prawdziwy średni procent reakcji histochemicznej mieści się w ramach określonego przedziału wokół wartości średniej oszacowanej na podstawie naszej próby. Przy szacowaniu wielkości próby, należy uwzględnić zmienność tej cechy w populacji generalnej. Zakładając, że rozkład zmiennej w próbie jest w przybliżeniu normalny, możemy obliczyć wielkość próby na podstawie poniższego wzoru (Gang, 1999):

$$n = \frac{Z^2 S^2}{d^2}$$

gdzie:

n to wielkość próby;

Z to statystyka z rozkładu normalnego dla wybranego poziomu ufności;

S to odchylenie standardowe w populacji (np. wyniku morfometrycznego w materiale histologicznym);

d to połowa szerokości przedziału, który jest ustalany przez badacza jako miara dokładności oszacowań z próby.

Często nie znamy wartości odchylenia standardowego w populacji. Możemy jednak w przyjąć wartość tego parametru na podstawie piśmiennictwa lub próbować ustalić na podstawie własnego doświadczenia badawczego.

W przypadku zliczania struktur (zmienna dychotomiczna w ujęciu statystycznym) interesującą nas zmienną jest np. proporcja wybarwionych jąder komórkowych do wszystkich jąder określonego typu komórek. Na podstawie badania pilotażowego można oszacować przewidywaną wartość tej proporcji. Wówczas liczebność wielkości próby obliczamy na podstawie poniższego wzoru (Gang, 1999):

$$n = \frac{Z(p(1-p))}{d^2}$$

gdzie:

n to wielkość próby;

Z to statystyka z rozkładu normalnego dla wybranego poziomu ufności;

p to oszacowanie oczekiwanej proporcji interesującej nas zmiennej w populacji (np. jąder komórkowych z immunopozytywną reakcją w populacji określonych komórek);

d to połowa szerokości pożądanego przedziału który jest ustalany przez badacza jako miara dokładności oszacowań z próby.

W badaniach opartych na parametrach statystyki opisowej, sposób obliczania wielkości próby zależy głównie od tego, czy interesującym nas parametrem jest średnia czy proporcja. Jeśli jest to średnia, należy oszacować odchylenie standardowe w populacji, podczas gdy pozostałe wartości we wzorze są ustalone, natomiast jeśli interesującym nas parametrem jest proporcja, należy podać oszacowanie oczekiwanej proporcji w populacji. W niektórych badaniach podejście do tego oszacowania polega na założeniu, że proporcja wynosi 50%, co oznacza, że szacuje się wielkość próby dla najgorszego scenariusza, gdy nie potrafimy przewidzieć wartości tej proporcji.

W przypadku badań, które wymagają wnioskowania statystycznego, obliczanie wielkości próby może się opierać na określonym teście statystycznym.

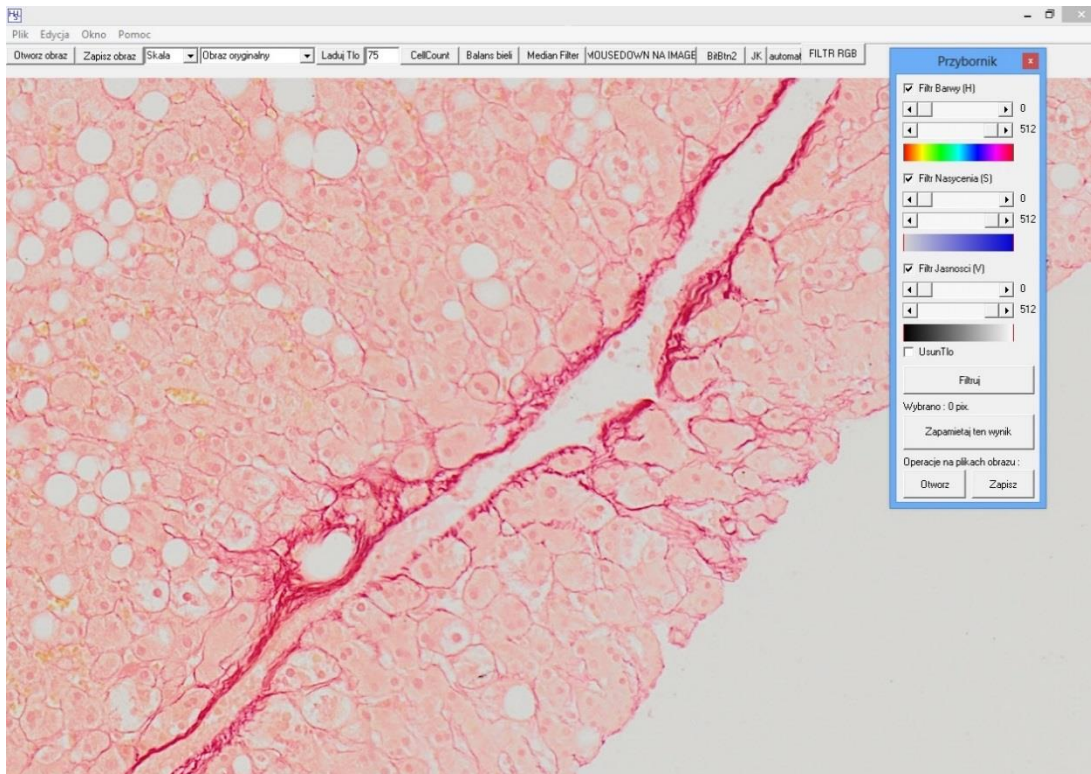
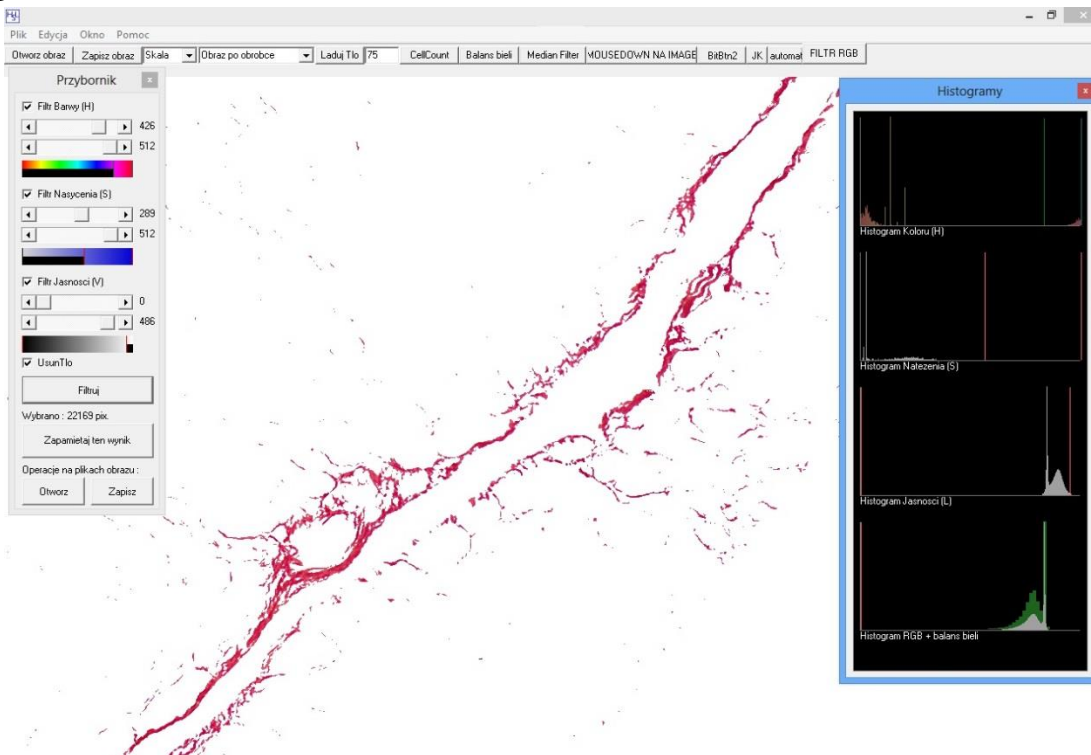
## **I.7. Rozpoznawanie struktur morfologicznych w preparatach cyfrowych**

Rozpoznawanie struktur morfologicznych na obrazach cyfrowych polega na wyodrębnieniu tych elementów, które spełniają kryteria definiujące te struktury w terminologii cyfrowej analizy obrazów. Podstawowym kryterium jest zakres odcieni

kolorów charakterystycznych dla określonych struktur, natomiast czynnością umożliwiającą wyodrębnienie tych struktur z analizowanych obrazów jest segmentacja obrazu. Polega ona na podziale obrazu na fragmenty odpowiadające poszczególnym obiektom widocznym na obrazie, w tym poszukiwanym strukturom morfologicznym. Towarzyszy temu indeksacja obiektów (ang. *labelling*), czyli przypisanie identyfikatorów (etykiet) do wszystkich pikseli tych obiektów, wskazujących do którego obiektu można przypisać poszczególne piksele obrazu. Segmentacja umożliwia więc wydzielenie obszarów spełniających pewne kryteria jednorodności, np. kolor obszaru, poziom jasności i wyodrębnienie ich od tła, na którym występują. Jedną z najczęściej stosowanych metod segmentacji dla obrazów zawierających obiekty o stosunkowo jednorodnych powierzchniach na kontrastowym tle jest progowanie. Dla obrazu tworzone są histogramy związane z odcieniami, nasyceniem, jasnością barw bądź innymi parametrami. Na podstawie histogramu dokonuje się wyboru wartości progowej parametru. Wartość wybranego parametru elementu obrazu (np. jasności piksela) porównywana jest z wartością progową, po czym element jest przydzielony do jednej z dwóch kategorii: o przekroczonej wartości progowej (piksele tła obiektu) lub nieprzekroczonej (piksele obiektu). Po operacji progowania otrzymuje się obraz binarny:

$$I(x, y) = \begin{cases} 1, & I(x, y) \leq T \\ 0, & I(x, y) > T \end{cases}$$

W przypadku, gdy histogram jest wielogarbny, a jego wierzchołki, pomiędzy którymi należy rozpoznać obiekty, są trudne do wyróżnienia, przy automatycznym stosowaniu operacji progowania bardzo łatwo można doprowadzić do pojawienia się niewielkich rozmiarów „fałszywych” struktur. Ich generowanie można ograniczyć określając obszar „jednolity” otaczający „prawdziwe” struktury poprzez kolejne dołączanie pikseli spełniających warunek progowania i znajdujących się w sąsiedztwie pikseli należących już do tego obszaru. Z tych powodów progowanie jest odpowiednią metodą segmentacji struktur o dość jednorodnych powierzchniach widocznych na kontrastowym tle. Stosowanie progowania do segmentacji obrazów kolorowych jest również możliwe (Castleman i wsp., 1998, Calvaruso i wsp., 2009, Amin i Mahmud- Ghoneim, 2011) należy jednak dokonać tej operacji osobno dla każdego z kanałów przestrzeni barw (ryc.9).

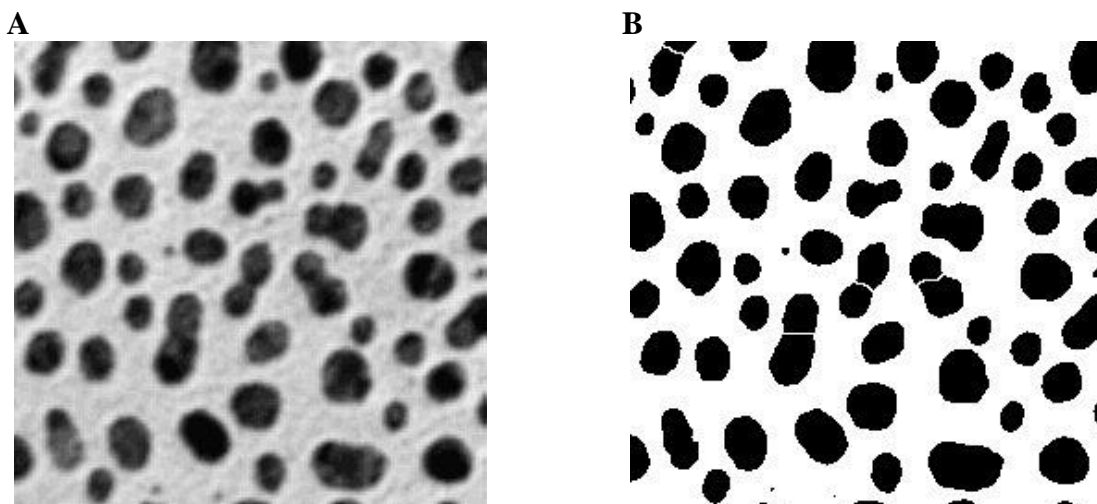
**A****B**

Ryc.9. Segmentacja obrazów kolorowych w programie autorskim *Filtr HSV* na przykładzie preparatów wątroby wybarwionych czerwienią Syriusza, (A) obraz oryginalny, (B) obraz po segmentacji i jego histogramy.

Progowanie nie zapewnia nam jednak rozpoznania nakładających się struktur jako oddzielnych obiektów, będą one rozpoznane jako jeden większy obiekt, co jest oczywiście błędne i ma ogromne znaczenie przy automatycznym zliczaniu wybranych struktur. Rozdzielenie nakładających się struktur możliwe jest między innymi dzięki zastosowaniu segmentacji metodą działów wodnych.

## **I.8. Segmentacja metodą działów wodnych**

Patrząc na obraz jak na mapę terenu, na której poszukujemy granic między obszarami zlewkisk różnych zbiorników wodnych, w przypadku obrazu poszukujemy obszary o małej intensywności koloru (tzw. lokalne minima intensywności barw), które wyznaczają tzw. „działy wodne” oddzielające różne obszary. Aby uzyskać jak najlepszy wynik, zwiększa się kontrast obrazu w taki sposób, aby zmniejszyć ilość minimów lokalnych. Często stosowaną techniką zwiększenia kontrastu jest filtrowanie obrazu przy pomocy transformat „top-hat” i „bottom-hat”. Wynikiem zastosowania transformaty „top-hat” jest różnica pomiędzy obrazem oryginalnym, a obrazem powstałym po zastosowaniu operacji morfologii matematycznej: otwarcia obrazu, natomiast wynikiem transformaty „bottom-hat” jest różnica pomiędzy wynikiem zamknięcia obrazu (działanie morfologii matematycznej) a obrazem oryginalnym (Coster i Chermant, 1989, Serra i Soille 1994, Shih, 2009, Toennies, 2012). Do obrazu oryginalnego dodaje się obraz wynikowy transformaty „top-hat”, następnie odejmuje obraz wynikowy transformaty „bottom-hat” i tworzy jego negatyw, na którym poszukujemy minima lokalne o zadanej przez użytkownika intensywności koloru. Po usunięciu niepotrzebnych szumów z obrazu otrzymujemy działy wodne, które pozwalają dokonać rozdzielenia nakładających się na siebie obiektów (ryc.10). Prawidłowe przeprowadzenie segmentacji metodą działów wodnych zależy od umiejętności poszukiwania minimów lokalnych obrazu.



Ryc.10. Segmentacja metodą działów wodnych w programie ImageJ: (A) obrazy oryginalny (źródło: <http://rsb.info.nih.gov/ij>), (B) obraz po segmentacji. Źródło: <http://rsb.info.nih.gov/ij>

Przedstawione wyżej metody rozpoznawania struktur zostały wykorzystane w niniejszej pracy do analizy morfometrycznej barwienia histochemicznego bioptatów wątroby oraz automatycznego zliczania struktur z dodatnią ekspresją reakcji immunohistochemicznej.

### **I.9. Wybrane metody diagnostyki włóknienia wątroby**

Włóknienie wiąże się ze stałym, nadmiernym odkładaniem się składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zmian proporcji jej elementów, prowadzącym do przerostu, twardnienia i bliznowacenia tkanek. Do czynników, które mogą wywoływać włóknienie należą m.in. przewlekłe infekcje wirusowe, bakteryjne, grzybicze, pasożytnicze, a także reakcje autoimmunologiczne, substancje toksyczne i promieniotwórcze (Guarino i wsp., 2009). Badając dynamikę procesów zachodzących w trakcie nadmiernego odkładania się macierzy zewnątrzkomórkowej oraz aktywność miofibroblastów pod postacią syntezy kolagenu, podjęto próby odnalezienia markerów charakterystycznych dla tych procesów. Wykazano między innymi, że aminokońcowy peptyd prokolagenu III (PIIINP) oraz kolagen typu IV będące produktami ubocznymi procesu tworzenia kolagenu, a także metaloproteinaza-2 (MMP2), tkankowy inhibitor metaloproteinazy-1 (TIMP1) należą do enzymów biorących bezpośredni udział w pro-

cesie przebudowy tkanki łącznej (Aita i Harrison, 2008, Bataller i Brenner, 2005). Boeker i wsp. (2002) wykazali przydatność TIMP1 i MMP2 do wykrywania marskości wątroby, natomiast w diagnostyce włóknienia jedynie TIMP1 okazał się przydatny.

Złotym standardem w diagnostyce włóknienia wątroby jest badanie histopatologiczne wycinka biopsji wątroby. Zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Hepatologów dotyczącego oceny histopatologicznej biopsji wątroby w ocenie przewlekłych zapaleń tego narządu zaleca się wykonanie następujących barwień histopatologicznych: hematoksylina-eozyna (H+E) oraz jedno z barwień umożliwiających określenie zasięgu fibroplazji kolagenowej: azan, siateczka wg Gomoriego, trichrom Massona, chromotrop (Gabriel, 2012). Obecność i rozległość włóknienia śródmiąższowego obrazuje się również metodą van Giesona oraz barwieniem czerwienią Syriusza. Zasady klasyfikacji przewlekłych zapaleń wątroby oraz stopień zaawansowania choroby z uwzględnieniem progresji włóknienia śródmiąższu przedstawiono m.in. w pracach Walewskiej-Zieleckiej (2000) oraz Gabriela i wsp. (2009). Czerwień Syriusza wybarwia włókna kolagenowe tkanki łącznej w kolorze czerwonym nie ujawniając włókien sprężystych, a pozostałe tkanki zabarwione są kolorem żółtym. Ocena rozległości włóknienia śródmiąższu wątroby u pacjentów z wirusowym zapaleniem wątroby typu C oraz alkoholowym uszkodzeniem wątroby na podstawie preparatów barwionych H+E i czerwienią Syriusza jest aplikacją niniejszej pracy doktorskiej.

Podjęto też próby wykorzystania technik radiologicznego obrazowania jako wspomagających monitorowanie procesu włóknienia. Istotne zmiany w unaczynieniu pojawiają się w zaawansowanym stadium choroby wątroby, stąd przy niewielkim nasileniu włóknienia nie wykazano przydatności tomografii komputerowej z możliwością oceny naczyń krwionośnych oraz rezonansu magnetycznego.

Badania USG wspomagają ocenę zaawansowania włóknienia pośrednio poprzez ocenę wielkości, echogeniczności, a także mierzenie przepływu przez naczynia wątrobowe.

W szczególności, istotne znaczenie w diagnostyce włóknienia ma elastometria USG (Kato i wsp., 2008, Frulio i Trillaud, 2013, Sporea i wsp., 2013). Zaletą badania jest jego prostota i szybkość wykonania (całość trwa około 5 minut). Głowica użyta do badania wytwarza ultradźwięki o małej częstotliwości i średniej amplitudzie. Takie fale przechodząc przez tkankę powodują powstawanie fal wtórnych, szybkość rozchodzenia się tych fal jest wprost proporcjonalna do sztywności tkanki, w której pojawiają się. Zmieniona w przebiegu choroby tkanka ma mniejszą elastyczność niż tkanka zdrowa

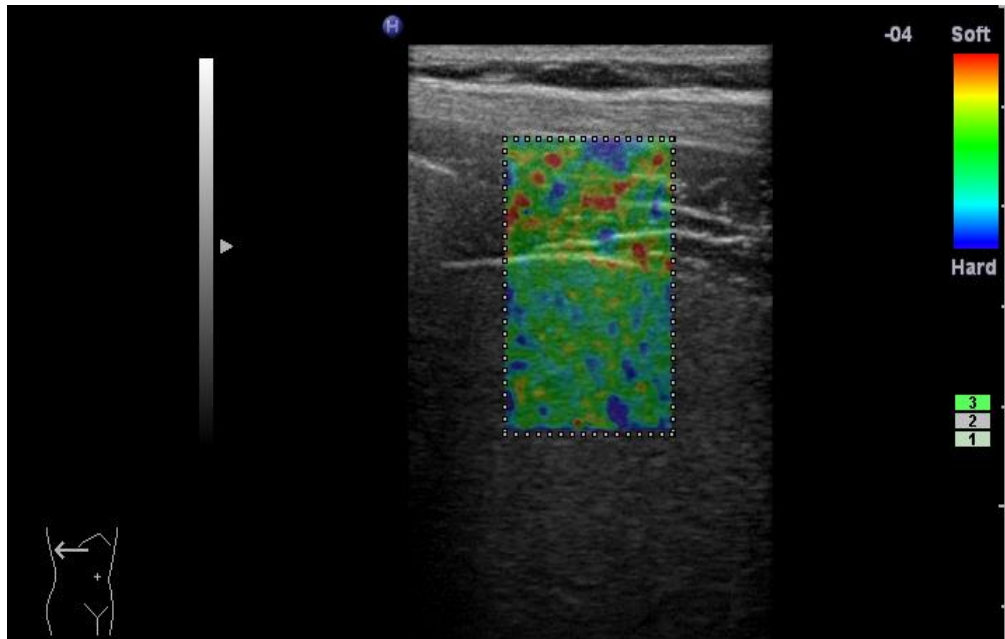


(jest bardziej twarda) i pod wpływem zewnętrznego ucisku ulega ona mniejszym odkształceniom niż tkanka zdrowa. W praktyce stosowane są różne techniki do uzyskania odkształcenia w badanej tkance. Dzięki temu można wyróżnić sonoelastografię impulsową, fali poprzecznej, czy też dynamiczną w czasie rzeczywistym. Taka różnorodność technik sonoelastograficznych sprawia, że są one coraz częściej wykorzystywane w diagnostyce chorób przewodu pokarmowego (Dryla i wsp., 2009, Gierbliński, 2007). Do oceny włóknienia wątroby wykorzystuje się sonoelastografię impulsową (ang. *transient elastography*) i dynamiczną w czasie rzeczywistym. W sonoelastografii dynamicznej w czasie rzeczywistym (ang. *real-time elastography*), konwencjonalny aparat ultrasonograficzny jest rozbudowany o dodatkowy moduł sonoelastograficzny. Badanie polega na kontrolowanych naciskach głowicą na wątrobę, pod wpływem których dochodzi do odkształcenia tkanki. Każde powstałe odkształcenie jest rejestrowane i przetwarzane przez specjalistyczne oprogramowanie aparatu, a następnie przedstawiane w postaci kolorowych map, tzw. elastogramów (ryc.11). Wraz z rejestracją obrazów elastograficznych wykonywane jest standardowe badanie usg z obrazem B-mode wątroby. Na elastogramie oznaczone są tkanki o różnym stopniu elastyczności w trzech podstawowych kolorach: czerwony, niebieski i zielony. Kolorem zielonym oznaczone są zdrowe obszary tkanki, które są elastyczne i miękkie, natomiast obszary objęte zaawansowanym procesem włóknienia są w kolorze niebieskim. Wszystkie inne pośrednie kolory występujące na cyfrowym obrazie odpowiadają fragmentom tkanki o obniżonej elastyczności w stosunku do tkanki prawidłowej. Powstały obraz elastograficzny jest zapisywany w pamięci aparatu lub na dysku zewnętrznym, a po zakończeniu badania może być ponownie przeglądany i analizowany przez użytkownika nawet bez konieczności użycia aparatury sonoelastograficznej. Korzystając wtedy ze specjalistycznego oprogramowania do analizy obrazów medycznych możliwa jest dokładna ilościowa ocena elastogramu (Ziol i wsp., 2005, Ganne-Carrie i wsp., 2006).

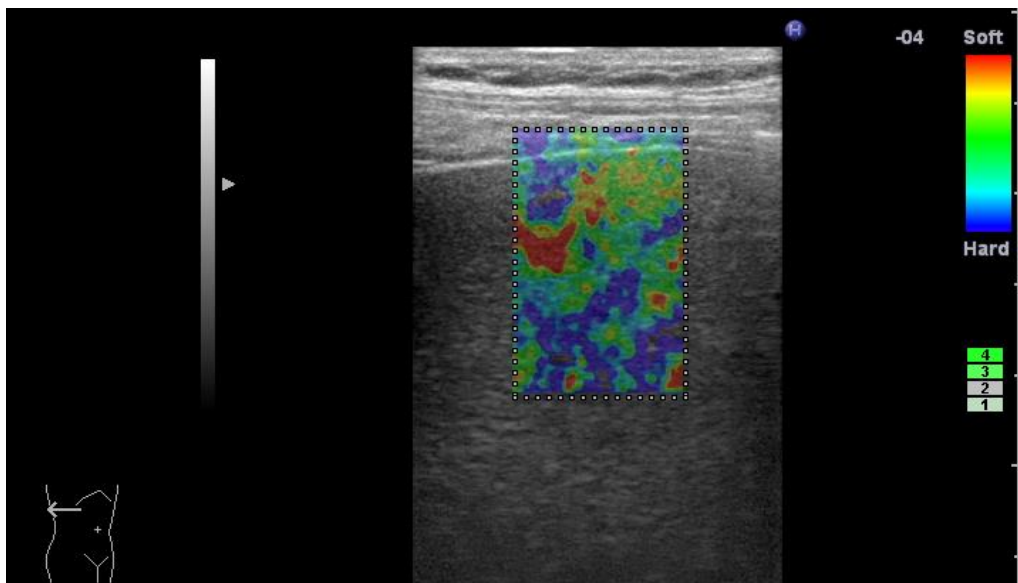
W niniejszej pracy porównano wyniki sonoelastografii czasu rzeczywistego jako metody obrazowej do wyników ilościowej oceny preparatów wątroby barwionych H+E oraz czerwienią Syriusza wybranej grupy pacjentów z alkoholowym uszkodzeniem wątroby (Chmielewski i wsp., 2009).



A



B



Ryc.11. Elastogram wątroby w czasie rzeczywistym, kodowany kolorem: (A) prawidłowy elastogram z przewagą tkanki miękkiej (kolor zielony), (B) elastogram z cechami włóknienia, przewaga tkanki twardej (kolor niebieski).

## Rozdział II. CELE PRACY

### II.1. Cele pracy

Celem głównym pracy jest weryfikacja hipotezy badawczej, że wyniki morfometryczne zależą od powiększenia i rozdzielczości skanowania preparatów oraz schematu próbkowania preparatu cyfrowego niezależnie od użytego oprogramowania do analizy obrazów.

Cele szczegółowe pracy obejmują:

1. ustalenie optymalnej metodyki skanowania preparatów histologicznych;
2. statystyczna ocena wpływu metody próbkowania cyfrowych preparatów, powiększenia i rozdzielczości skanów na wyniki pomiaru morfometrycznego uzyskane przy zastosowaniu dwóch różnych metod komputerowego rozpoznania reakcji histo- i immunohistochemicznej;
3. **Aplikacja:** ocena ilościowa reakcji histochemicznej na przykładzie analizy skanów preparatów barwionych czerwienią Syriusza w ocenie włóknienia śródmiąższu wątroby:
  - przy różnych powiększeniach skanera (10x, 20x, 40x);
  - przy różnych rozdzielczościach skanera (średnia, wysoka).
4. **Aplikacja:** ocena ilościowej liczby struktur na przykładzie analizy liczby i wielkości jąder komórkowych z immunopozytywną reakcją PCNA w ocenie materiału z nowotworem jelita grubego na preparatach cyfrowych skanowanych w powiększeniach 10x, 20x, 40x przy różnych rozdzielczościach (średnia, wysoka).

### II.2. Uzasadnienie wyboru celów pracy

Wraz z rosnącym zapotrzebowaniem na szybką, obiektywną, powtarzalną i precyzyjną interpretację wyników histopatologicznych istnieje potrzeba wdrażania metod optymalnej rejestracji całych preparatów histopatologicznych oraz ich analizy ilościowej do rutynowej diagnostyki. Z drugiej strony, rozwój mikroskopii wirtualnej stwarza warunki do telekonsultacji i edukacji, m.in. poprzez analizę baz danych obrazowych wraz z parametrami opisowymi analizy morfometrycznej preparatów

cyfrowych. Ocena subiektywna i/lub manualna całych preparatów histologicznych (na przykład zliczanie komórek, ocena rozległości reakcji) jest czasochłonna i obarczona ryzykiem błędu z powodu zmęczenia, czy złudzenia wzrokowego. Dlatego wydaje się być w pełni uzasadnione poszukiwanie coraz lepszych technik automatycznej rejestracji i optymalnej analizy ilościowej preparatów cyfrowych.

## **Rozdział III. Materiał i metody**

### **III.1. Materiał badany**

Materiał badawczy obejmował preparaty mikroskopowe z bloczków parafinowych ze zbiorów Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Materiał do oceny ilościowej reakcji histochemicznej stanowiły skrawki parafinowe o grubości 4  $\mu\text{m}$  z bloczków parafinowych bioptatów z wykładnikami włóknienia w przypadkach przewlekłego zapalenia wątroby oraz alkoholowego uszkodzenia wątroby, wybarwione hematoksyliną i eozyną (H+E) oraz barwione czerwienią Syriusza (Vacca, 1985).

Materiał do oceny liczby struktur z pozytywną reakcją immunohistochemiczną stanowiły skrawki parafinowe o grubości 4 $\mu\text{m}$  z nowotworem jelita grubego. Reakcję immunohistochemiczną z wykorzystaniem mysich przeciwciał anti-PCNA (klon PC10) firmy DakoCytomation w stężeniu 1:100 wykonano wg standardowej metody ABC (streptawidyna-biotynyłowana peroksydaza) opisywanej przez Hsu i wsp. (1981).

Preparaty zostały następnie ocenione przez doświadczonego histopatologa- prof. UM dr hab. med. Aldonę Woźniak, który zweryfikował obecność mikroskopowych wykładników rozpoznania klinicznego.

Na wykonywanie badań uzyskałam pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 253/10 z dnia 4 marca 2010r.).

## III.2. Metodyka badań

### III.2.1. Akwizycja i archiwizacja preparatów cyfrowych

Do skanowania całych preparatów histologicznych wykorzystałam skaner DotSlide (firmy Olympus). Preparaty były rejestrowane przy różnych powiększeniach (10x, 20x, 40x) oraz przy średniej, a następnie wysokiej rozdzielczości, czyli każdy preparat skanowałam 6-krotnie.

Skanowane preparaty były zapisywane w standardowym formacie oprogramowania DotSlide – VSI.

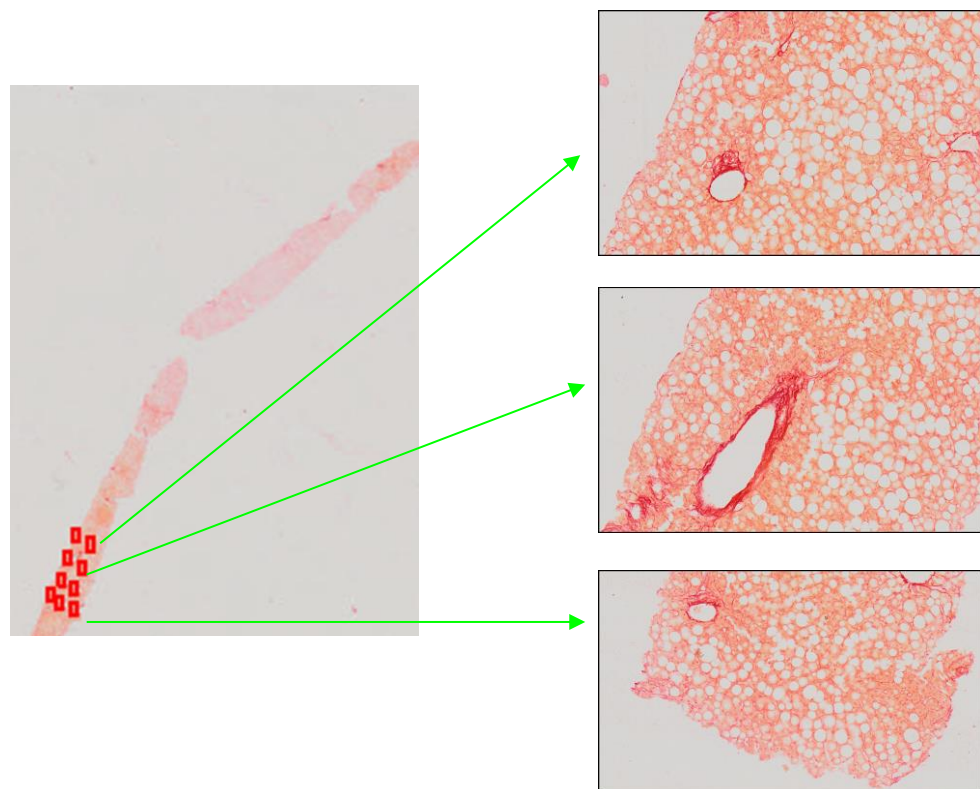
Próbkowanie podobrazów z preparatów cyfrowych wykonałam wykorzystując oprogramowanie OlyVia (firmy Olympus). Proces ten polegał na wyodrębnieniu z każdego wirtualnego preparatu podobrazów pod 10-krotnym powiększeniem (ryc.12). Wielkość pojedynczego pola wyniosła 1400x800 pikseli (ryc.13). Następnie każdy podobraz zapisywany był w formacie JPG.

W wyniku procesu próbkowania preparatów cyfrowych otrzymałam:

- 314 podobrazów wybarwionych czerwienią Syriusza;
- 9 200 podobrazów z reakcją PCNA.



Ryc.12. Zrzut ekranowy z programu OlyVia; emulacja preparatu cyfrowego pod powiększeniem 10x (oznaczenia w kolorze zielonym).



Ryc.13. Uproszczony schemat próbkowania preparatu wybarwionego czerwienią Syriusza. Wielkość pojedynczego pola wyniosła 1400x800 pikseli.

### **III.2.2. Rozpoznawanie struktur morfologicznych metodami komputerowej analizy obrazów mikroskopowych**

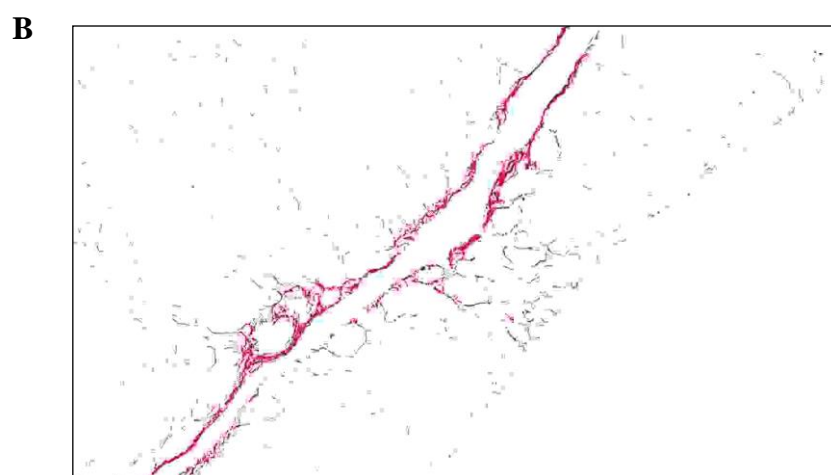
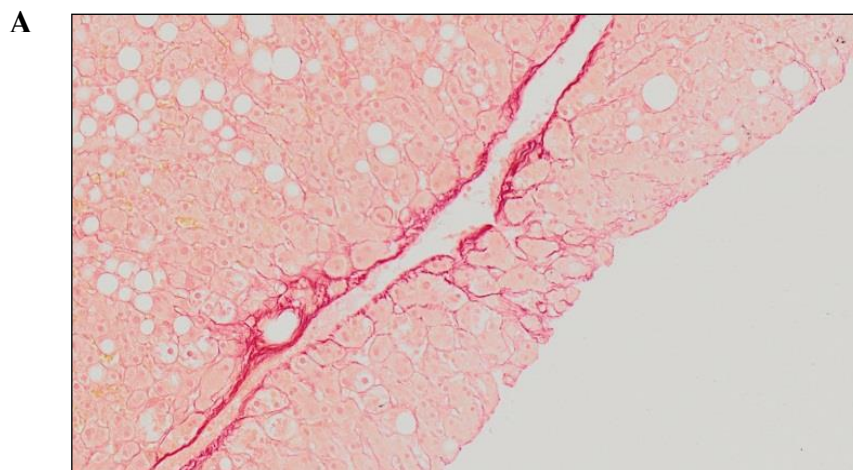
W niniejszej pracy wykorzystałam w tym celu autorski program *Filtr HSV* (Helak-Łapaj, praca doktorska, 2012) oraz program *Image-Pro Premier* (Media Cybernetics).

### **III.2.2.1. Rozpoznawanie i analiza ilościowa struktur w autorskim programie *Filtr HSV***

Obrazy mikroskopowe były przetwarzane w przestrzeni kolorów HSV, gdzie dla każdej składowej: H (ang. *Hue*- odcień barwy), S (ang. *Saturation*- nasycenie barwy) oraz V (ang. *Value*- jasność barwy) określałam odpowiedni zakres wartości progowych dla reakcji histo- i immunohistochemicznej w celu przeprowadzenia segmentacji progowej kolorowych obrazów mikroskopowych.

Obszarem mojego zainteresowania (ang. *area of interest AOI*) były włókna kolagenowe, które w wyniku reakcji histochemicznej były zabarwione na kolor intensywnie czerwony i które należało rozpoznać oraz wyodrębnić na podstawie wartości progowych i ocenić ich pole powierzchni oraz udział procentowy odniesiony do powierzchni całkowitej badanej tkanki. Do obszaru zainteresowania nie należała tkanka w kolorze jasnoczerwonym lub różowym (amyloid w przestrzeni Dissego, wzdłuż naczyń krwionośnych oraz przestrzeniach bramnych) oraz w kolorze żółtym (krople lipidowe). Przykład obrazu wynikowego po segmentacji progowej przedstawia rycina 14. W kolejnym kroku przeprowadziłam pomiar rozległości obszaru, jaki zajmowały włókna kolagenowe. Dla każdego podobrazu wybranego z preparatu obliczano procentowy stosunek pola powierzchni włókien kolagenowych (AOI) do wielkości całego podobrazu (tj. 1400x800 pikseli), a następnie sumowano wyniki podobrazów całego preparatu.

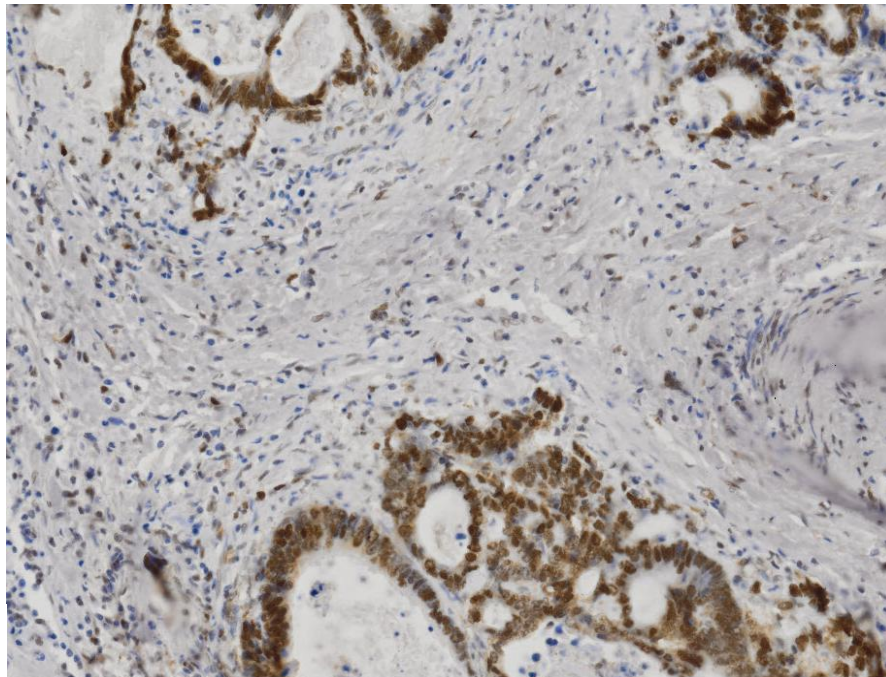
Analogiczną procedurę segmentacji przeprowadziłam na materiale z jelita grubego. W tym przypadku celem było zliczenie struktur jąder komórkowych w badanym preparacie. Dobierając odpowiednie wartości progowe trzech składowych H, S, i V oraz określając zakres wielkości jąder komórkowych, wyodrębnione zostały jądra komórkowe z pozytywną reakcją antygeny PCNA (ryc.15). Następnie przy pomocy programu *Filtr HSV* dokonałam ich zliczenia, a wyniki uśredniłam dla każdego preparatu.



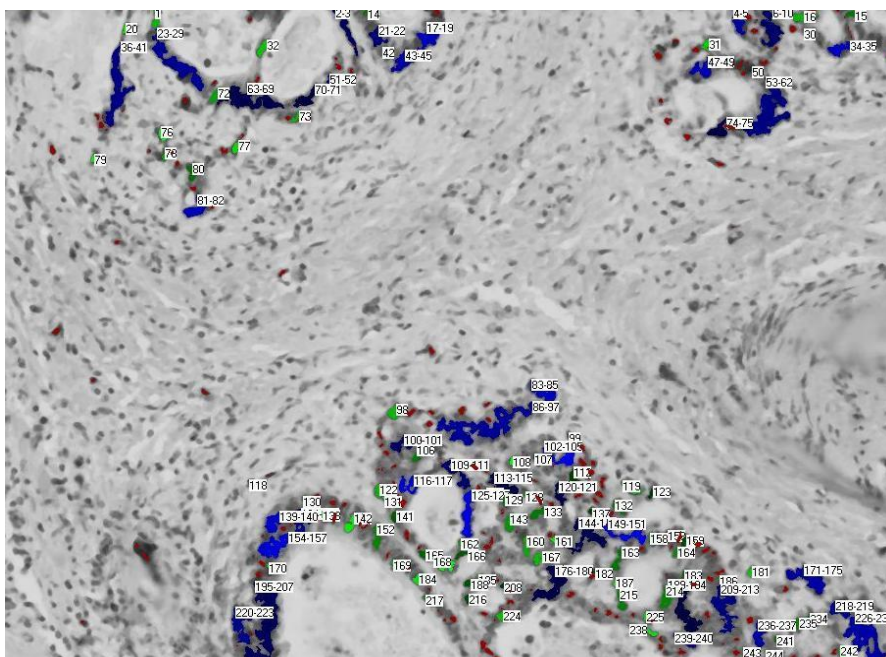
Ryc.14. Obraz przed segmentacją (A) oraz po segmentacji włókien kolagenowych (B) w programie autorskim *Filtr HSV*.



**A**



**B**

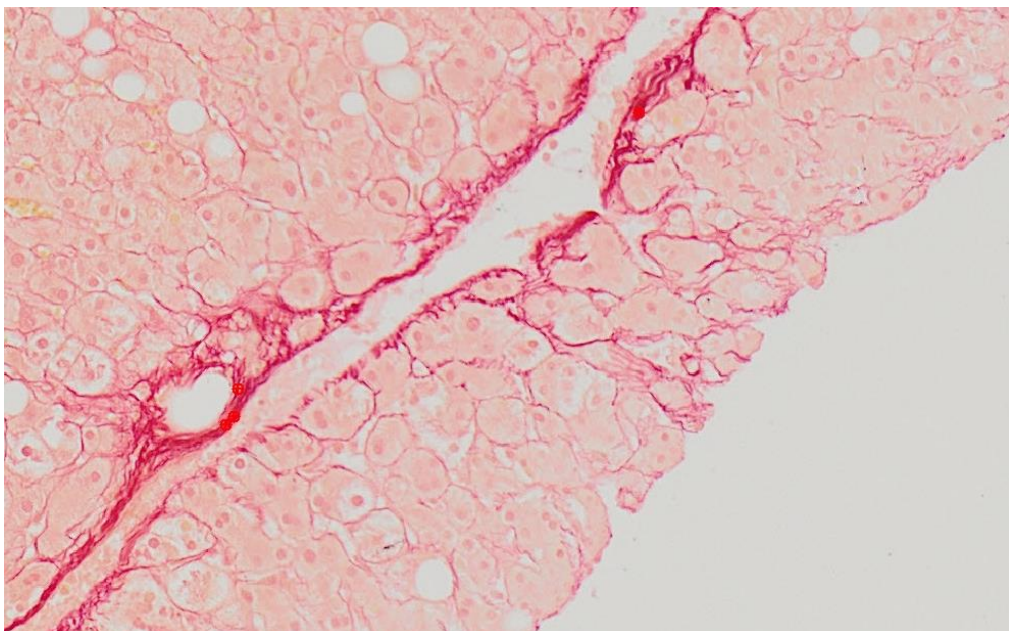


Ryc.15. Fragment wirtualnego slajdu przed segmentacją (A) i po segmentacji ze zliczonymi strukturami PCNA (B) w programie autorskim *Filtr HSV*.

### III.2.2.2. Rozpoznawanie i analiza ilościowa struktur w programie

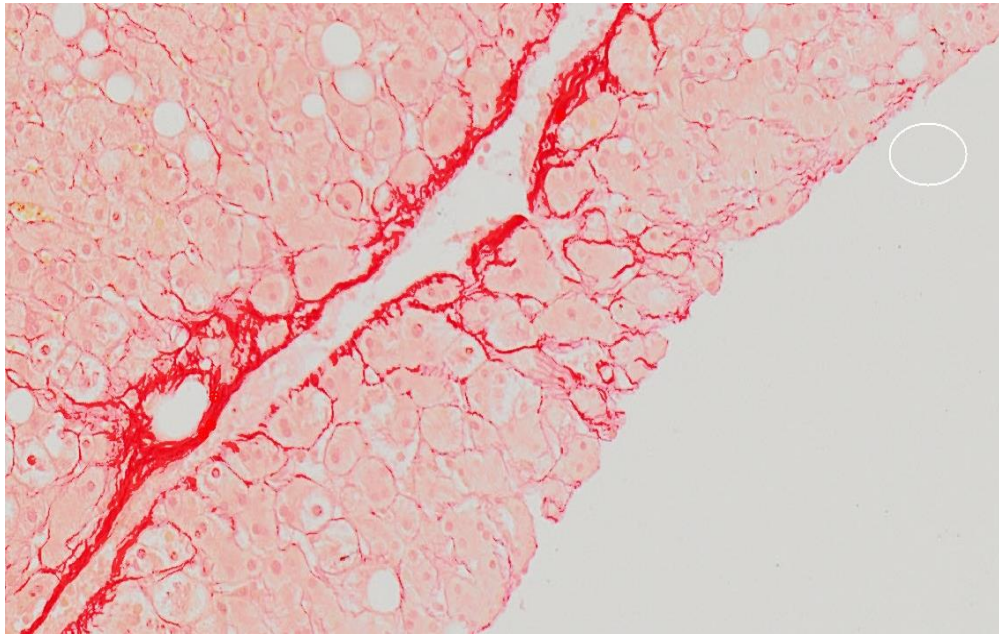
#### *Image-Pro Premier*

Proces rozpoznawania struktur morfologicznych przy użyciu tego programu został wzbogacony szerokim wyborem deskryptorów obrazu (teksturalnych, kolorymetrycznych, geometrycznych). Klasyfikatory miały za zadanie przyporządkowanie każdego badanego obiektu do określonej klasy. Poszczególnym klasom przypisane były odpowiednie kolory. Dla każdego preparatu cyfrowego zdefiniowałam 3 klasy obiektów: klasę 1 stanowiły włókna kolagenowe w kolorze intensywnie czerwonym (ryc.16), klasę 2- szkiełko podstawowe (ryc.17) oraz klasę 3- materiał bez cech włóknienia (w kolorze jasnoczerwonym lub różowym oraz w kolorze żółtym). Po rozpoznaniu i wyodrębnieniu obszarów włóknienia (ryc.18) wykonałam pomiar zajmowanego przez niego obszaru, a następnie uzyskane wyniki przeliczyłam na wartości procentowe.

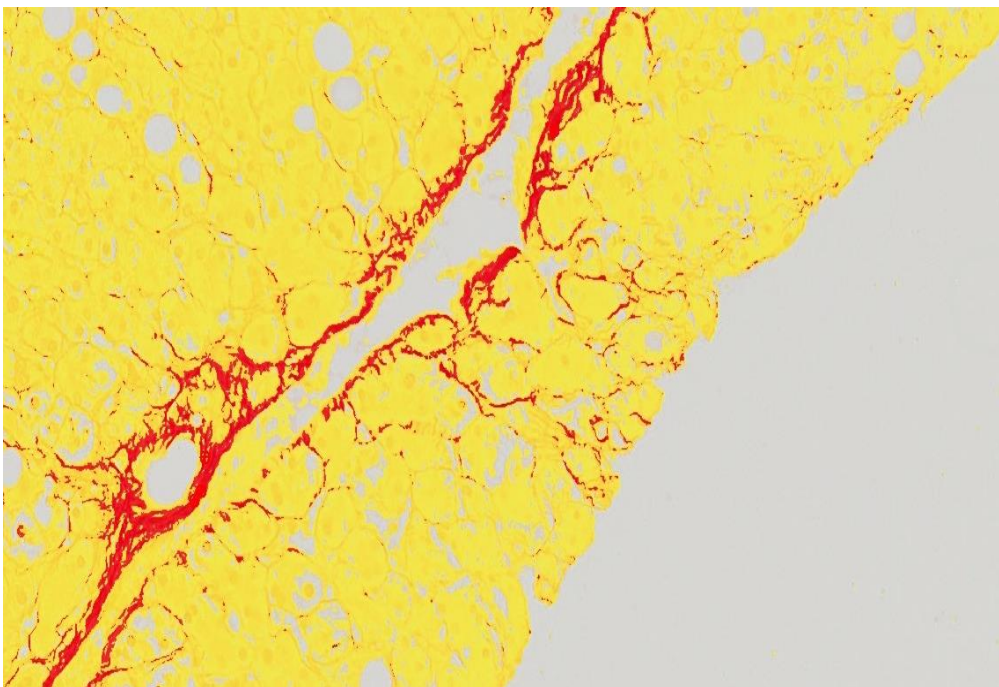


Ryc.16. Fragment preparatu cyfrowego i segmentacja włókien kolagenowych wybarwionych czerwienią Syriusza (klasa 1).



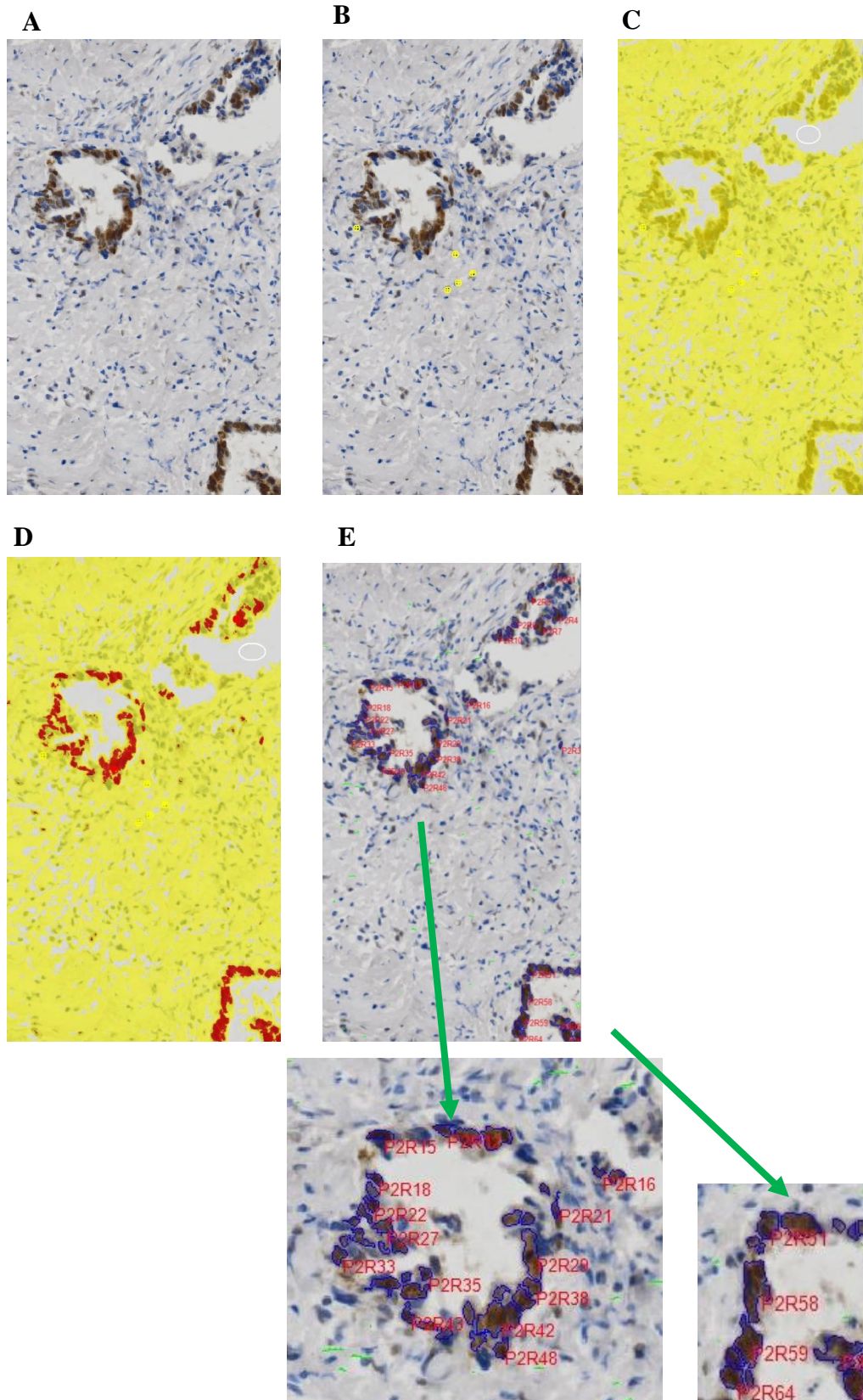


Ryc.17. Segmentacja włókien kolagenowych wybarwionych czerwienią Syriusza- etap klasyfikacji pikseli, wyróżniona klasa 2- szkiełko podstawowe.



Ryc.18. Obraz wynikowy segmentacji włókien kolagenowych wybarwionych czerwienią Syriusza (obiekt zainteresowania zaznaczony kolorem czerwonym).

W celu rozpoznania jąder komórkowych wykazujących pozytywną ekspresję markera proliferacji PCNA w jelicie grubym, utworzyłam 3 klasy obiektów: klasa 1- to obiekty z dodatnią reakcją immunohistochemiczną, klasa 2- to reszta tkanki nie stanowiąca obiekt zainteresowania, klasa 3- to szkiełko podstawowe (ryc.19). Segmentację jąder komórkowych wykonałam metodą działów wodnych (ang. *watershed segmentation*), która umożliwiła rozdzielenie obiektów nachodzących na siebie lub stykających się ze sobą. Następnie przy pomocy programu *Image-Pro Premier*, na każdym podobrazie zliczone zostały wszystkie wyodrębnione jądra komórkowe PCNA-pozytywne i zsumowane dla wszystkich podobrazów całego preparatu cyfrowego.



Ryc.19. Fragment wirtualnego slajdu i segmentacja komórek pozytywnych z reakcją PCNA (klasa 1): (A) oryginał, (B) klasa 2, (C) klasa 3- szkiełko podstawowe, (D) klasa 1- wynik segmentacji, (E) algorytm działów wodnych (oznaczone strzałkami powiększenia obszarów po *watershed segmentation*).

### III.2.3. Parametr jądrowy NAF

Dla wyodrębnionych w procesie segmentacji i zliczonych jąder komórkowych z dodatnią reakcją PCNA, obliczyłam parametr jądrowy NAF (ang. *the nuclear area factor*).

Podczas analizy zarejestrowanych podobrazów, wykorzystując oprogramowanie *Image-Pro Premier*, automatycznie zmierzono następujące parametry: pole powierzchni ( $A_N$ ) i obwód ( $P_N$ ) oraz okrągłość jądra ( $C_N$ ) z dodatnią reakcją PCNA, a następnie obliczono parametr jądrowy NAF stosując wzór:

$$NAF = A_N \cdot C_N$$

gdzie  $C_N = 4\pi A_N / P_N^2$

### III.2.4. Badania pilotażowe

W celu określenia niezbędnej liczby podobrazów preparatu cyfrowego wykonałam analizę morfometryczną 5 preparatów wątroby wybarwionych czerwienią Syriusza i 5 preparatów z reakcją PCNA w rozpoznanych nowotworach jelita grubego. Preparaty histologiczne zostały zeskanowane przy pomocy skanera DotSlide (Olympus) przy powiększeniach 10x, 20x, 40x oraz rozdzielczości średniej i wysokiej. Dla każdego zeskanowanego preparatu wybrano losowo po 10 podobrazów wielkości 1400x800 pikseli. Dokonując losowego wyboru próby skorzystałam z internetowego generatora liczb losowych (<http://www.losowe.pl/>). Każdy podobraz mógł się znaleźć w próbie tylko jeden raz, w ten sposób warunek niepowtarzalności liczb losowych został spełniony. Wylosowane podobrazy następnie analizowałam programem *Filtr HSV*. Obliczyłam średni procent włóknienia wątroby na preparatach wybarwionych czerwienią Syriusza oraz średnią liczbę komórek z pozytywną reakcją PCNA. Przyjmując dokładność wnioskowania statystycznego na poziomie istotności statystycznej 0,05 przy użyciu programu *StatMate* (GraphPad Software) obliczyłam niezbędną liczbę podobrazów preparatów cyfrowych. Wyznaczona w ten sposób minimalna liczba podobrazów jest równa 20 dla każdego preparatu.



Jako wyniki odniesienia oceny włóknienia wątroby na podstawie preparatów histopatologicznych wykorzystano wyniki badań sonoelastograficznych tych samych 5 pacjentów z alkoholowym uszkodzeniem wątroby o różnym zaawansowaniu włóknienia, których preparaty wybrano do badania pilotażowego przy ustalaniu liczebności podobrazów (Chmielewski i wsp., 2009). Dla tych pacjentów wykonano ocenę twardości wątroby aparatem Hitachi EUB 6500HV (Hitachi Medical Systems) w Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Elastogramy (obrazy bitmapowe wielkości 3,5 x 3,5 cm) składały się z trzech kolorów: czerwonego, niebieskiego i zielonego odpowiadających tkance miękkiej, twardej i o pośredniej twardości. Do ilościowej analizy uzyskanych elastogramów użyto program ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

Wyniki elastografii porównywano z histologiczną oceną stopnia włóknienia wątroby.

### **III.2.5. Próbkowanie preparatów cyfrowych**

Znając całkowitą liczebność podobrazów każdego preparatu cyfrowego (314 dla bioptatów z wątroby oraz 9200 dla tkanki z antygenem PCNA) oraz niezbędną liczebność podobrazów, które należy wylosować wyznaczyłam za pomocą generatora liczb losowych 20 niepowtarzających się numerów podobrazów (odpowiednio z zakresu liczb od 1 do 314 oraz od 1 do 9200).

W kolejnym kroku przeprowadziłam losowanie podobrazów metodą systematyczną. Obliczyłam niezbędny interwał, który posłużył do wyznaczenia dwudziestu podobrazów dla każdego preparatu.

Wylosowane w ten sposób podobrazy preparatów z reakcją histochemiczną oraz immunohistochemiczną były następnie analizowane przy pomocy programów *Filtr HSV* oraz *Image-Pro Premier*.



### III.2.6. Analiza statystyczna wyników badań

Wyniki badań morfometrycznych, które uzyskałam przy użyciu autorskiego programu *Filtr HSV* oraz programu *Image-Pro Premier* (Media Cybernetics Inc.), poddałam analizie statystycznej korzystając z programów Statistica v. 10.0 (Statsoft Inc.) oraz MedCalc (Medcalc Software byba). Dla wszystkich mierzalnych zmiennych wyliczałam ich wartości średnie oraz odchylenia standardowe. Rozkłady empiryczne wyników morfometrycznych uzyskanych na podstawie systematycznego próbkowania preparatów oraz na podstawie próbkowania losowego porównywałam testem Wilcoxon.

W celu zweryfikowania zgodności wyników różnych metod próbkowania preparatów (losowego i systematycznego) dla wszystkich wybranych ustawień skanera (powiększenie i rozdzielczość), obliczałam współczynnik korelacji Spearmana, a dodatkowo, do oceny zgodności proporcjonalnej: współczynnik korelacji liniowej. Ponadto wykonano analizę regresji liniowej metodą Passinga-Bablocka.

Analiza regresji liniowej metodą Passinga-Bablocka nie ma specjalnych wymagań dotyczących rozkładu próbek oraz błędów pomiarowych. Różni się ona od regresji liniowej Pearsona metodą pomiaru błędów dla poszczególnych pomiarów (które na wykresie przedstawiane są w postaci linii łączącej daną obserwację z linią regresji). W analizie regresji Pearsona wykorzystywana jest tradycyjna metoda najmniejszych kwadratów błędów (linie są równoległe do osi  $y$ ), natomiast w analizie regresji metodą Passinga-Bablocka wyznaczone linie są prostopadłe do linii regresji.

Wyniki analizy Passinga-Bablocka (1981) przedstawiane są w postaci wykresu, na którym naniesiona jest linia regresji wraz z 95% przedziałami ufności oraz tzw. linia tożsamości ( $x=y$ , gdy wyniki obu badanych metod próbkowania są identyczne). Dodatkowo możliwe jest przeprowadzenie oceny liniowości pomiędzy próbkowaniem systematycznym a losowym.

Ocenę homogeniczności grup przeprowadzałam na podstawie współczynnika zgodności Cronbacha (Cronbach, 1951), który przyjmuje wartości od 0 do 1. Wartości większe od 0,7 wskazują na wysoką zgodność pomiarami.

Do weryfikacji zgodności wyników morfometrycznych uzyskanych przy użyciu programu *Filtr HSV* z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu programu *Image-Pro Premier* wykonałam analizę Blanda-Altmana (Bland i Altman, 1986, 1997). Na wykresach Blanda-Altmana zostały przedstawione linie 95% przedziałów ufności dla

średniej różnicy pomiędzy pomiarami uzyskanymi z programów *Filtr HSV* oraz *Image-Pro Premier* oraz punkty o współrzędnych równych wynikom pomiarów uzyskanych w obu programach. Ważne jest, aby 95% pomiarów mieściło się między liniami ufności, wtedy można mówić o dobrej powtarzalności wyników (dopuszczalny procent wyników odstających wynosi 5 %).

We wszystkich zastosowanych testach statystycznych poziom  $p < 0,05$  przyjęto jako potwierdzający istotność statystyczną.

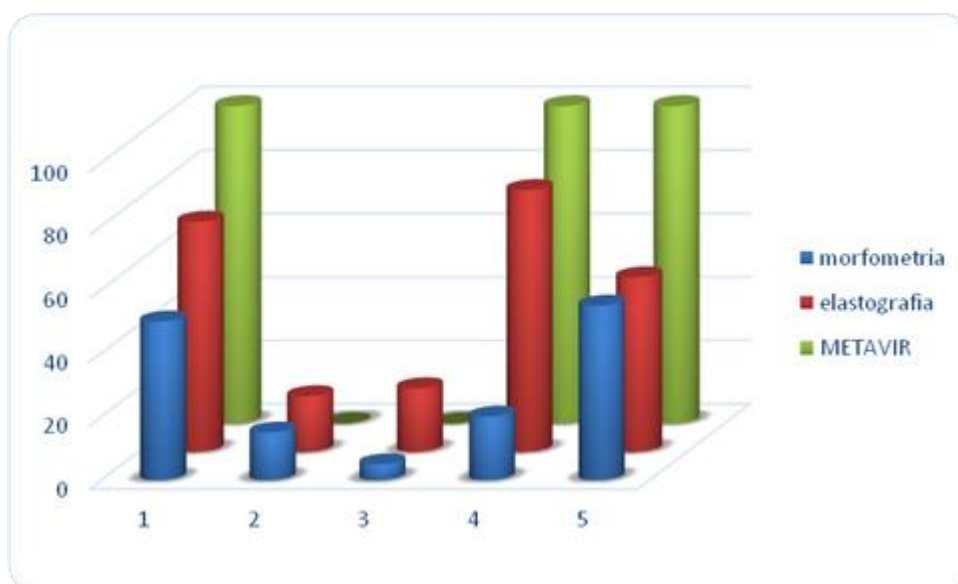
## Rozdział IV. WYNIKI

### IV.1. Ocena ilościowa, półilościowa oraz elastograficzna stopnia włóknienia wątroby w grupie pilotażowej

Statystyczna ocena wpływu jakości akwizycji preparatów histopatologicznych oraz metod próbkowania preparatów na wyniki morfometryczne została przeprowadzona na przykładzie analizy włóknienia śródmiąższu wątroby (barwienie histochemiczne czerwienią Syriusza) oraz ekspresji PCNA w przypadkach zmian nowotworowych w jelicie grubym. Analiza ta została poprzedzona badaniem na grupie 5 chorych objętych wcześniej badaniem sonoelastograficznym i histopatologicznym (Chmielewski i wsp., 2009). Wybrane preparaty histopatologiczne zostały ocenione przez doświadczonego histopatologa w skalach METAVIR (Bedossa i Poinard, 1996) oraz Knodell'a (Knodell i wsp., 1981). Wyniki oceny ilościowej rozległości włóknienia na podstawie preparatów cyfrowych z reakcją czerwieni Syriusza zarejestrowanych przy 20-krotnym powiększeniu skanera i średniej rozdzielczości (dla próbkowania systematycznego), uzyskano z programów *Filtr HSV* oraz *Image-Pro Premier*. Grupą odniesienia dla wyników rozległości włóknienia ocenianych na podstawie preparatów histologicznych były wyniki sonoelastografii tych chorych (Chmielewski i wsp., 2009). Wyniki oceny histopatologicznej oraz sonoelastograficznej chorych zamieszczono w tabeli I. Można zauważyć, że wysokie wartości ocen są zgodne z wyjątkiem wyniku preparatu 4, którego ocena morfometryczna jest zbyt niska w porównaniu z oceną sonoelastograficzną oraz histopatologiczną w skali METAVIR. Niskie wartości ocen są zgodne we wszystkich skalach (ryc. 20).

Tab.I. Wyniki oceny morfometrycznej, histopatologicznej i sonoelastograficznej w grupie pilotażowej.

Preparat	1	2	3	4	5
	<b>ocena morfometryczna</b> (procent ekspresji reakcji czerwieni Syriusza) średnia $\pm$ odch. std.				
Image-Pro Premier	10,06 $\pm$ 5,69	2,77 $\pm$ 2,46	1,01 $\pm$ 0,60	3,70 $\pm$ 4,37	11,00 $\pm$ 6,56
Filtr HSV	10,21 $\pm$ 10,25	3,79 $\pm$ 2,97	1,34 $\pm$ 1,00	4,08 $\pm$ 4,42	11,00 $\pm$ 6,56
<b>ocena histopatologiczna</b>					
skala METAVIR	F4	F0	F0	F4	F4
skala Knodella	S4	S0	S0	S4	S4
<b>ocena sonoelastograficzna</b>					
(udział procentowy koloru niebieskiego)	29,34	7,29	8,53	33,36	21,92



Ryc.20. Porównanie wyników oceny morfometrycznej, elastograficznej i histopatologicznej w skali METAVIR odniesionych do spodziewanych wartości maksymalnych (równych górnej granicy 95% przedziału ufności dla wartości średniej).

Na jakość obrazów cyfrowych może mieć wpływ powiększenie oraz rozdzielczość skanowania preparatów histologicznych, stąd ocena statystyczna przedstawiona w tej części pracy obejmuje ich analizę dla dwóch schematów próbkowania: systematycznego i losowego prostego. Chcąc zweryfikować ewentualną zależność wyników morfometrycznych od wyboru oprogramowania do analizy obrazów przedstawiono wyniki morfometryczne wykonane w programach *Filtr HSV* oraz *Image-Pro Premier*.

Wyniki niniejszej pracy pozwolą na weryfikację hipotezy badawczej, że wyniki morfometryczne zależą od powiększenia i rozdzielczości skanowania preparatów oraz schematu próbkowania preparatu cyfrowego niezależnie od użytego oprogramowania do analizy obrazów.

## IV.2. Ocena ilościowa włóknienia śródmiąższu wątroby na podstawie analizy preparatów cyfrowych z reakcją czerwieni Syriusza

Analizę morfometryczną wykonano na 314 podobrazach barwionych czerwinią Syriusza. Wartości średnie i odchylenia standardowe procentu włóknienia śródmiąższu wątroby na podstawie próbkowania systematycznego i losowego dla wszystkich wybranych ustawień skanera DotSlide przedstawiono w tabeli IIA. Wyniki uzyskane na podstawie próbkowania systematycznego nie różnią się istotnie od wyników próbkowania losowego niezależnie od wybranej jakości rejestracji preparatu, powiększenia oraz oprogramowania do analizy rozległości włóknienia śródmiąższu wątroby. Szczegółowe wyniki dla każdego preparatu histologicznego zawarte są w aneksie w tabelach od II B do II F.

Tab.IIA. Parametry statystyki opisowej (wartość średnia, odchylenie standardowe) włóknienia śródmiąższu wątroby (wyrażonego jako procent włóknienia) w poszczególnych grupach oraz wyniki testu Wilcozona ( $p > 0,05$  ozn. brak występowania statystycznie istotnych różnic między porównywanymi parametrami).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia $\pm$ odch. std.		Test Wilcozona (p)
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe	
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	6,8 $\pm$ 4,90	6,54 $\pm$ 4,9	0,634
		20x	6,32 $\pm$ 4,38	6,50 $\pm$ 4,84	0,572
		40x	5,77 $\pm$ 4,33	6,20 $\pm$ 5,00	0,662
	Wysokiej rozdzielczości	10x	6,08 $\pm$ 4,18	6,47 $\pm$ 4,86	0,428
		20x	5,77 $\pm$ 4,33	6,35 $\pm$ 4,96	0,616
		40x	5,87 $\pm$ 4,37	6,18 $\pm$ 5,02	0,509
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	6,10 $\pm$ 5,16	5,74 $\pm$ 4,4	0,963
		20x	6,08 $\pm$ 5,07	5,70 $\pm$ 4,34	0,680
		40x	5,83 $\pm$ 5,22	5,37 $\pm$ 4,38	0,761
	Wysokiej rozdzielczości	10x	6,04 $\pm$ 5,01	5,70 $\pm$ 4,34	0,639
		20x	5,98 $\pm$ 5,29	5,47 $\pm$ 4,37	0,698
		40x	6,10 $\pm$ 5,38	5,70 $\pm$ 4,63	0,874

Ocenę zgodności wyników otrzymanych na podstawie próbkowania systematycznego i losowego podobrazów każdego preparatu wykonano dla wszystkich wybranych ustawień skanera DotSlide na podstawie analizy korelacji (tabela III, tabela IV). We wszystkich przypadkach (uwzględniając także podział w zależności od zastosowanego oprogramowania) wykazano statystycznie istotną korelację pomiędzy wynikami rejestrowanymi przy średniej oraz wysokiej rozdzielczości skanera. Dla wyników uzyskanych w programie *Filtr HSV*, największą wartość współczynnika korelacji dla próbkowania systematycznego otrzymano dla 10-krotnych powiększeń ( $r=0,9985$ ), natomiast dla próbkowania losowego:  $r=0,9991$  dla 40-krotnych powiększeń. W programie *Image-Pro Premier* największą wartość współczynnika korelacji dla próbkowania systematycznego otrzymano przy 10-krotnym powiększeniu skanera ( $r=0,9821$ ), natomiast dla próbkowania losowego największą wartość współczynnika korelacji ( $r=0,9883$ ) uzyskano przy 20-krotnym powiększeniu skanera.

Jednocześnie dokonano oceny homogeniczności grup ze względu na zastosowaną rozdzielczość skanera poprzez wyznaczenie współczynnika zgodności Cronbacha. Dla wszystkich porównywanych grup w próbkowaniu systematycznym oraz w próbkowaniu losowym, uwzględniając także podział na zastosowane oprogramowanie, wartość tego współczynnika wszędzie była bliska wartości 1 (tabela III, tabela IV).

Tab.III. Wartości współczynnika korelacji liniowej oraz współczynnika zgodności Cronbacha wyników procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza na preparatach rejestrowanych przy ustalonym powiększeniu (10, 20, 40) oraz średniej (s) i wysokiej (w) rozdzielczości z użyciem programu *Filtr HSV* (korelacje istotne statystycznie przy  $p<0,05$  zaznaczone są kolorem czerwonym).

<b>Próbkowanie systematyczne</b>	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik zgodności Cronbacha
<b>10s vs. 10w</b>	<b>0,9985</b>	0,9992
<b>20s vs. 20w</b>	<b>0,9965</b>	0,9983
<b>40s vs. 40w</b>	<b>0,9961</b>	0,9980

<b>Próbkowanie losowe</b>	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik zgodności Cronbacha
<b>10s vs. 10w</b>	<b>0,9963</b>	0,9982
<b>20s vs. 20w</b>	<b>0,9945</b>	0,9972
<b>40s vs. 40w</b>	<b>0,9991</b>	0,9995

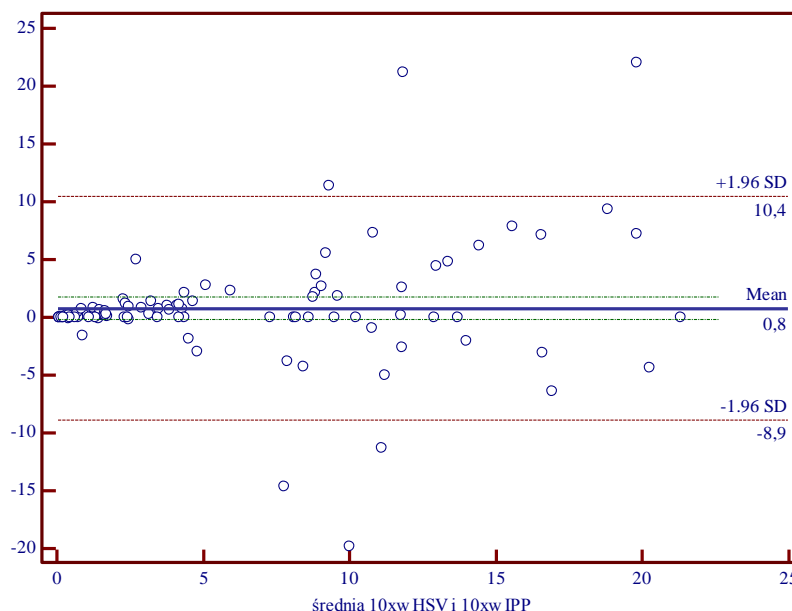


Tab. IV. Wartości współczynnika korelacji liniowej oraz współczynnika zgodności Cronbacha wyników procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza na preparatach rejestrowanych przy ustalonym powiększeniu (10, 20, 40) oraz średniej (s) i wysokiej (w) rozdzielczości z użyciem programu *Image-Pro Premier* (korelacje istotne statystycznie przy  $p < 0,05$  zaznaczone są kolorem czerwonym).

Próbkowanie systematyczne	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik zgodności Cronbacha
10s vs. 10w	0,9821	0,9910
20s vs. 20w	0,9784	0,9891
40s vs. 40w	0,9620	0,9807

Próbkowanie losowe	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik zgodności Cronbacha
10s vs. 10w	0,9853	0,9926
20s vs. 20w	0,9883	0,9941
40s vs. 40w	0,8957	0,9450

Do oceny zgodności pomiarów procentu włóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* i *Image-Pro Premier* zastosowano analizę Blanda-Altmana. W przypadku analizy pomiarów uzyskanych pod 10-krotnym powiększeniem i wysokiej rozdzielczości skanera dla próbkowania losowego (ryc.21), średnia różnica pomiędzy pomiarami w obu programach wyniosła 0,8%, natomiast odchylenie standardowe dla różnicy wyniosło 4,9%. W przedziale ufności znalazło się 94% różnic pomiędzy parami pomiarów, a współczynnik Blanda-Altmana wyniósł 6%, co świadczy o wysokiej powtarzalności wyników. W pozostałych analizach wartość współczynnika wahała się pomiędzy 7-10% (ryciny 22-27 zawarte w aneksie).



Ryc.21. Zgodność pomiarów procentu włóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) w przypadku próbkowania losowego i 10-krotnego powiększenie skanera oraz wysokiej rozdzielczości skanera. Współczynnik Blanda-Altmana wyniósł 6%.

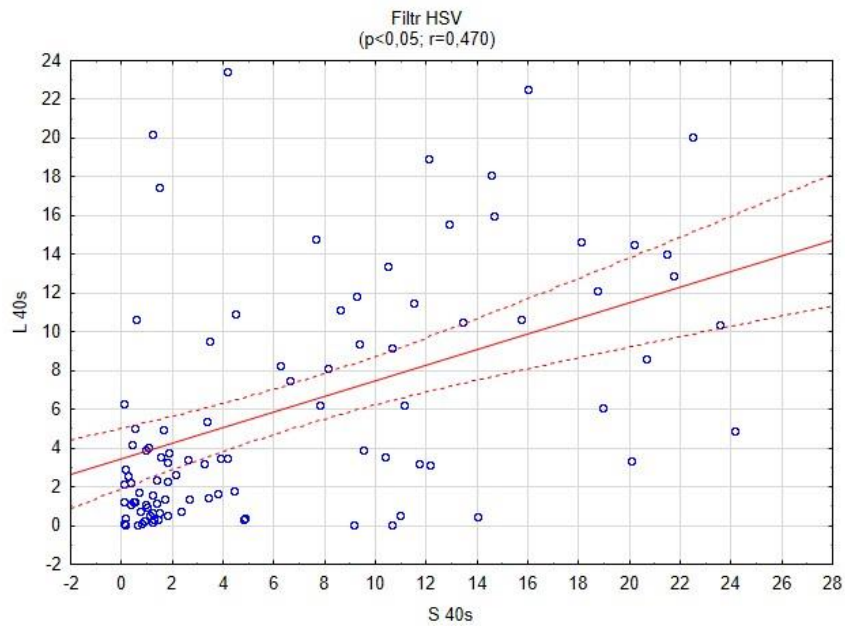
Wpływ metody próbkowania (losowe vs. systematyczne) z zachowaniem podziału na użyte oprogramowanie analizowano na podstawie wartości współczynników korelacji liniowej Pearsona oraz Spearmana. We wszystkich porównaniach uzyskano istotne statystycznie korelacje ( $p < 0,0001$ ) (tabela V i VI). Dla wyników uzyskanych w programie *Filtr HSV* współczynnik korelacji Pearsona miał największą wartość ( $r=0,470$ ) dla 40-krotnego powiększenia i średniej rozdzielczości skanera (ryc.28), natomiast dla wyników uzyskanych w programie *Image-Pro Premier* największy współczynnik korelacji ( $r= 0,557$ ) uzyskano dla 40-krotnego powiększenia i wysokiej rozdzielczości skanera (ryc.29). Współczynniki korelacji Spearmana wyników próbkowania systematycznego i losowego osiągnęły wyższe wartości niż wyniki współczynników korelacji Pearsona (dla wyników uzyskanych w programie *Filtr HSV*). Największą wartość współczynnika korelacji Spearmana między wynikami próbkowania systematycznego i losowego prostego ( $r=0,66$ ) uzyskanymi w programie *Filtr HSV* otrzymano dla obrazów rejestrowanych przy 20-krotnym powiększeniu i wysokiej rozdzielczości skanera, natomiast dla programu *Image-Pro Premier* wartość współczynnika korelacji Spearmana była nieco niższa ( $r=0,555$ ) dla preparatów rejestrowanych przy 40-krotnym powiększenia i wysokiej rozdzielczości skanera.

Tab.V. Wyniki analizy korelacji Pearsona oraz korelacji Spearmana dla wyników otrzymanych programem *Filtr HSV* (korelacje statystycznie istotne, gdy  $p < 0,05$  zaznaczono na kolor czerwony).

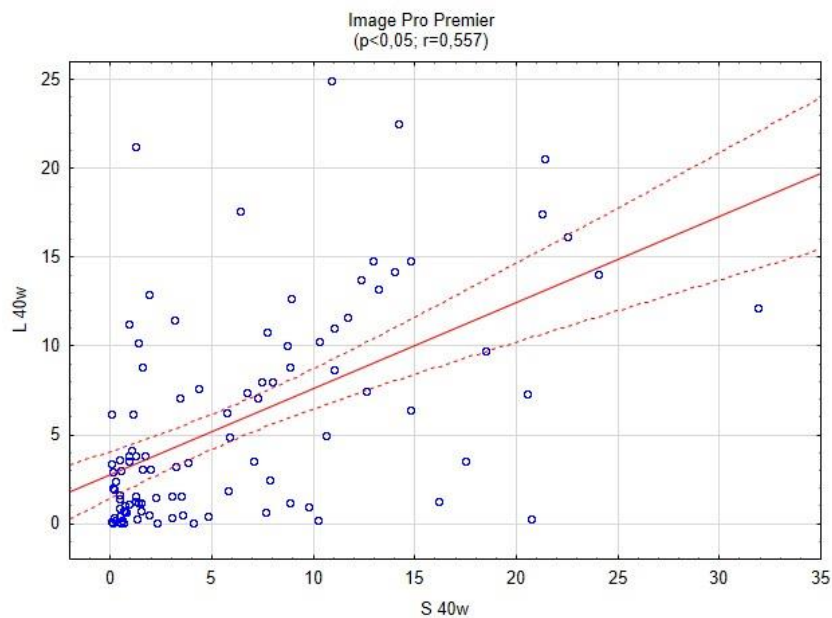
<b>FILTR HSV</b> próbkowanie systematyczne vs. losowe	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik korelacji Spearmana
10s	0,431	0,522
10w	0,417	0,547
20s	0,426	0,539
20w	0,463	0,566
40s	0,470	0,560
40w	0,464	0,545

Tab.VI. Wyniki analizy korelacji Pearsona oraz korelacji Spearmana dla wyników otrzymanych programem *Image-Pro Premier* (korelacje statystycznie istotne gdy  $p < 0,05$  zaznaczono na kolor czerwony).

<b>Image-Pro Premier</b> próbkowanie systematyczne vs. losowe	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik korelacji Spearmana
10s	0,500	0,505
10w	0,500	0,498
20s	0,528	0,507
20w	0,554	0,518
40s	0,509	0,460
40w	0,557	0,555



Ryc.28. Wykres korelacji liniowej pomiędzy pomiarami procentu włóknienia średniemu wątroby uzyskany pod 40-krotnym powiększeniem skanera oraz przy średniej rozdzielczości skanera, metodą próbkowania systematycznego (S) a losowego (L) w programie *Filtr HSV*. Współczynnik korelacji równy 0,470;  $p < 0,05$ .



Ryc.29. Wykres korelacji liniowej pomiędzy pomiarami procentu włóknienia średniemu wątroby uzyskany pod 40-krotnym powiększeniem skanera oraz przy wysokiej rozdzielczości skanera, metodą próbkowania systematycznego (S) a losowego (L) w programie *Image-Pro Premier*. Współczynnik korelacji równy 0,557;  $p < 0,05$ .

Metodą regresji Passinga-Babloka dokonano oceny liniowości pomiędzy próbkowaniem systematycznym a próbkowaniem losowym z zachowaniem podziału na użyte oprogramowanie. W żadnym porównaniu nie wykazano statystycznie istotnych odchyleń od liniowości (tab.VII).

Tab.VII. Porównanie metod próbkowania (systematyczne vs. losowe) metodą regresji Passinga-Babloka ( $p < 0,05$  statystycznie istotne odchylenia od liniowości).

<b>oprogramowanie</b>	<b>jakość rejestracji preparatu</b>	<b>powiększenie</b>	<b>odchylenie od liniowości pomiędzy metodami próbkowania (p)</b>
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	0,38
		20x	0,70
		40x	0,85
	Wysokiej rozdzielczości	10x	0,70
		20x	0,85
		40x	0,70
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	0,17
		20x	0,38
		40x	0,53
	Wysokiej rozdzielczości	10x	0,70
		20x	0,38
		40x	0,23

### IV.3. Ocena liczby i wielkości jąder komórkowych z immunopozytywną reakcją PCNA w ocenie materiału z nowotworem jelita grubego

Jądra komórkowe z immunopozytywną reakcją PCNA zliczano na preparatach cyfrowych z zastosowaniem programów *Filtr HSV* oraz *Image-Pro Premier*.

W tabeli VIII przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe liczby jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup> dla każdej metody próbkowania (systematycznego, losowego) oraz dla wszystkich wybranych ustawień skanera. Wyniki porównań rozkładów empirycznych liczby jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup> przy różnych ustawieniach skanera i obu metodach próbkowania uzyskane przy pomocy testu Wilcoxon przedstawiono również w tabeli VIII A. Test Wilcoxon nie wykazał statystycznie istotnych różnic pomiędzy metodami próbkowania.

Szczegółowe wyniki dla każdego preparatu histologicznego zawarte są w aneksie w tabelach od VIII B do VIII F.

Tab.VIII A. Parametry statystyczne (wartość średnia, odchylenie standardowe) jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup> w poszczególnych grupach oraz wynik testu Wilcoxon ( $p > 0,05$  ozn. nieistotne statystycznie różnice między porównywanymi metodami próbkowania).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia $\pm$ SD		Test Wilcoxon (p)
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe	
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	178 $\pm$ 111	146 $\pm$ 84	0,141
		20x	180 $\pm$ 112	143 $\pm$ 80	0,091
		40x	185 $\pm$ 116	151 $\pm$ 92	0,127
	Wysokiej rozdzielczości	10x	178 $\pm$ 111	146 $\pm$ 85	0,138
		20x	181 $\pm$ 113	144 $\pm$ 80	0,138
		40x	179 $\pm$ 114	148 $\pm$ 92	0,117
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	140 $\pm$ 79	133 $\pm$ 76	0,539
		20x	140 $\pm$ 80	133 $\pm$ 75	0,553
		40x	141 $\pm$ 80	133 $\pm$ 71	0,528
	Wysokiej rozdzielczości	10x	140 $\pm$ 80	136 $\pm$ 77	0,592
		20x	140 $\pm$ 79	135 $\pm$ 73	0,588
		40x	140 $\pm$ 81	133 $\pm$ 70	0,573

Analiza korelacji otrzymanych wyników dla każdego rodzaju próbkowania oraz wszystkich wybranych ustawień skanera (tabela IX i X) wykazała istotną zależność pomiędzy średnią i wysoką rozdzielczością skanera przy każdym wybranym powiększeniu.

Najwyższą korelację wyników średniej i wysokiej rozdzielczości uzyskanych z programu *Filtr HSV* stwierdzono dla 10-krotnych powiększeń zarówno dla próbkowania systematycznego ( $r=0,9997$ ), jak i próbkowania losowego ( $r=0,9994$ ).

Wyniki uzyskane z programu *Image-Pro Premier* wykazały największą korelację między obrazami o średniej i wysokiej rozdzielczości przy 20-krotnym powiększeniu skanera ( $r=0,9996$ ) dla próbkowania systematycznego, natomiast przy 40-krotnym powiększeniu dla próbkowania losowego ( $r=0,9996$ ).

W ocenie jednorodności grup ze względu na zastosowaną rozdzielczość skanera (średnia rozdzielczość vs. wysoka rozdzielczość) współczynnik zgodności Cronbacha przyjmował wartości równe lub bardzo bliskie 1 zarówno dla próbkowania systematycznego jak i losowego, niezależnie od zastosowanego oprogramowania do analizy obrazów (tabele IX i X).

Tab. IX. Wyniki analizy korelacji (wyznaczony współczynnik korelacji liniowej) oraz współczynnik zgodności Cronbacha dla wyników morfometrycznych otrzymanych w programie *Filtr HSV* ( $p<0,05$  korelacje istotne statystycznie zaznaczone są kolorem czerwonym).

Próbkowanie systematyczne	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik zgodności Cronbacha
10s vs. 10w	0,9997	0,9265
20s vs. 20w	0,9987	1
40s vs. 40w	0,9996	0,9996

Próbkowanie losowe	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik zgodności Cronbacha
10s vs. 10w	0,9994	1
20s vs. 20w	0,9987	0,9999
40s vs. 40w	0,9982	0,9997

Tab. X. Wyniki analizy korelacji (wyznaczony współczynnik korelacji liniowej) oraz współczynnik zgodności Cronbacha dla wyników morfometrycznych otrzymanych w programie *Image-Pro Premier* ( $p<0,05$  korelacje istotne statystycznie zaznaczone są kolorem czerwonym).

Próbkowanie systematyczne	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik zgodności Cronbacha
10s vs. 10w	0,9995	1
20s vs. 20w	0,9996	0,9999
40s vs. 40w	0,9981	0,9998

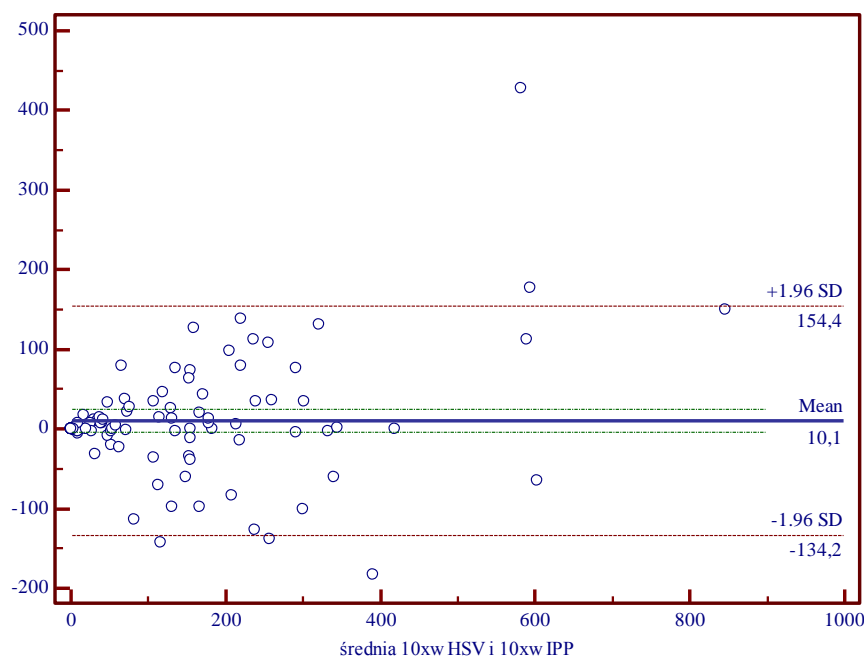
Próbkowanie losowe	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik zgodności Cronbacha
10s vs. 10w	0,9932	0,9991
20s vs. 20w	0,9948	0,9997
40s vs. 40w	0,9969	0,9997

Porównanie metody zliczania jąder komórkowych w programach *Filtr HSV* i *Image-Pro Premier* wykonano na podstawie analizy Blanda-Altmana.

Wartość współczynnika Blanda-Altmana dla wyników uzyskanych w obu programach metodą próbkowania systematycznego wahała się od 6% do 7%.

W analizie wyników uzyskanych pod 10-krotnym powiększeniem i wysokiej rozdzielczości skanera dla próbkowania losowego, średnia różnica pomiędzy pomiarami w obu programach wyniosła 10,1 jąder komórkowych z PCNA<sup>+</sup>, a odchylenie standardowe wyniosło 74,1 (ryc.30). W przedziale ufności znalazło się 95% różnic pomiędzy parami pomiarów, a współczynnik Blanda-Altmana wyniósł 5%.

Dla pozostałych analizowanych porównań wyników próbkowania losowego, współczynnik zgodności pomiarów przyjmował wartość 6-7% (ryciny 31-38 zawarte w aneksie).



Ryc.30. Wykres Blanda-Altmana dla jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup> zliczanych programem *Filtr HSV* (ozn. HSV) i *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) przy 10-krotnym powiększeniu oraz wysokiej rozdzielczości skanera oraz próbkowaniu losowym. Współczynnik Blanda-Altmana wyniósł 5%.

Analiza korelacji liniowej Pearsona oraz korelacji Spearmana wykazała statystycznie istotne korelacje ( $p \leq 0,0001$ ), chociaż o niższej sile zależności (współczynnik determinacji  $r^2 < 25\%$ ) we wszystkich porównaniach (tabele XI, XII). Współczynnik korelacji Pearsona przyjmował największą wartość ( $r=0,439$ ) dla 40-krotnego powiększenia i wysokiej rozdzielczości skanera oraz dla 10-krotnego powiększenia i średniej rozdzielczości skanera ( $r=0,381$ ), odpowiednio dla wyników z programów *Filtr HSV* i *Image-Pro Premier* (ryc.37). Wartości współczynnika korelacji Spearmana były niższe zarówno dla oprogramowania *Filtr HSV* jak i *Image-Pro Premier* (ryc.38).

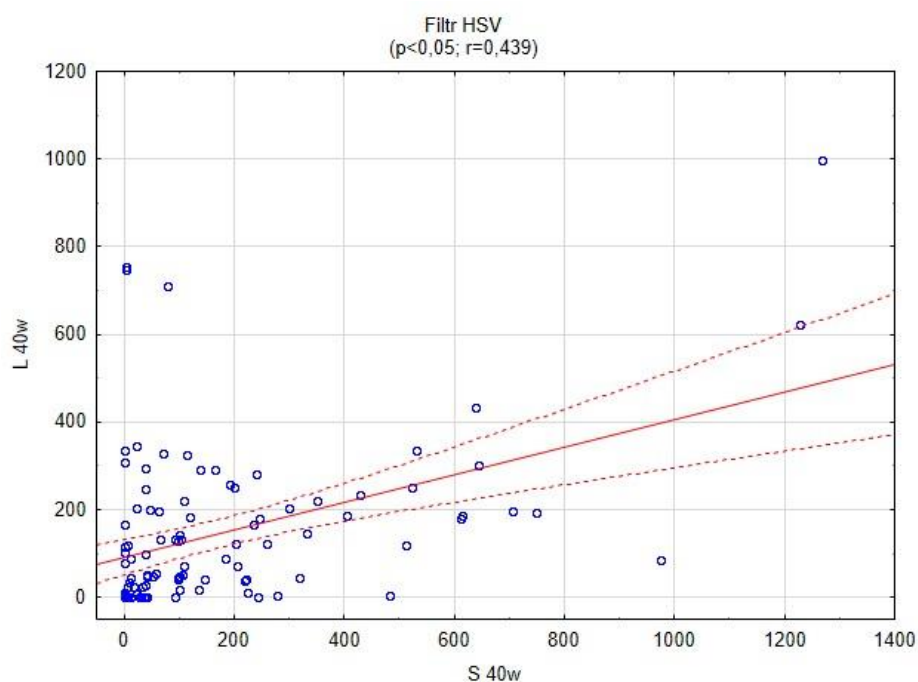


Tab.XI. Wyniki analizy korelacji Pearsona oraz korelacji Spearmana dla wyników otrzymanych programem *Filtr HSV* (korelacje statystycznie istotne, gdy  $p < 0,05$  zaznaczono na kolor czerwony).

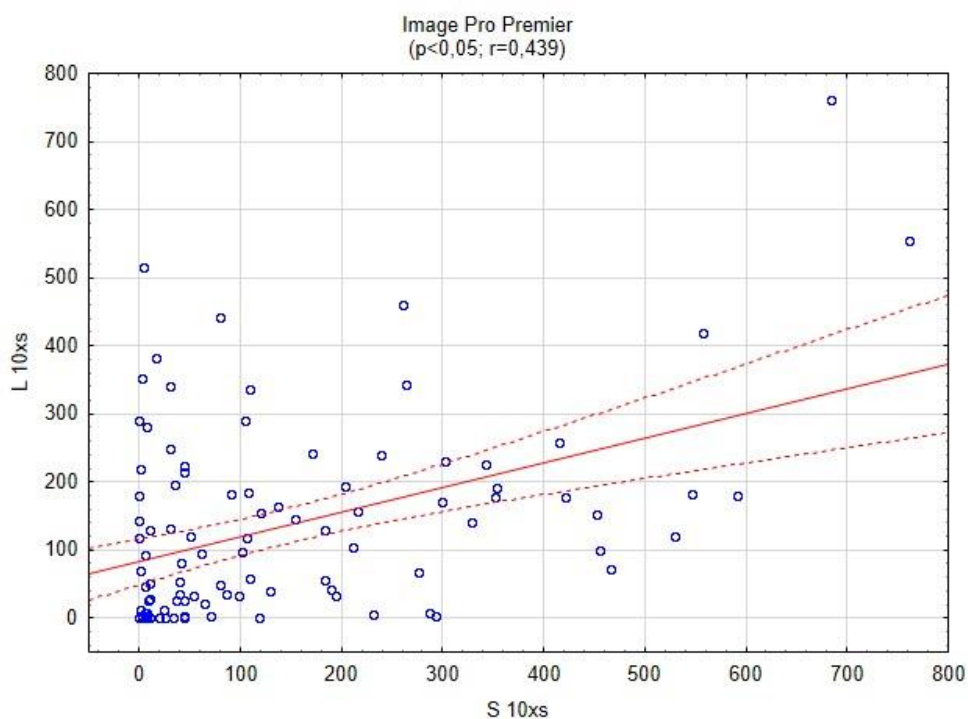
<b>FILTR HSV</b> systematyczne vs. losowe	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik korelacji Spearmana
10s	0,384	0,373
10w	0,394	0,381
20s	0,411	0,379
20w	0,398	0,369
40s	0,436	0,376
40w	0,439	0,392

Tab.XII. Wyniki analizy korelacji Pearsona oraz korelacji Spearmana dla wyników otrzymanych programem *Image-Pro Premier* (korelacje statystycznie istotne gdy  $p < 0,05$  zaznaczono na kolor czerwony).

<b>Image-Pro Premier</b> systematyczne vs. losowe	współczynnik korelacji liniowej	współczynnik korelacji Spearmana
10s	0,439	0,378
10w	0,433	0,370
20s	0,415	0,347
20w	0,421	0,349
40s	0,402	0,345
40w	0,400	0,349



Ryc.37. Wykres korelacji liniowej pomiędzy liczbą jąder komórkowych PCNA+ uzyskanych przy 40-krotnym powiększeniu oraz wysokiej rozdzielczości skanera metodą próbkowania systematycznego (S) i losowego (L) w programie *Filtr HSV*. Współczynnik korelacji równy 0,439;  $p < 0,05$ .



Ryc.38. Wykres korelacji liniowej pomiędzy liczbą jąder komórkowych PCNA+ przy 40-krotnym powiększeniu oraz wysokiej rozdzielczości skanera metodą próbkowania systematycznego (S) a losowego (L) w programie *Image-Pro Premier*. Współczynnik korelacji równy 0,439;  $p < 0,05$ .

Ocena liniowości pomiędzy próbkowaniem systematycznym a próbkowaniem losowym z zachowaniem podziału na użyte oprogramowanie metodą regresji Passinga-Babloka nie wykazała statystycznie istotnych odchyień od liniowości (tabela XIII).

Tab.XIII. Porównanie metod próbkowania (systematyczne vs. losowe) metodą regresji Passinga-Babloka ( $p < 0,05$  statystycznie istotne odchylenia od liniowości).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	odchylenie od liniowości pomiędzy metodami próbkowania (p)
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	0,10
		20x	0,10
		40x	0,06
	Wysokiej rozdzielczości	10x	0,26
		20x	0,17
		40x	0,26
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	0,14
		20x	0,10
		40x	0,38
	Wysokiej rozdzielczości	10x	0,36
		20x	0,16
		40x	0,17

#### IV.4. Ocena współczynnika jądrowego NAF

Współczynnik NAF charakteryzujący jądra komórkowe został obliczony w programie *Image-Pro Premier* dla jąder z immunopozytywną reakcją PCNA (tabela XIV). Wartości średnie i odchylenia standardowe nie różnią się istotnie statystycznie, chociaż wyniki w liczbach bezwzględnych nie różnią się pomiędzy różnymi ustawieniami skanera preparatów.

Tab.XIV. Ocena współczynnika jądrowego NAF jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup>

	ustawienia skanera	średnia ± odch. std.					
		10x s	10x w	20x s	20x w	40xs	40xw
wynik morfometryczny	pole przekroju jądra komórkowego (piksele)	175± 118	184 ±112	169 ± 92	117 ±106	189±125	169 ±83
	współczynnik jądrowy NAF	432 ±391	402 ±284	392 ±269	424 ±331	453±396	384±227

## **Rozdział V. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA**

Dynamiczny rozwój technologii informatycznych w ostatnich kilkunastu latach dokonał przełomu w mikroskopii poprzez rozwój telemikroskopii i technik cyfrowego przetwarzania obrazów (Theodosius i wsp., 2007, Grunkin i wsp., 2011, Prasad i wsp., 2011, Di Cataldo i wsp., 2012, Zieliński, 2012) wprowadzając na rynek między innymi wysokiej jakości kamery cyfrowe, mikroskopy optyczno-cyfrowe, czy skanery preparatów histologicznych.

### **V.1. Rejestracja i próbkowanie preparatów cyfrowych**

Czas rejestracji całych preparatów histologicznych poprzez skanery preparatów zależy w dużym stopniu od wyboru powiększenia i rozdzielczości skanowania. Jest oczywiste, że wysoka rozdzielczość i duże powiększenie skanów zapewnią dokładniejsze wyniki, ale czas skanowania jednego preparatu zależy również od jego wielkości i często trwa wiele godzin (Iregui i wsp., 2007). Z tego powodu postanowiłam sprawdzić, w jakim stopniu szybsza rejestracja preparatów związana z wyborem niższej rozdzielczości i mniejszym powiększeniem skanera wpłynie na istotność statystyczną wyników morfometrycznych. Kolejnym ważnym krokiem jest podjęcie decyzji dotyczącej analizy morfometrycznej całego preparatu cyfrowego lub analizy jego próby reprezentatywnej w postaci wybranych losowo podobrazów. Automatyczne zliczanie struktur morfologicznych oraz ocena ich wielkości w całym preparacie są bardzo czasochłonne, stąd badania morfometryczne i stereologiczne często wykonywane są na podstawie wybranych fragmentów preparatu.

Próbkowanie systematyczne jest złotym standardem w stereologii od wielu lat (Gundersen i Jensen, 1987). W komputerowo wspomaganym mikroskopii świetlnej stosowano odpowiednie siatki do systematycznego wyboru pól widzenia i rejestracji obrazów mikroskopowych wybranych fragmentów ocenianego preparatu. Rejestracja całych preparatów histologicznych przy pomocy skanerów preparatów umożliwia przeprowadzenie systematycznego próbkowania przy dowolnej emulacji powiększenia zapewniającej prawidłowe rozpoznanie struktur morfologicznych. W pracy Kellera i wsp. (2013) każdy preparat cyfrowy był podzielony na sąsiadujące ze sobą pola

widzenia (odpowiadające podobrazom), które próbkowano metodą losowania systematycznego. Analogiczny schemat próbkowania zastosowałam w mojej pracy. W ocenie morfometrycznej włóknienia wątroby na podstawie barwienia czerwienią Syriusza wyniki otrzymane na podstawie próbkowania losowego i systematycznego w obu zastosowanych przeze mnie programach analizy obrazów wykazały nieistotne różnice procentu reakcji niezależnie od wybranej przeze mnie jakości rejestracji preparatów (powiększenie i rozdzielczość skanera).

Chcąc dokładniej zbadać wpływ rozdzielczości skanów na wyniki szacowania procentu reakcji na podobrazach próbkowanych systematycznie oraz losowo stwierdzono korelację między wynikami preparatów skanowanych przy wysokiej rozdzielczości a wynikami tych samych preparatów przy średniej rozdzielczości. Stwierdzono, że w programie *Filtr HSV* różnice między współczynnikami korelacji są niewielkie, rzędu 0,0024 dla próbkowania systematycznego, a dla próbkowania losowego rzędu 0,0045. W programie *Image-Pro Premier* różnice między współczynnikami korelacji są nieco większe, rzędu 0,02 dla próbkowania systematycznego, a dla próbkowania losowego rzędu 0,093. Oznacza to, że program *Image-Pro Premier* nieco lepiej wykrywa szczegóły na obrazach skanów o wyższej rozdzielczości, przy większym powiększeniu, jest to szczególnie widoczne przy powiększeniu 40x. Program *Image-Pro Premier* wykazał też nieco lepszą stabilność wyników próbkowania systematycznego (różnice współczynników korelacji poniżej 2%) niż losowego (różnice współczynników korelacji powyżej 9%). Wyniki próbkowania systematycznego są zgodne w umiarkowanym stopniu z wynikami próbkowania losowego, współczynnik korelacji Spearmana równy w przybliżeniu 0,5 (tabela V i VI). Na tej podstawie można stwierdzić, że rejestracja preparatów o średniej rozdzielczości skanów oraz przy powiększeniu 20x zapewni w sposób optymalny uzyskanie jednorodnych wyników morfometrycznych na podstawie analizy podobrazów losowanych systematycznie (tabela I i II A).

W badaniach Huang i wsp. (2013) rozległość kolagenu mierzona jako procent ekspresji reakcji czerwieni Syriusza u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C wykazała średnią wartość 6,1% i wahała się w granicach od 1,8% do 32,7%. W mojej pracy wyniki pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C oraz z alkoholowym uszkodzeniem wątroby o różnym zaawansowaniu włóknienia były zbliżone i wynosiły średnio  $6,32\% \pm 4,38\%$  przy powiększeniu 20-krotnym i średniej rozdzielczości skanera w programie *Filtr HSV* oraz  $6,08\% \pm 5,07\%$  w programie *Image-*

*Pro Premier.* Zarówno w pracy Huang (2013), jak i w moich badaniach wyniki uzyskane przy powiększeniu 20- i 40-krotnym były bardzo silnie skorelowane, współczynnik korelacji wynosił odpowiednio 0,98 (Huang, 2013) i 0,99 w mojej pracy. Wg Huang wyniki procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza były wyższe, średnio około 2-krotnie niż wyniki procentu reakcji trójbarwnej Massona i dobrze korelowały z oceną METAVIR. W szczególności, reakcja czerwieni Syriusza lepiej wykazuje zmiany o niskiej wartości w skali METAVIR niż reakcja trójbarwna Massona. W moich badaniach stwierdziłam również istotną korelację procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza z oceną METAVIR, natomiast nie badałam reakcji trójbarwnej Massona. Niestety barwienie czerwienią Syriusza nie jest powszechnie stosowane w diagnostyce z powodu braku standaryzacji tej techniki (Huang, 2013).

Ocena rozległości włóknienia na podstawie wartości procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza wyznaczonej na podstawie komputerowej analizy obrazów jest obiektywna i dokładna oraz skorelowana z oceną półilościową w skalach METAVIR, Knodella, czy Ishaka (Abdalla i wsp., 2009). Potwierdziły to także badania Calvaruso i wsp. (2009).

## **V.2. Analiza morfometryczna struktur morfologicznych przy pomocy programów do analizy obrazów**

Liczne techniki ilościowej analizy obrazów mikroskopowych oparte są na określeniu zakresu kolorów RGB typowych dla analizowanego barwienia i wyodrębnieniu struktur morfologicznych przez progowanie w zdefiniowanych zakresach kolorów.

W wielu pracach wykorzystano do analizy struktur morfologicznych popularny program Adobe Photoshop (m.in. Dahab i wsp., 2004, Li i wsp., 2005, Matkowskyj i wsp., 2000, Murakami i wsp., 2011, Sedgewick, 2011, Matsuda i Nishikawa, 2014) lub własne aplikacje zaprogramowane np. w środowisku programu Matlab (Matkowskyj i wsp., 2000, Rexhepaj i wsp., 2008, Wróbel i Koprowski, 2004), ImageJ lub GIMP (Drury i wsp., 2011, Sedgewick, 2011, Konsti i wsp., 2011). Przeprowadzenie analizy ilościowej jedynie na podstawie menu wymienionych programów wiąże się z dużą czasochłonnością pracy, stąd niektórzy autorzy decydują się na opracowanie autorskich



aplikacji lub wykorzystanie bardziej zaawansowanych programów komercyjnych np. Image-Pro Premier, AnalySiS (Digital Imaging Solutions, Olympus), Definiens Tissue Studio (Rojo i wsp., 2009, Lloyd i wsp., 2010), Visiopharm (Vassiliadis, 2011, Brüggmann, 2011, Dhillon i wsp., 2014). Dwa ostatnie wymienione programy nadają się doskonale do analizy całych preparatów cyfrowych.

W mojej pracy, struktury morfologiczne były wyodrębniane na podstawie segmentacji przez progowanie w przestrzeni barw HSV; na przykład segmentacja preparatów barwionych czerwienią Syriusza w przestrzeni RGB wiąże się z ryzykiem przeszacowania rozległości zmian spowodowanych wyodrębnieniem tkanki w odcieniach ciemno- i jasnoczerwonych lub różowych. Problem z automatycznym wykluczeniem kolorów jasnoczerwonych lub różowych jako niereprezentatywnych udało się rozwiązać w analizie obrazów, którą wykonałam w mojej pracy z zastosowaniem programów *Filtr HSV* oraz *Image-Pro Premier*.

Calvaruso i wsp. (2012) analizowali procent ekspresji reakcji Syriusza na całych preparatach cyfrowych z zastosowaniem oprogramowania do analizy obrazów Zeiss KS300. W ich pracy konieczna była ręczna eliminacja artefaktów obrazu oraz interaktywne progowanie, aby wyodrębnić obszary odpowiadające włóknom kolagenowym. W mojej pracy możliwe było ustalenie progów kolorów charakterystycznych dla tej reakcji w sesji treningowej, a następnie automatyczna jej segmentacja przez progowanie w przedziałach ustalonych w sesji uczącej. Wyniki procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza w pracy Calvaruso i wsp. (2012) są prawie dwukrotnie wyższe niż w mojej pracy. Podobnie, przy użyciu tego samego oprogramowania Zeiss KS300 wysokie wartości procentu reakcji z czerwienią Syriusza (od 15 do 31%) uzyskali Hall i wsp. (2012). Wyniki tych autorów uwzględniają jednak nie tylko procent reakcji w kolorze ciemnoczerwonym, lecz także w odcieniach jasnej czerwieni, podczas, gdy w mojej pracy została wyodrębniona jedynie reakcja w odcieniach ciemnej czerwieni z wyłączeniem tkanki w kolorze jasnoczerwonym lub różowym. Wyniki zbliżone do tych uzyskanych w mojej pracy uzyskali natomiast Isgro i wsp. (2013) na podstawie analizy morfometrycznej procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza mierzonej również przy pomocy oprogramowania Zeiss KS300. Wyniki te były skorelowane z wynikami sztywności wątroby (w kPa) uzyskanymi na podstawie badania sonoelastografii impulsowej, podobnie jak w badaniach pilotażowych w mojej pracy.

Ocena immunohistochemiczna preparatów histologicznych jest często wykonywana metodą półilościową przy użyciu różnych skal nasilenia zmian histopatologicznych. W mojej pracy, ocena nasilenia włóknienia została przeprowadzona przez doświadczonego histopatologa z zastosowaniem skali METAVIR. Jednakże ocena wizualna całych preparatów histologicznych jest często subiektywna, stąd korzystne jest wsparcie obiektywną oceną ilościową natężenia ekspresji reakcji na podstawie automatycznej analizy obrazów. Dużym ograniczeniem w obiektywnej ocenie włóknienia wątroby jest niejednorodne występowanie ognisk włóknienia. Z tego powodu długość preparatu powinna wg Bedossy i wsp. (2003) wynosić około 2,5 cm aby zapewnić rzetelną ocenę półilościową oraz automatyczną analizę obrazów. Odpowiednio wybrane i zastosowane oprogramowanie do analizy wirtualnych preparatów cyfrowych pozwala na uzyskanie wyników zgodnych z ocenami doświadczonych histopatologów (Rizzardi i wsp., 2012, Huang i wsp., 2013, Braun i wsp., 2013).

### **V.3. Ocena liczby struktur morfologicznych**

Wyniki automatycznego zliczania struktur morfologicznych z wykorzystaniem programów do analizy obrazów zależą w dużym stopniu od zastosowanej metody segmentacji tych struktur. W programie *Filtr HSV* należy najpierw ustalić założenia wstępne dotyczące rozmiarów wybieranych struktur, średnicy w przypadku struktur kolistych np. jąder komórkowych oraz wartości składowych HSV przestrzeni barw odpowiadających badanej reakcji. W programie *Image-Pro Premier* jądra komórkowe z dodatnią reakcją były rozpoznawane na podstawie zakresu kolorów charakterystycznych dla tej reakcji, a nakładające się na siebie struktury były rozdzielane na podstawie segmentacji metodą działów wodnych. Wyniki liczby jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup>, które uzyskałam z programu *Filtr HSV* różnią się istotnie od wyników otrzymanych z programu *Image-Pro Premier*. Oznacza to, że wielkość jąder komórkowych oraz ich kształt jest na tyle różnorodna, że przyjęte na wstępie założenie dotyczyło niejednokrotnie mniejszych rozmiarów i w kształcie różniącym się od kulistego, niż były w rzeczywistości, stąd przeszacowana została liczba jąder komórkowych. Należało by zamiast metody automatycznej zastosować metodę półautomatyczną i interaktywnie zmieniać parametr dotyczący ich wielkości. To

rozwiązanie zwiększa jednak czas niezbędny do przeprowadzenia analizy morfometrycznej. Zastosowana w programie *Image-Pro Premier* segmentacja metodą działów wodnych spowodowała rozdzielanie nakładających się na siebie jąder komórkowych w sposób prawidłowy. W badaniach nowotworów jelita grubego Quasim i wsp. (2012) oszacowali przy pomocy programu Digimizer (Quasim i wsp., 2011) średnią liczbę jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup>, która wynosiła 145.03. W moich badaniach średnia liczba jąder PCNA<sup>+</sup> wyznaczona w programie *Image-Pro Premier* była równa 145,43, podczas gdy w programie *Filtr HSV* ich średnią liczbę oszacowano jako równą 180.

Automatyczne zliczanie jąder komórkowych często przysparza trudności z ich poprawnym wyodrębnieniem przy pomocy oprogramowania do analizy obrazów (Brey i wsp., 2003), stąd nadal spotyka się prace, w których określa się wyniki ekspresji reakcji w kategoriach: pozytywna/negatywna. Preparaty, w których liczba jąder PCNA<sup>+</sup> nie przekraczała 5% przyjęto jako brak ekspresji (Han i wsp., 2012).

Dodatkową miarą jąder komórkowych dostępną w programie *Image-Pro Premier* lub ImageJ jest współczynnik jądrowy NAF (ang. *nuclear area fraction*). Współczynnik ten jest interpretowany jako miara apoptozy. Proces apoptozy jest złożony i przebiega wieloetapowo. Odwodnienie cytoplazmy prowadzi do jej zagęszczenia, a w konsekwencji do zmiany kształtu i wielkości komórki. Chromatyna staje się skondensowana i przybiera kształt półksiężycowaty. Im wyższa wartość współczynnika NAF od pola przekroju jądra, tym bardziej jego kształt różni się od kulistego, w procesie apoptozy jest wydłużony. Aby określić stan i czas trwania procesu apoptozy, nie wystarczy jednak wyznaczyć wartość współczynnika NAF (DeCoster, 2007), potrzebne są inne dodatkowe testy. W mojej pracy wartości tego współczynnika są znacznie wyższe od pola przekroju jąder komórkowych, co oznacza ich wydłużony kształt. Niestety nie znalazłam prac zawierających wyniki oceny kształtu jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup> w badaniach dotyczących nowotworów jelita grubego.

#### **V.4. Standardy cyfrowych obrazów histologicznych**

Analiza cyfrowych preparatów histologicznych powinna opierać się na standaryzowanych metodach (Kayser i wsp., 2009). Standaryzacja obrazów polega na wyborze obrazów optymalnej jakości. Należy więc dokonać wyboru powiększenia i rozdzielczości skanowania preparatów. Następnie powinna być wykonana wstępna

selekcja obrazów całych preparatów cyfrowych, których jakość pozwoli na poprawne rozpoznanie komputerowe i segmentację struktur morfologicznych będących przedmiotem badań, wykonanie pomiarów morfometrycznych, klasyfikację stopnia nasilenia zmian i postawienie diagnozy. Kolejnym ważnym krokiem jest wybór metody próbkowania preparatów cyfrowych oraz ustalenie medycznych i technologicznych standardów obrazów, które należy wziąć pod uwagę w diagnostyce opartej na materiale patomorfologicznym?

Jest to trudne zadanie, szczególnie, gdy diagnoza nie została jeszcze postawiona. W przypadkach dotyczących diagnostyki chorób często występujących i łatwiej rozpoznawalnych cechach patomorfologicznych, nie jest konieczna rejestracja obrazów przy dużym powiększeniu i wysokiej rozdzielczości skanera, wystarcza średnia rozdzielczość i mniejsze powiększenie (Kayser i wsp., 2008a). Potwierdza to również wyniki mojej pracy. Ogger i wsp. (2008) opracowali system komputerowo wspomaganą diagnozy histopatologicznej dla całych preparatów cyfrowych skanowanych w niskiej rozdzielczości, jak również dla próbkowanych podobrazów preparatów wirtualnych wysokiej rozdzielczości. Dostępne dziś przeglądarki preparatów wirtualnych umożliwiają emulację obrazów dobrej jakości nawet, jeśli nie wybrano najwyższej rozdzielczości skanera do rejestracji preparatów histologicznych. Niemniej jednak diagnostykę chorób rzadko występujących lepiej przeprowadzić na podstawie preparatów skanowanych przy dużym powiększeniu i wysokiej rozdzielczości ze względu na możliwość wykrycia nietypowych zmian w tkance (Kayser i wsp., 2008).

Jak mierzyć jakość obrazów? Przy jakiej jakości obrazów można prowadzić w pełni automatyczną analizę obrazów, kiedy należy monitorować automatyczną analizę morfometryczną, a kiedy należy przejść do analizy interaktywnej i dokonać korekty przyjętych wcześniej kryteriów segmentacji?

Wybór odpowiednich pól widzenia (podobrazów), które z jednej strony będą zgodne z założeniami próbkowania obrazów, a z drugiej będą mieć wartość diagnostyczną to kolejne zadanie, które należy rozwiązać przed rozpoczęciem analizy morfometrycznej (Fasquel i wsp., 2006, Kayser i wsp., 2008b, Kayser i wsp., 2008c, Sertel i wsp., 2009).

Kayser i wsp. (2008) proponują następujące kryteria w celu ustalenia standardów dla preparatów wirtualnych:

1. Cechy obrazu istotne przy wspomaganiu diagnozy:

- 1.1. analizowane struktury powinny być wielkości powyżej 50 pikseli;
- 1.2. wielkość preparatu powinna zapewnić możliwość wyodrębnienia co najmniej 40 obiektów (w zależności od ich wielkości);
- 1.3. minimalna wielkość podobrazu próbkowanego z preparatu powinna być równa przynajmniej 256 x 256 pikseli.
2. Miary jakości obrazów w odcieniach szarości:
  - 2.1. ustalenie odchylenia odcieni szarości (zakres minimalnej i maksymalnej wartości odcieni szarości);
  - 2.2. ustalenie wartości gradientu odcieni szarości.
3. Standardy modeli barw obrazów kolorowych:
  - 3.1. klasyczny: model RGB;
  - 3.2. preferowany: model HSV.

Bueno i wsp. (2013) przeprowadzili badania porównawcze pomiędzy różnymi modelami barw (RGB, HSI, CMYK, CIEL\*a\*b\* oraz HSV) stosowanych w analizie bardzo dużych obrazów mikroskopowych preparatów histologicznych. Takie porównania pozwalają wybrać najlepszy model kolorów dla określonego barwienia preparatu oraz rodzaju tkanki badanej w celu osiągnięcia wiarygodnych wyników przetwarzania i analizy obrazów morfologicznych (Wyszecki i Stiles, 2000). Model przestrzeni barw powinien być brany pod uwagę przy definiowaniu standardów dla obrazów histologicznych. W przeprowadzonych przez tych autorów badaniach biopłatów prostaty barwionych HE najlepszym okazał się model CIEL\*a\*b\*, który był najbardziej zbliżony do kolorów oryginalnych preparatów histologicznych.

W moich badaniach wyniki uzyskane w modelu HSV (odpowiednik HSI) były lepsze niż w modelu RGB, co jest zgodne z sugestiami Kaysera i wsp. (2008a). Nie badałam natomiast innych modeli barw wskazanych przez Bueno i wsp. (2013).

Podsumowując, wiele czynników może mieć istotny wpływ na wyniki statystycznej analizy obrazów oraz efekty komputerowego wspomaganie diagnozy, począwszy od jakości preparatów histologicznych, powiększenia i rozdzielczości obrazów, metody próbkowania podobrazów preparatów do analizy morfometrycznej, zorientowanej obiektowo segmentacji struktur, z ewentualnym uwzględnieniem cech statystycznych utkania obiektów (Fukunaga, 1990) aż po standardy obrazów.

Kontynuacja prac w kierunku standaryzacji analizy obrazów morfologicznych jest nadal przedmiotem badań (Kayser i Kayser, 2013).

## Rozdział VI. WNIOSKI

1. W diagnostyce histopatologicznej skanowanie preparatów przy powiększeniu 20-krotnym i średniej rozdzielczości jest optymalne do wykonania analizy morfometrycznej na podstawie podobrazów losowanych systematycznie (o ile nie dotyczy diagnostyki chorób rzadkich).
2. Wyniki morfometryczne analizy preparatów wirtualnych zależą w mniejszym stopniu od wyboru powiększenia i rozdzielczości skanowania niż schematu ich próbkowania oraz jakości przygotowania preparatów histologicznych.
3. Zobiektywizowana ocena morfometryczna oparta na komputerowej analizie obrazów jest szybsza i niezależna od czynników ludzkich stwarzających ryzyko błędu np. z powodu zmęczenia.
4. Standaryzacja technik opracowania preparatów histologicznych ma zasadniczy wpływ na jakość oceny morfometrycznej.
5. Standaryzacja obrazów mikroskopowych pozwoli na obiektywną analizę porównawczą wyników morfometrycznych preparatów wirtualnych z różnych ośrodków diagnostycznych.

Wnioski szczegółowe dotyczące aplikacji pracy:

6. Zobiektywizowana ocena rozległości włóknienia w śródmiąszu wątroby na podstawie procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza wyznaczonej na podstawie komputerowej analizy obrazów jest skorelowana z oceną półilościową wykonaną przez doświadczonego histopatologa.
7. Wyniki automatycznej oceny liczby jąder komórkowych immunopozytywnych w przypadkach nowotworów jelita grubego zależą od zastosowanej metody ich segmentacji.

## STRESZCZENIE

Dynamiczny rozwój technologii informatycznych umożliwia obecnie rejestrację całych preparatów histologicznych przy pomocy skanerów preparatów. Proces rejestracji zależy w dużej mierze od wyboru ustawień skanera, tj. powiększenia i rozdzielczości. Przypuszcza się, że istotny wpływ na ocenę morfometryczną wirtualnych preparatów mogą mieć właśnie ustawienia skanera oraz schemat próbkowania preparatu cyfrowego. W związku z powyższym, głównym celem pracy doktorskiej było ustalenie optymalnej metodyki skanowania preparatów histologicznych oraz dokonanie statystycznej oceny wpływu wybranej metody próbkowania cyfrowych preparatów na wynik pomiaru morfometrycznego.

Cele szczegółowe pracy obejmują:

1. ustalenie optymalnej metodyki skanowania preparatów histologicznych;
2. statystyczna ocena wpływu metody próbkowania cyfrowych preparatów, powiększenia i rozdzielczości skanów na wyniki pomiaru morfometrycznego uzyskane przy zastosowaniu dwóch różnych metod komputerowego rozpoznania reakcji histo- i immunohistochemicznej;
3. Aplikacja: ocena ilościowa reakcji histochemicznej na przykładzie analizy skanów preparatów barwionych czerwieńią Syriusza w ocenie włóknienia śródmiąższu wątroby. Materiałem badawczym do oceny ilościowej reakcji histochemicznej były preparaty mikroskopowe z bloczków parafinowych biopłatów z wykładnikami włóknienia w przypadkach alkoholowego przewlekłego zapalenia wątroby. W obrębie preparatów z reakcją histochemiczną czerwień Syriusza wyznaczano pole powierzchni reakcji, a następnie obliczono procentowy udział włóknienia, który odniesiono do powierzchni całkowitej badanej tkanki. Dodatkowo morfometryczna analiza włóknienia wątroby została poprzedzona badaniem na grupie chorych objętych wcześniejszymi badaniami sonoelastograficznymi i histopatologicznymi.
4. Aplikacja: ocena ilościowej liczby struktur na przykładzie analizy liczby i wielkości jąder komórkowych. Materiał do oceny liczby struktur stanowiły skrawki parafinowe z nowotworem jelita grubego z pozytywną reakcją



immunohistochemiczną PCNA. Na preparatach cyfrowych z materiału jelita grubego, wykonano zliczenia jąder komórkowych z reakcją PCNA<sup>+</sup> oraz oceniono ich wielkość i współczynnik jądrowy NAF.

Wszystkie preparaty były rejestrowane przy różnych powiększeniach skanera (10x, 20x, 40x) oraz przy średniej, a następnie przy wysokiej rozdzielczości skanera. Następnie preparaty cyfrowe były próbkowane dwoma metodami: próbkowanie losowe proste i próbkowanie losowe systematyczne. Uzyskane podobrazy preparatów cyfrowych poddano ocenie morfometrycznej korzystając z dwóch programów do analizy ilościowej obrazów mikroskopowych: *Filtr HSV* oraz *Image-Pro Premier*.

W obu aplikacjach analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między wynikami otrzymanymi w dwóch różnych metodach próbkowania (uwzględniając użyte oprogramowanie), natomiast stwierdzono statystycznie istotne korelacje pomiędzy wynikami rejestrowanymi przy średniej oraz wysokiej rozdzielczości skanera. Oceniono także homogeniczność grup ze względu na wybraną rozdzielczość skanera w obu aplikacjach oraz przy użyciu programów *Filtr HSV* i *Image-Pro Premier*. Otrzymano wysokie wartości współczynnika zgodności Cronbacha, które potwierdzają jednorodność wyników.

Metodą Blanda-Altmana zweryfikowano zgodność pomiarów procentu włóknienia śródmiąższu wątroby oraz liczby jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup> pomiędzy programami.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- W diagnostyce histopatologicznej skanowanie preparatów przy powiększeniu 20-krotnym i średniej rozdzielczości jest optymalne do wykonania analizy morfometrycznej na podstawie podobrazów losowanych systematycznie (o ile nie dotyczy diagnostyki chorób rzadkich).
- Wyniki morfometryczne analizy preparatów wirtualnych zależą w mniejszym stopniu od wyboru powiększenia i rozdzielczości skanowania niż schematu ich próbkowania oraz jakości przygotowania preparatów histologicznych.
- Zobiektywizowana ocena morfometryczna oparta na komputerowej analizie obrazów jest szybsza i niezależna od czynników ludzkich stwarzających ryzyko błędu np. z powodu zmęczenia.
- Standaryzacja technik opracowania preparatów histologicznych ma zasadniczy wpływ na jakość oceny morfometrycznej.

- Standaryzacja obrazów mikroskopowych pozwoli na obiektywną analizę porównawczą wyników morfometrycznych preparatów wirtualnych z różnych ośrodków diagnostycznych.
- Zobiektywizowana ocena rozległości włóknienia w śródmięszu wątroby na podstawie procentu ekspresji reakcji czerwieni Syriusza wyznaczonej na podstawie komputerowej analizy obrazów jest skorelowana z oceną półilościową wykonaną przez doświadczonego histopatologa.
- Wyniki automatycznej oceny liczby jąder komórkowych immunopozytywnych w przypadkach nowotworów jelita grubego zależą od zastosowanej metody ich segmentacji.

# **STATISTICAL ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL IMAGES AND CAPABILITIES OF ITS APPLICATIONS FOR VIRTUAL MICROSCOPY**

## **SUMMARY**

Nowadays, a development of computer technologies allows for a registration of histological specimens by using whole slide scanners. The registration process, in large part, depends on the choice of scanner settings (magnification and resolution). Presumably, the scanner settings and specimen sampling methods should have a significant impact on morphometric results of virtual slides. In this connection, the main purpose of my study was to determine optimal settings for whole histological slide scanning and to examine an influence of sampling methods of virtual slides on morphometric results.

Specific aims included:

1. elaboration of optimal methods for whole slides scanning;
2. statistical evaluation of scanner settings and sampling methods for morphometric results derived from two image analysis programs for extraction and measurements of histo- and immunohistochemical reaction;
3. Application: quantitative analysis of histochemical reaction on the example of evaluation of hepatic fibrosis. The material consisted of histological specimens from patients with chronic alcoholic hepatitis who had liver biopsy. The morphometric analysis of liver fibrosis was carried out on the basis of area fraction of Sirius red reaction. The reaction area was determined and then, a percent of fibrosis was related to the examined tissue area. In addition, the morphometric assessment of liver fibrosis was preceded by earlier sonoelastographic and histopathological examinations.
4. Application: counts of structures on the example of quantitative evaluation of PCNA positive cell nuclei observed in histological specimens from patients with colorectal carcinomas.

All specimens were registered at different scanner magnifications (10x, 20x, 40x) at medium and then high scanner resolutions. Subsequently, random sampling and systematic sampling of digital slides were performed. Sampled sub-images of virtual

slides were then subjects of morphometric analysis by using two image analysis programs: *Filtr HSV* and *Image-Pro Premier*.

No significant differences were found between morphometric results obtained from subimages sampled randomly and systematically in both applications and analyzed in both programs. However, significant correlations were found between results registered at medium and high scanner resolution.

Homogeneity of groups due to scanner resolution was found on the basis of high values of Cronbach's coefficient. Bland-Altman analysis was performed to evaluate an agreement between morphometric results (area fraction of Sirius red reaction in liver fibrosis and number of PCNA<sup>+</sup> cell nuclei) derived from *Filtr HSV* and *Image-Pro Premier* programs.

The studies allowed to conclude:

- Registration of histological specimens by using whole slide scanners at 20x magnification and medium resolution is optimal for morphometric analysis based on sub-images systematically sampled (not applicable for diagnosis of rare diseases);
- Results of morphometric analysis of virtual slides depend less on scanner settings (magnification and resolution) than sampling scheme and quality of histological preparations;
- Objective morphometric evaluation based on computer image analysis is faster and independent on human factors (for instance tiredness ) causing a risk of errors;
- Standardization of techniques for preparation of histological specimens has a significant impact on the quality of morphometric evaluation;
- Standardization of microscopic images allow for an objective comparative analysis of morphometric results of virtual slides from different diagnostic centers;
- Objective assessment of an extent of liver fibrosis on the basis Sirius red area fraction is correlated with semi quantitative evaluation by an experienced histopathologist;
- Results of the automatic estimation of the number of immunopositive cell nuclei depend on the segmentation method as was shown on the example of PCNA<sup>+</sup> cell nuclei in colorectal carcinomas.

## PIŚMIENNICTWO

1. **Abdalla A.F., Zalata K.R., Ismail A.F., Shiha G., Attiya M., Abo-Alyazeed A.:** Regression of fibrosis in paediatric autoimmune hepatitis: morphometric assessment of fibrosis versus semiquantitative methods. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2009;2:2.
2. Aita J.S., Harrison S.A.: Liver biopsy versus noninvasive testing in chronic hepatitis C: Where do we stand in 2008?; *Hep C: Current and Future Therapy* 2008; 7: 51-59.
3. Amin A., Mahmoud-Ghoneim D.: Texture analysis of liver fibrosis microscopic images: a study on the effect of biomarkers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011;43(3):193-203.
4. Bataller R., Brenner D.A.: Liver Fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):209-18.
5. Bedossa P., Poynard T.: An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24(2):289-93.
6. Bedossa P., Dargère D., Paradis V.: Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38(6):1449-57.
7. Bland J.M., Altman D.G.: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurements. *Lancet* 1986;307–310.
8. Bland J.M., Altman D.G.: Statistics notes: Cronbach's alpha, *BMJ.* 1997; 314:572–573.
9. Boeker K.H., Haberkorn C.I., Michels D., Flemming P., Manns M.P., Lichtinghagen R.: Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clinica Chimica Acta,* 2002;316:71–81.
10. Braun M., Kirsten R., Rupp N.J., Moch H., Fend F., Wernert N., Kristiansen G., Perner S.: Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system. *Histol Histopathol.* 2013;28(5):605-10.
11. Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick CW Jr.: Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem.* 2003 51(5):575-84.

12. Brüggmann A., Eld M., Lelkaitis G., Nielsen S., Grunkin M., Hansen J.D., Foged N.T., Vyberg M.: Digital image analysis of membrane connectivity is a robust measure of HER2 immunostains. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(1):41-9.
13. Bueno G., Deniz O., Salido J., Fernandez M.M., Vallez N., Garcia-Rojo M.: *Colour Model Analysis for Histopathology Image Processing*. W: *Color Medical Image Analysis*. Celebi M.E. I Schaefer G. (red.), Springer London, Heidelberg, New York, 2013.
14. Calvaruso V., Burroughs A.K., Standish R., Manousou P., Grillo F., Leandro G., Maimone S., Pleguezuelo M., Xirouchakis I., Guerrini G.P., Patch D., Yu D., O'Beirne J., Dhillon A.P.: Computer-assisted image analysis of liver collagen: relationship to Ishak scoring and hepatic venous pressure gradient. *Hepatology.* 2009;49(4):1236-44.
15. Calvaruso V., Dhillon A.P., Tsochatzis E., Manousou P., Grillo F., Germani G., Patch D., O'Beirne J., Burroughs A.K.: Liver collagen proportionate area predicts decompensation in patients with recurrent hepatitis C virus cirrhosis after liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(7):1227-32.
16. Castleman K.R.: Concepts in imaging and microscopy: color image processing for microscopy. *Biol Bull* 1998; 194(2):100.
17. Chmielewski M., Łykowska-Szuber L., Roszyk E., Linke K., Kaczmarek E., Jagielska J.: Sonoelastografia - nowa metoda oceny włóknienia w alkoholowym uszkodzeniu wątroby - badanie pilotażowe. *Gastroenterologia Polska* 2009; 16(1): 17-21.
18. Coleman R.: Can histology and pathology be taught without microscopes? The advantages and disadvantages of virtual histology. *Acta Histochem.* 2009;111(1):1-4.
19. Coster M., Chermant J.L.: *Precis D'Analyse D'Images*. Presses du CNRS Paris, 1989.
20. Cronbach L.J., Coefficient alpha and the internal structure of tests, *Psychometrika* 1951; 16(3), 297-334.
21. Dahab G.M., Kheriza M.M., El-Beltagi H.M., Fouda A.M., El-Din O.A.: Digital quantification of fibrosis in liver biopsy sections: description of a new method by Photoshop software. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19(1):78-85.

22. DeCoster M.A.: The Nuclear Area Factor (NAF): a measure for cell apoptosis using microscopy and image analysis. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. Mendez-Vilas A, Diaz J (editors). Formatex; 2007;378-384.
23. Dee F.R.: Virtual microscopy for comparative pathology. *Toxical Pathol* 2006;34: 966-967.
24. Dee F.R.: Virtual microscopy in pathology education. *Hum Pathol* 2009;40: 1112-1121.
25. Dhillon R.S., Zhang L., Schwarz E.M., Boyce B.F., Xie C.: The murine femoral bone graft model and a semiautomated histomorphometric analysis tool. *Methods Mol Biol*. 2014;1130:45-59.
26. Di Cataldo S., Ficarra E., Macii E.: Computer-aided techniques for chromogenic immunohistochemistry: Status and directions. *Comput Biol Med*. 2012;42(10):1012-25.
27. Digital Atlas of Breast Histopathology [www.webmicroscope.net](http://www.webmicroscope.net)
28. Drury J.A., Nik H., van Oppenraaij R.H., Tang A.W., Turner M.A., Quenby S.: Endometrial cell counts in recurrent miscarriage: a comparison of counting methods. *Histopathology*. 2011 Dec;59(6):1156-62.
29. Dryla P., Wojtuń S., Gil J., Jałocha Ł., Kosik K., Błaszak A., Wojtkowiak M.: Znaczenie elastografii ultrasonograficznej w rozpoznawaniu patologii przewodu pokarmowego. *Pol Merkuriusz Lek* 2009; 155: 536-8.
30. Fasquel J-B, Agnus V., Moreau J, Sole L, Marescaux J.: An interactive medical image segmentation system based on the optimal management of regions of interest using topological medical knowledge. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 2006, 82, 216-230.
31. Feit J., Matyska L., Ulman V., Hejtmánek L., Jedličková H., Ježová M., Moulis M. and Feitová V.: Virtual microscope interface to high resolution histological images. *Diagn Pathol* 2008; 3: S10.
32. Filipiak K. Malińska A., Nowicki M., Krupa D., Zabel M.: Innowacyjne metody archiwizacji, prezentacji i udostępniania preparatów histologicznych na przykładzie funkcjonowania Centrum Archiwizacji Obrazów Morfologicznych i Cyfrowej Bazy Danych obrazów mikroskopowych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. *Postępy Biologii Komórki* 2011; 38 (3):475-489.

33. Fónyad L., Gerely L., Cserneky M., Molnár B., Matolcsy A. : Shifting gears higher - digital slides in graduate education - 4 years experience at Semmelweis University. *Diagn Pathol* 2010; 5:73-81.
34. Frulio N., H. Trillaud H.: Ultrasound elastography in liver. *Diagnostic and Interventional Imaging* 2013; 94 (5),515—534.
35. Fukumaga K.: Introduction to statistical pattern recognition. Morgan Kauffmann, San Diego, 1990.
36. Gabriel A., Kukla M., Wilk M., Liszka Ł., Petelenz M., Musialik J.: Angiogenesis in chronic hepatitis C is associated with inflammatory activity grade and fibrosis stage. *Pathol Res Pract.* 2009;205(11):758-64.
37. Gabriel A.: Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Hepatologów dotyczące pobierania i oceny histopatologicznej biopsji wątroby w ocenie przewlekłych zapaleń. 2012; doi: <http://www.paspl.pl>
38. Gabril M.Y., Yousef G.M.: Informatics for practicing anatomical pathologists: marking a new era in pathology practice. *Mod Pathol* 2010; 23: 349-358.
39. Gang Xu: Estimating sample size for a descriptive study in quantitative research. *Quik`s Marketing Research Review.* 1999; doi: <http://www.quirks.com>
40. Gang Xu: Estimating sample size for an analytic study in quantitative marketing research. *Quik`s Marketing Research Review.* 1999; doi: <http://www.quirks.co>
41. Ganne-Carrie N., Ziol M., de Ledinghen V., Douvin C., Marcellin P., Castera L., Dhumeaux D., Trinchet J.C., Beaugrand M.: Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases. *Hepatology.* 2006;44(6):1511-7.
42. Giansanti D., Grigioni M., D`Avenio G., Morelli S., Maccioni G., Bondia, Giovagnoli MR.: Virtual microscopy and digital cytology: state of the art. *Ann Ist Sanita* 2010; 46: 115-122.
43. Gierbliński I.: Sonoelastografia- nieinwazyjna metoda oceny włóknienia wątroby. *Ultrasonografia* 2007; 31: 90-93.
44. Goldberg H.R., Dintzis R.: The positive impact of team-based virtual microscopy on student learning in physiology and histology. *Am J Physiol* 2007; 31: 261-265.
45. Grunkin M., Raundahl J., Foged N.T.: Practical considerations of image analysis and quantification of signal transduction IHC staining. *Methods Mol Biol.* 2011;717:143-54.



46. Guarino M., Tosoni A., Nebuloni M.: Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchylam transition. *Human Pathology* 2009; 40: 1365–76.
47. Gundersen, H.J., Jensen, E.B.: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 1987 Sep;147(Pt 3):229-63.
48. Hall A., Germani G., Isgro G., Burroughs AK, Dhillon AP: Fibrosis distribution in explanted cirrhotic livers. *Histopathology* 2012; 60:270–277.
49. Hamilton P.W., Wang Y., McCullough S.J.: Virtual microscopy and digital pathology in training and education. *APMIS.* 2012 Apr;120(4):305-15.
50. Han D.P., Zhu Q.L., Cui J.T., Wang P.X., Qu S., Cao Q.F., Zong Y.P., Feng B., Zheng M.H., Lu A.G.: Polo-like kinase 1 is overexpressed in colorectal cancer and participates in the migration and invasion of colorectal cancer cells. *Med Sci Monit.* 2012;18(6):BR237-46.
51. Helak-Lapaj C.: Metody analizy komputerowej ekspresji reakcji immunohistochemicznej i histochemicznej oraz ocean struktur w badaniach mikroskopowych. Rozprawa doktorska, UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2012.
52. Hitchcock C.: The Future of Telepathology for the Developing World. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135: 211-214.
53. Hsu S.M., Raine L., Fanger H.: The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* 1981 Jun;75(6):816-21.
54. Huang Y., de Boer W.B., Adams L.A., MacQuillan G., Rossi E., Rigby P., Raftopoulos S.C., Bulsara M., Jeffrey G.P.: Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver Int.* 2013;33(8):1249-56.
55. Iregui M., Gómez F., Romero E.: Strategies for efficient virtual microscopy in pathological samples using JPEG2000. *Micron.* 2007;38(7):700-13.
56. Isgro G., Calvaruso V., Andreana L., Luong T.V., Garcovich M., Manousou P., Alibrandi A., Maimone S., Marelli L., Davies N., Patch D., Dhillon A.P., Burroughs A.K.: The relationship between transient elastography and histological collagen proportionate area for assessing fibrosis in chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol.* 2013;48(8):921-9.

57. Kayser K., Görtler J., Goldmann T., Vollmer E., Hufnagl P., Kayser G.: Image standards in tissue-based diagnosis (diagnostic surgical pathology). *Diagn Pathol.* 2008;18;3:17. **a**
58. Kayser K., Görtler J., Metze K., Goldmann T., Vollmer E., Mireskandari M., Kosjerina Z., Kayser G.: How to measure image quality in tissue-based diagnosis (diagnostic surgical pathology). *Diagn Pathol.* 2008; 15;3 Suppl 1:S11-S14. **b**
59. Kayser K., Hoshang S.A., Metze K., Goldmann T., Vollmer E., Radziszowski D., Kosjerina Z., Mireskandari M., Kayser G.: Texture- and object-related automated information analysis in histological still images of various organs. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008;30(6):323-35. **c**
60. Kayser K., Schultz H., Goldmann T., Görtler J., Kayser G., Vollmer E.: Theory of sampling and its application in tissue based diagnosis. *Diagn Pathol.* 2009;16;4:6.
61. Kayser G., Kayser K.: Quantitative pathology in virtual microscopy: history, applications, perspectives. *Acta Histochem.* 2013;115(6):527-32.
62. Kato K., Sugimoto H, Kanazumi N, Nomoto S, Takeda S, Nakao A.: Intra-operative application of real-time tissue elastography for the diagnosis of liver tumours. *Liver Int.* 2008;28(9):1264-71.
63. Keller K.K., Andersen I.T., Andersen J.B., Hahn U., Stengaard-Pedersen K., Hauge E.-M., Nyengaard J.R.: Improving efficiency in stereology: a study applying the proportionator and the autodisector on virtual slides. *J Microsc.* 2013;251(1):68-76.
64. Knodell R.G., Ishak K., Black W.C., Chen T.S., Craig R., Kaplowitz N., Kiernan T.W., Wollman J.: Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology.* 1981;1(5):431-5.
65. Konsti J., Lundin M., Joensuu H., Lehtimäki T., Sihto H., Holli K., Turpeenniemi-Hujanen T., Kataja V., Sailas L., Isola J., Lundin J.: Development and evaluation of a virtual microscopy application for automated assessment of Ki-67 expression in breast cancer. *BMC Clin Pathol.* 2011; 25;11:3.
66. Li J.W., Chuang T.C., Yang A.H., Hsu C.K., Kao M.C.: Clinicopathological relevance of HER2/neu and a related gene-protein cubic regression correlation in colorectal adenocarcinomas in Taiwan. *Int J Oncol.* 2005;26(4):933-43.

67. Lloyd M.C., Allam-Nandyala P., Purohit C.N., Burke N., Coppola D., Bui M.M.: Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it? *J Pathol Inform.* 2010; 23;1:29.
68. Lundin M., Szymas J., Linder E., Beck H., de Wilde P., Van Krieken H., García Rojo M., Moreno I., Ariza A., Tuzlali S., Dervişoğlu S., Helin H., Lehto VP, Lundin J.: A European network for virtual microscopy—design, implementation and evaluation of performance. *Virchows Arch* 2009;454: 421-429.
69. Marchevsky A.M., Khurana R., Premi T., Scharre K., Farias P., Bose S.: The Use of Virtual Microscopy for Proficiency Testing in Gynecologic Cytopathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130: 349-355.
70. Masuda A., Nishikawa T.: Distribution of dendritic cells expressing dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN, CD209): Morphological analysis using a novel Photoshop-aided multiple immunohistochemistry technique. *Histol Histopathol.* 2014 (publikacja elektroniczna przed drukiem).
71. Matkowskyj K.A., Schonfeld D., Benya R.V.: Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength using commercially available software Photoshop and Matlab. *J Histochem Cytochem.* 2000;48(2):303-12.
72. Merk M., Knuechel R., Perez-Bouza A.: Web-based virtual microscopy at the RWTH Aachen University: Didactic concept, methods and analysis of acceptance by the students. *Anat Anz* 2010;192: 383-387.
73. Murakami I., Oka T., Kuwamoto S., Kato M., Hayashi K., Gogusev J., Imamura T., Morimoto A., Imashuku S., Yoshino T.: Tyrosine phosphatase SHP-1 is expressed higher in multisystem than in single-system Langerhans cell histiocytosis by immunohistochemistry. *Virchows Arch.* 2011;459(2):227-34.
74. Nielsen P.S., Lindebjerg J., Rasmussen J., Starklint H., Waldstrøm M., Nielsen B.: Virtual microscopy: an evaluation of its validity and diagnostic performance in routine histologic diagnosis of skin tumors. *Human Pathol* 2010; 41: 1770-1776.

75. Ogger M., Belhomme P., Klossa J., Michels J-J., Elmoataz A.: Automated region of interest retrieval and classification using spectra analysis. *Diagnostic Pathology* 3 (Suppl I) 2008, S17-21.
76. Qasim B.J., Ali H.H., Hussein A.G.: Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in human colorectal adenoma and carcinoma using specified automated cellular image analysis system: a clinicopathological study. *Oman Med J.* 2011;26(5):307-14.
77. Qasim B.J., Ali H.H., Hussein A.G.: Immunohistochemical Expression of PCNA and CD34 in Colorectal Adenomas and Carcinomas Using Specified Automated Cellular Image Analysis System: A Clinicopathologic Study. *Saudi J Gastroenterol.* 2012;18(4):268-76.
78. Passing H., Bablok W.: A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
79. Paulsen F.P., Eichhorn M., Bräuer L.: Virtual microscopy-The future of teaching histology in the medical curriculum? *Ann Anat.* 2010, 20;192(6):378-82.
80. Prasad K., Prabhu G.K.: Image Analysis Tools for Evaluation of Microscopic Views of Immunohistochemically Stained Specimen in Medical Research—a Review. *J Med Syst.* 2012;36(4):2621-31.
81. Rexhepaj E., Brennan D.J., Holloway P., Kay E.W., McCann A.H., Landberg G., Duffy M.J., Jirstrom K., Gallagher W.M.: Novel image analysis approach for quantifying expression of nuclear proteins assessed by immunohistochemistry: application to measurement of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10(5):R89.
82. Rizzardi A.E., Johnson A.T., Vogel R.I., Pambuccian S.E., Henriksen J., Skubitz A.P., Metzger G.J., Schmechel S.C.: Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol.* 2012 Jun 20;7:42.
83. Rocha R, Vassallo J, Soares F, Miller K, Gobbi H.: Digital slides: present status of a tool for consultation, teaching, and quality control in pathology. *Pathol Res Pract.* 2009;205(11):735-41.

84. Rojo M.G., Gallardo A.J., Gonzales L., Peces C., Murillo C., Gonzales J., Sacristan H.: Reading virtual slide using web viewers: results of subjective experience with three different solutions. *Diagnostic Pathology*, 2008, 3 (Suppl I) 523-527.
85. Rojo M.G., Bueno G., Slodkowska J.: Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(3):349-54.
86. Russo J.C.: The image processing. Handbook (firth edition). Taylor & Francis Group 2007.
87. Sedgewick J.: Imaging techniques in signal transduction IHC. *Methods Mol Biol.* 2011;717:113-42.
88. Serra P.J., Soille P.: Mathematical morphology and its applications to image processing; Kluwer Academic Publishers, 1994.
89. Sertel O., Kong J., Catalyurek U.V., Lozanski G., Saltz J.H., Gurcan M.N.: Histopathological Image Analysis Using Model-Based Intermediate Representations and Color Texture: Follicular Lymphoma Grading. *Journal of Signal Processing Systems* 2009;55:169-183.
90. Shih F.Y.: Image Processing and Mathematical Morphology: Fundamentals and Applications; Taylor & Francis Group, 2009.
91. Ioan Sporea<sup>1</sup>, Odd Helge Gilja<sup>2</sup>, Simona Bota<sup>1</sup>, Roxana Şirli<sup>1</sup>, Alina Popescu: Liver Elastography – An Update. *Med Ultrason* 2013;15(4), 304-314.
92. Z. Theodosiou, I.N. Kasampalidis, G. Livanos, M.Zervakis, I. Pitas, K. Lyroudia. Automated Analysis of FISH and Immunohistochemistry Images: A Review. *Cytometry* 71A, 2007;439–450.
93. Toennies K.D.: Guide to Medical Image Analysis. Methods and Algorithms. Springer, London, Heidelberg, New York, 2012.
94. Vacca L.: Laboratory manual of histochemistry. Raven Press, New York 1985;327-328,385-386,407-408,429-430.
95. Vassiliadis E., Veidal S.S., Barascuk N., Mullick J.B., Clausen R.E., Larsen L., Simonsen H., Larsen D.V., Bay-Jensen A.C., Segovia-Silvestre T., Leeming D.J., Karsdal M.A.: Measurement of matrix metalloproteinase 9-mediated collagen type III degradation fragment as a marker of skin fibrosis. *BMC Dermatol.* 2011;29;11:6.
96. Walewska- Zielecka B.: Współczesne zasady klasyfikacji przewlekłych zapaleń

- wątroby i elementy diagnostyki etiopatologicznej w badaniach morfologicznych. *Postępy Nauk Medycznych* 1/2000;18-26.
97. Wróbel Z., Koprowski R.: *Praktyka przetwarzania obrazów w programie Matlab*. Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa, 2004.
  98. Wyszecki G., Stiles W.: *Color science: concepts and methods, quantitative data and formulae*. Wiley, New York 2000.
  99. Zieliński W., Strzelecki M.: *Komputerowa analiza obrazu biomedycznego. Wstęp do morfometrii i patologii ilościowej*. Wydawnictwo Naukowe PWN 2012.
  100. Ziol M., Handra-Luca A., Kettaneh A., Christidis C., Mal F., Kazemi F., de Lédinghen V., Marcellin P., Dhumeaux D., Trinchet J.C., Beaugrand M.: *Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2005;45:48–54.

## ZAŁĄCZNIK

Tab.II B. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla pierwszego preparatu (wartość średnia, odchylenie standardowe).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia ± odch. std.	
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	12,75 ± 10,71	12,53 ± 8,00
		20x	10,21 ± 10,25	12,31 ± 7,87
		40x	8,79 ± 10,05	12,16 ± 7,63
	Wysokiej rozdzielczości	10x	9,22 ± 10,63	12,29 ± 7,98
		20x	8,90 ± 10,19	12,22 ± 7,73
		40x	8,75 ± 9,99	12,18 ± 7,61
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	10,46 ± 6,51	9,80 ± 4,85
		20x	10,06 ± 5,69	9,56 ± 4,91
		40x	9,98 ± 6,69	9,04 ± 5,11
	Wysokiej rozdzielczości	10x	9,98 ± 5,82	9,55 ± 5,08
		20x	10,50 ± 6,73	9,06 ± 4,58
		40x	10,65 ± 7,09	10,38 ± 5,44

Tabl. II C. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla drugiego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia ± odch. std.	
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	3,29 ± 3,00	3,76 ± 2,95
		20x	3,45 ± 3,14	3,79 ± 2,97
		40x	2,94 ± 2,94	3,29 ± 2,79
	Wysokiej rozdzielczości	10x	3,30 ± 2,94	3,71 ± 2,83
		20x	3,38 ± 3,05	3,81 ± 3,00
		40x	2,92 ± 2,94	3,24 ± 2,75
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	2,48 ± 2,35	2,83 ± 2,14
		20x	2,77 ± 2,46	2,80 ± 2,00
		40x	2,90 ± 2,73	2,93 ± 2,24
	Wysokiej rozdzielczości	10x	2,80 ± 2,55	2,82 ± 2,02
		20x	2,46 ± 2,19	2,81 ± 2,02
		40x	2,45 ± 2,22	2,85 ± 2,03

Tabl. II D. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla trzeciego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia ± odch. std.	
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	1,46 ± 0,91	1,40 ± 1,00
		20x	1,45 ± 0,99	1,34 ± 1,00
		40x	1,30 ± 0,92	1,25 ± 0,92
	Wysokiej rozdzielczości	10x	1,45 ± 0,89	1,34 ± 0,95
		20x	1,48 ± 1,03	1,35 ± 1,03
		40x	1,29 ± 0,90	1,27 ± 0,92
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	1,03 ± 0,77	1,04 ± 0,73
		20x	1,05 ± 0,82	1,08 ± 0,81
		40x	1,00 ± 0,80	1,05 ± 0,80
	Wysokiej rozdzielczości	10x	1,00 ± 0,78	1,05 ± 0,76
		20x	1,06 ± 0,85	1,07 ± 0,79
		40x	1,00 ± 0,79	1,05 ± 0,78

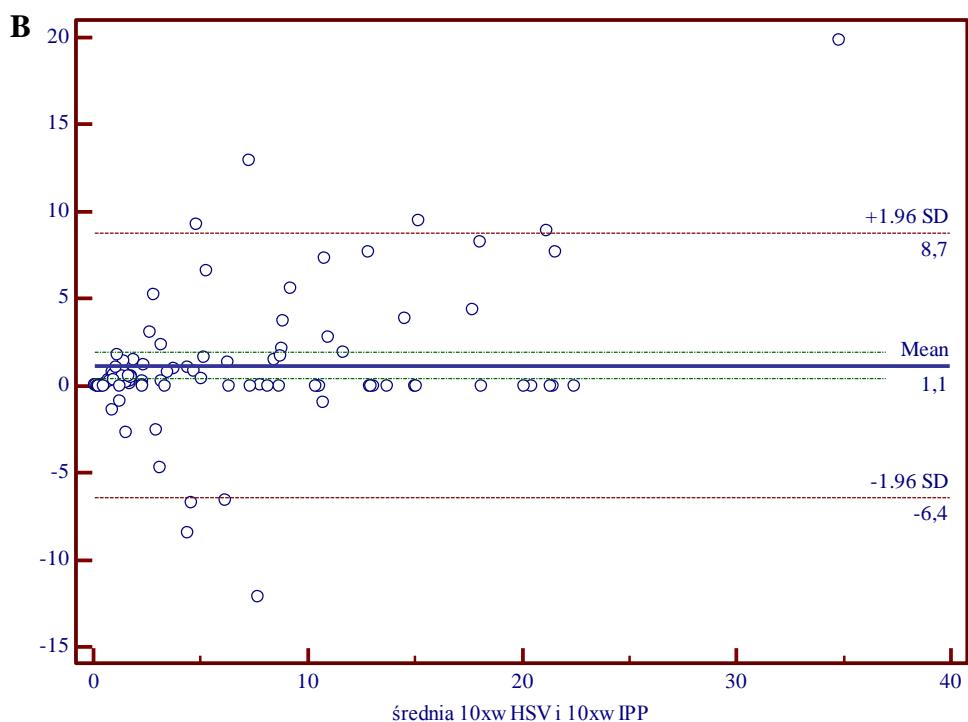
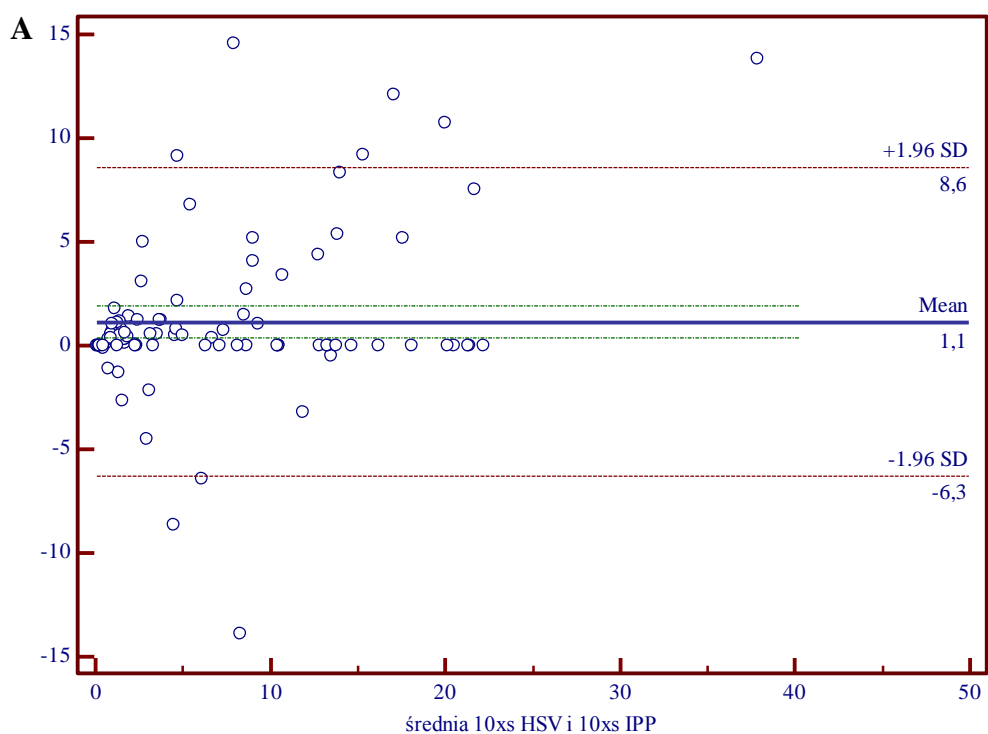
Tabl. II E. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla czwartego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia ± odch. std.	
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	3,81 ± 4,52	4,05 ± 4,54
		20x	3,70 ± 4,37	4,08 ± 4,42
		40x	3,05 ± 3,75	3,30 ± 3,72
	Wysokiej rozdzielczości	10x	3,78 ± 4,34	3,99 ± 4,47
		20x	3,08 ± 3,70	3,25 ± 3,66
		40x	3,36 ± 3,72	3,23 ± 3,63
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	3,81 ± 4,52	4,05 ± 4,54
		20x	3,70 ± 4,37	4,08 ± 4,42
		40x	2,48 ± 3,23	2,79 ± 3,20
	Wysokiej rozdzielczości	10x	3,78 ± 4,34	4,07 ± 4,41
		20x	3,08 ± 3,70	3,25 ± 3,66
		40x	3,36 ± 3,72	3,23 ± 3,63

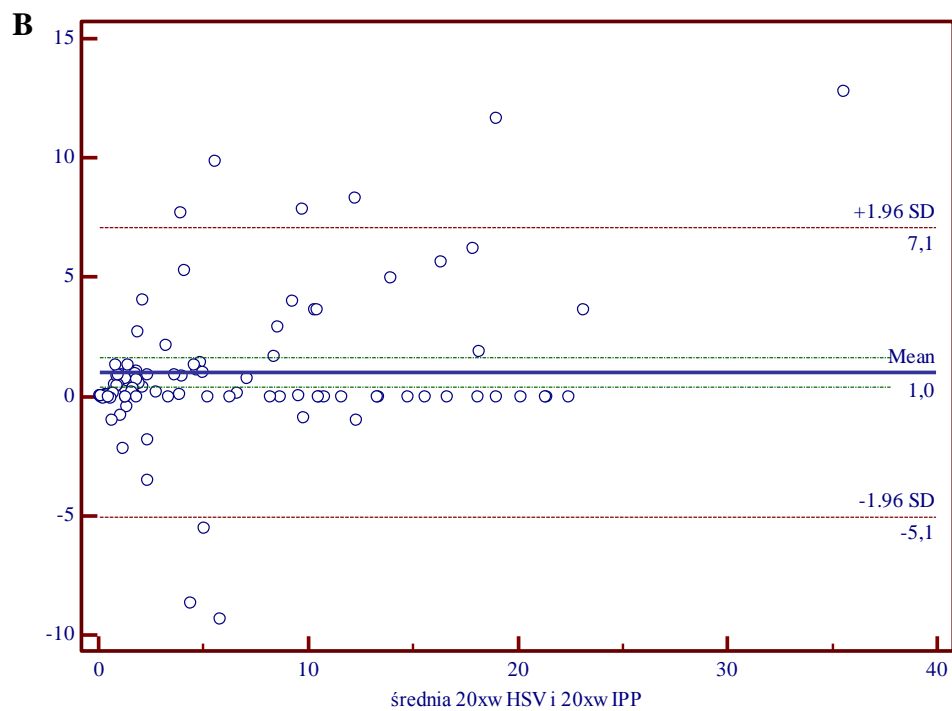
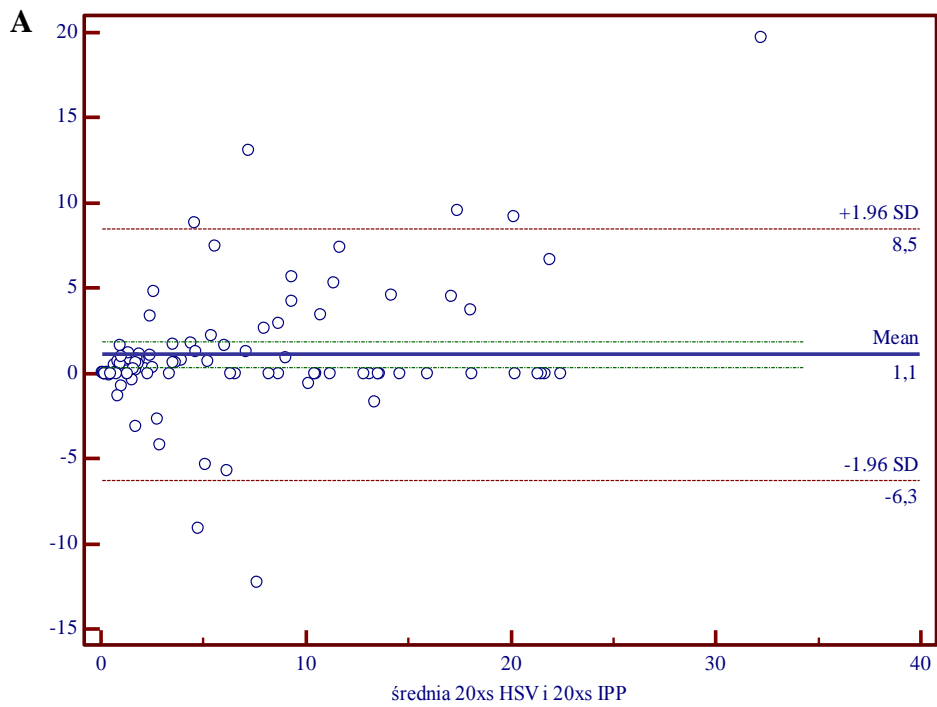


Tabl. II F. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla piątego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

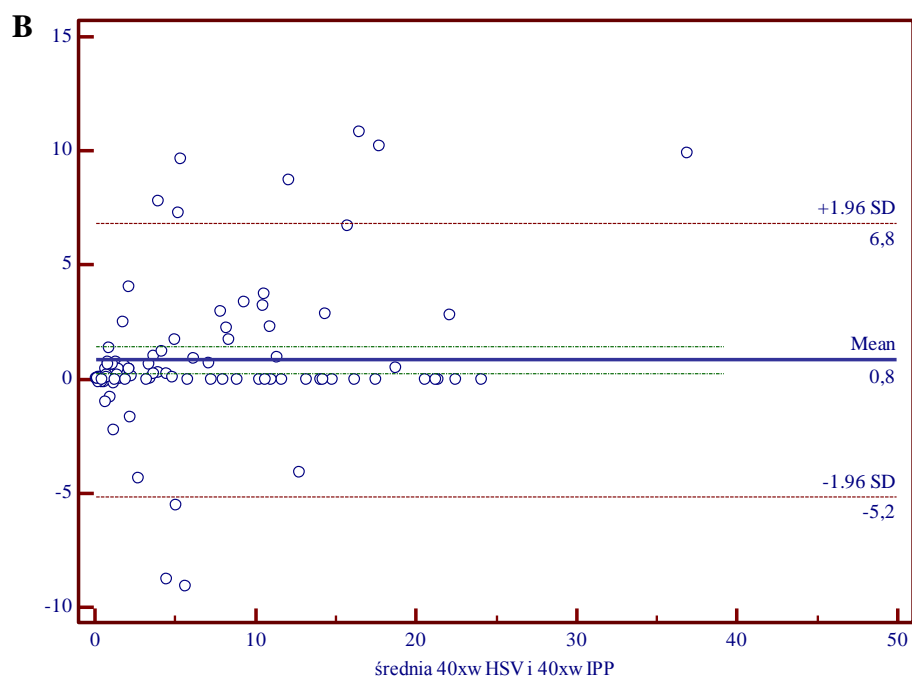
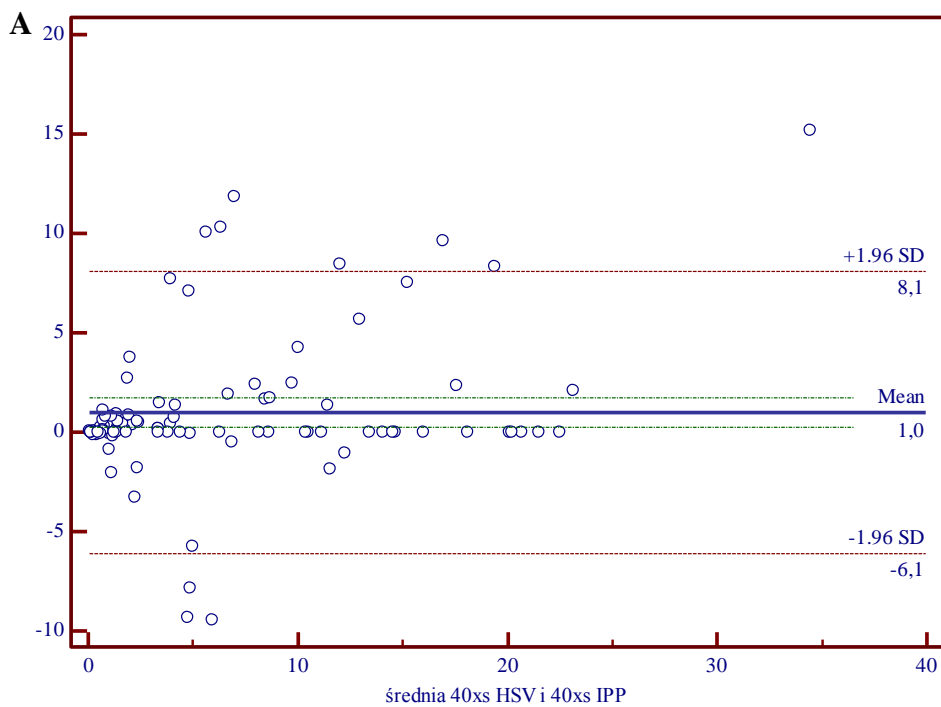
oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia $\pm$ odch. std.	
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	12,70 $\pm$ 6,74	10,98 $\pm$ 6,55
		20x	12,80 $\pm$ 6,83	11,00 $\pm$ 6,56
		40x	12,79 $\pm$ 6,72	11,02 $\pm$ 6,54
	Wysokiej rozdzielczości	10x	12,65 $\pm$ 6,74	11,00 $\pm$ 6,51
		20x	12,80 $\pm$ 6,71	11,14 $\pm$ 6,65
		40x	13,03 $\pm$ 6,99	11,00 $\pm$ 6,65
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	12,70 $\pm$ 6,74	10,98 $\pm$ 6,55
		20x	12,80 $\pm$ 6,83	11,00 $\pm$ 6,56
		40x	12,79 $\pm$ 6,72	11,02 $\pm$ 6,54
	Wysokiej rozdzielczości	10x	12,65 $\pm$ 6,74	11,00 $\pm$ 6,51
		20x	12,80 $\pm$ 6,71	11,14 $\pm$ 6,65
		40x	13,03 $\pm$ 6,99	11,00 $\pm$ 6,65



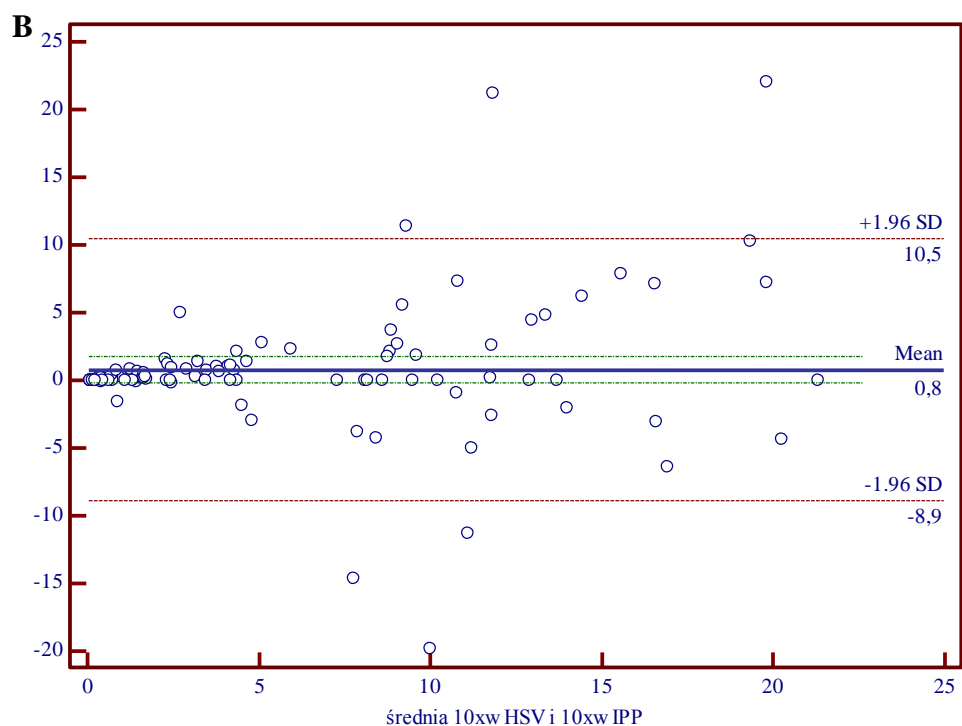
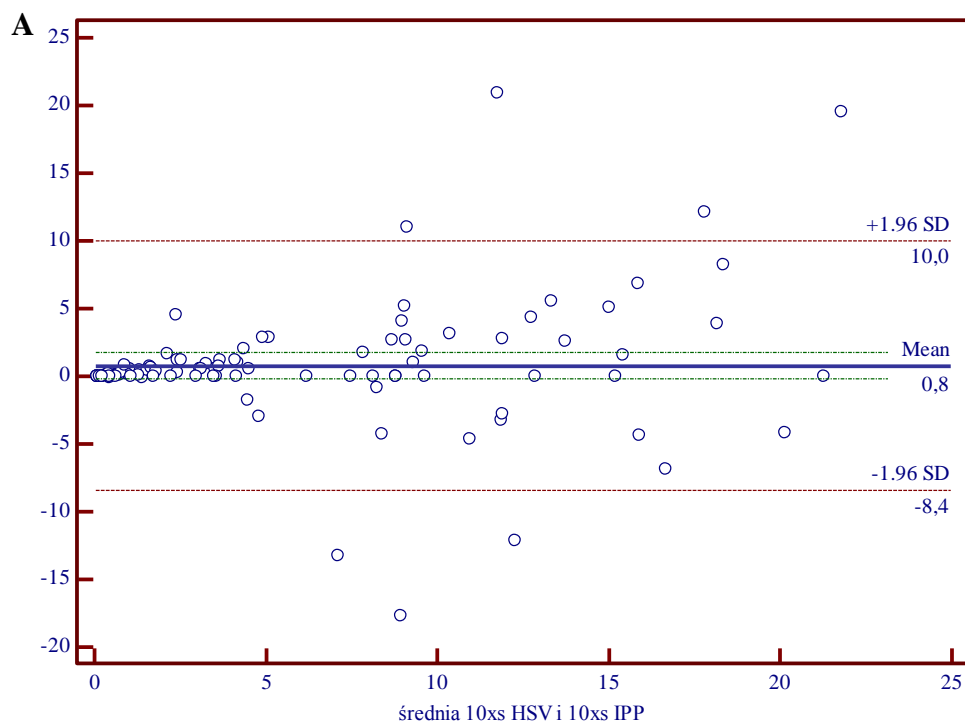
Ryc. 22. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) w przypadku próbkowania systematycznego i 10-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 9%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 9%.



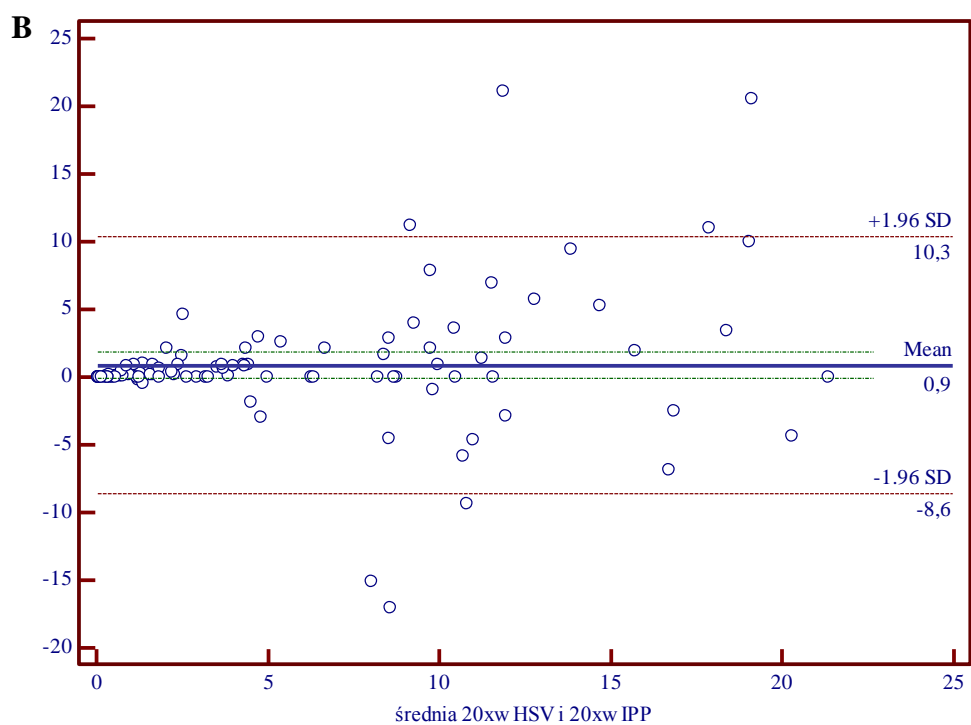
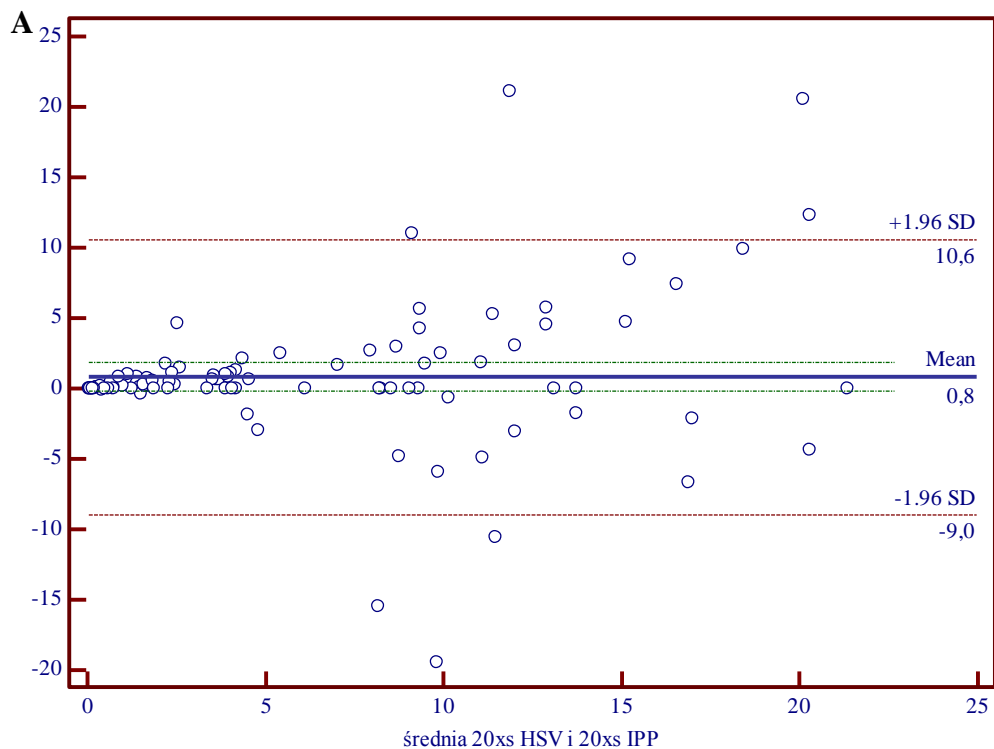
Ryc.23. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) przypadku próbkowania systematycznego i 20-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 7%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 9%.



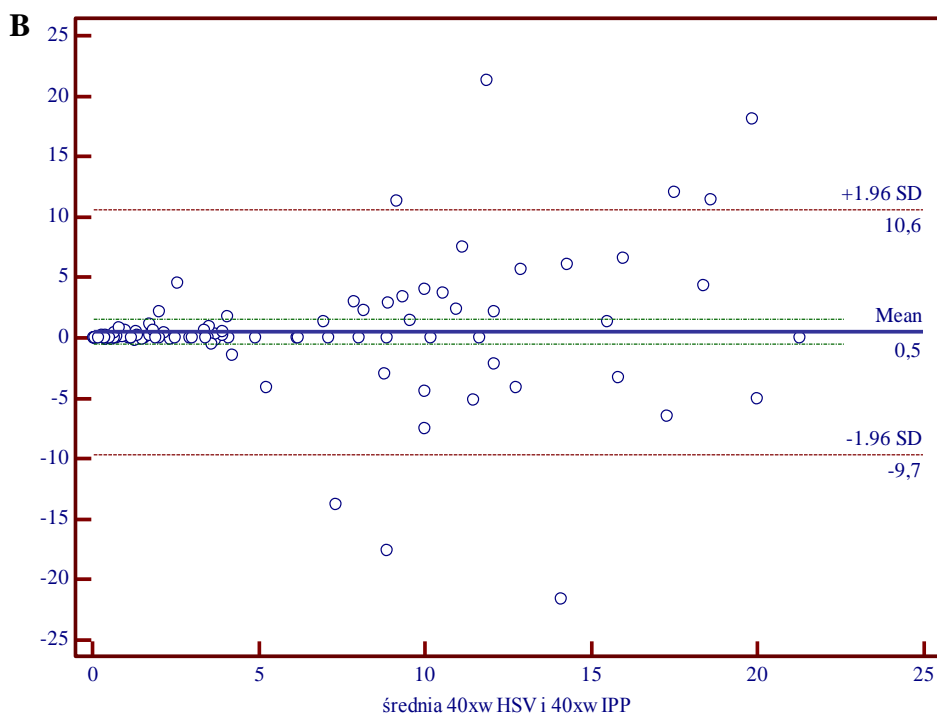
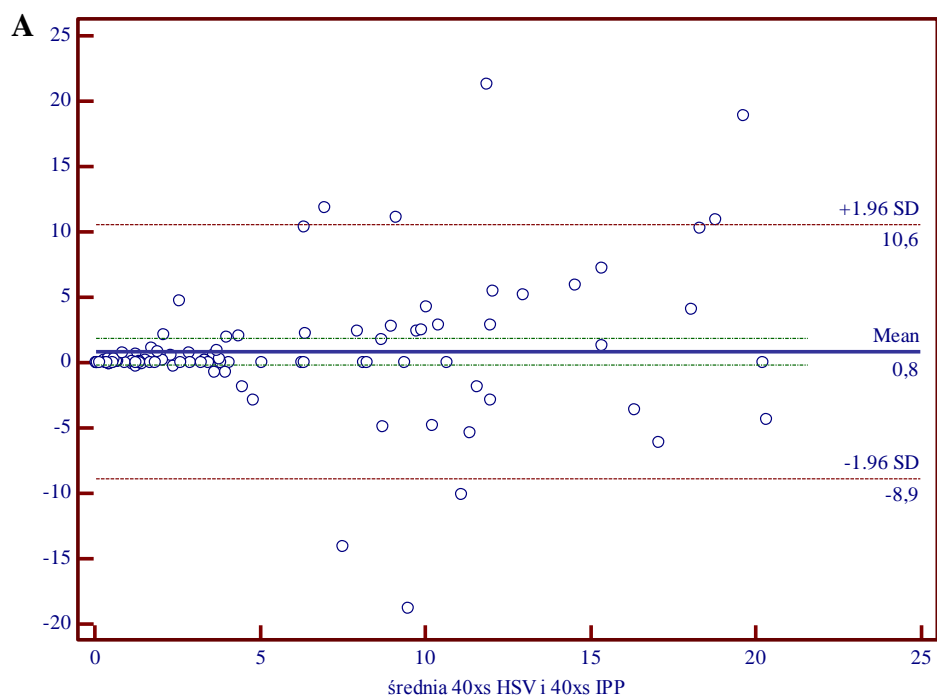
Ryc.24. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) w przypadku próbkowania systematycznego i 40-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 10%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 10%.



Ryc.25. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) w przypadku próbkowania losowego i 10-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 7%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 6%.



Ryc.26. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) w przypadku próbkowania losowego i 20-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 7%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 7%.



Ryc.27. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) w przypadku próbkowania losowego i 40-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 8%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 8%.

Tab.VIII B. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ dla pierwszego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia $\pm$ SD	
			próbkiowanie systematyczne	próbkiowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	72 $\pm$ 91	71 $\pm$ 85
		20x	72 $\pm$ 90	71 $\pm$ 84
		40x	72 $\pm$ 90	71 $\pm$ 86
	Wysokiej rozdzielczości	10x	72 $\pm$ 91	71 $\pm$ 84
		20x	73 $\pm$ 91	72 $\pm$ 85
		40x	72 $\pm$ 89	72 $\pm$ 86
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	77 $\pm$ 102	87 $\pm$ 123
		20x	77 $\pm$ 100	90 $\pm$ 127
		40x	78 $\pm$ 102	92 $\pm$ 131
	Wysokiej rozdzielczości	10x	76 $\pm$ 100	96 $\pm$ 138
		20x	79 $\pm$ 103	94 $\pm$ 136
		40x	78 $\pm$ 102	97 $\pm$ 138

Tab.VIII C. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ pozytywnych dla drugiego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia $\pm$ SD	
			próbkiowanie systematyczne	próbkiowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	150 $\pm$ 179	146 $\pm$ 126
		20x	150 $\pm$ 179	148 $\pm$ 126
		40x	150 $\pm$ 180	146 $\pm$ 126
	Wysokiej rozdzielczości	10x	150 $\pm$ 178	148 $\pm$ 127
		20x	150 $\pm$ 179	146 $\pm$ 125
		40x	146 $\pm$ 172	140 $\pm$ 120
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	124 $\pm$ 121	128 $\pm$ 97
		20x	127 $\pm$ 126	131 $\pm$ 96
		40x	124 $\pm$ 124	132 $\pm$ 98
	Wysokiej rozdzielczości	10x	122 $\pm$ 120	129 $\pm$ 97
		20x	125 $\pm$ 126	131 $\pm$ 97
		40x	123 $\pm$ 124	132 $\pm$ 98



Tab.VIII D. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ pozytywnych dla trzeciego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

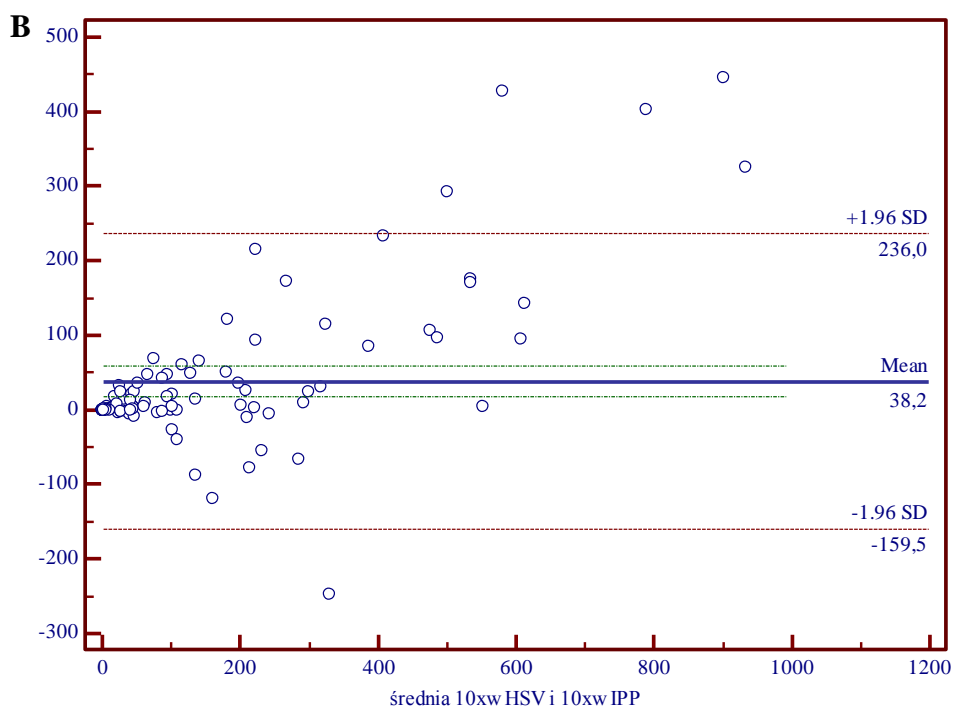
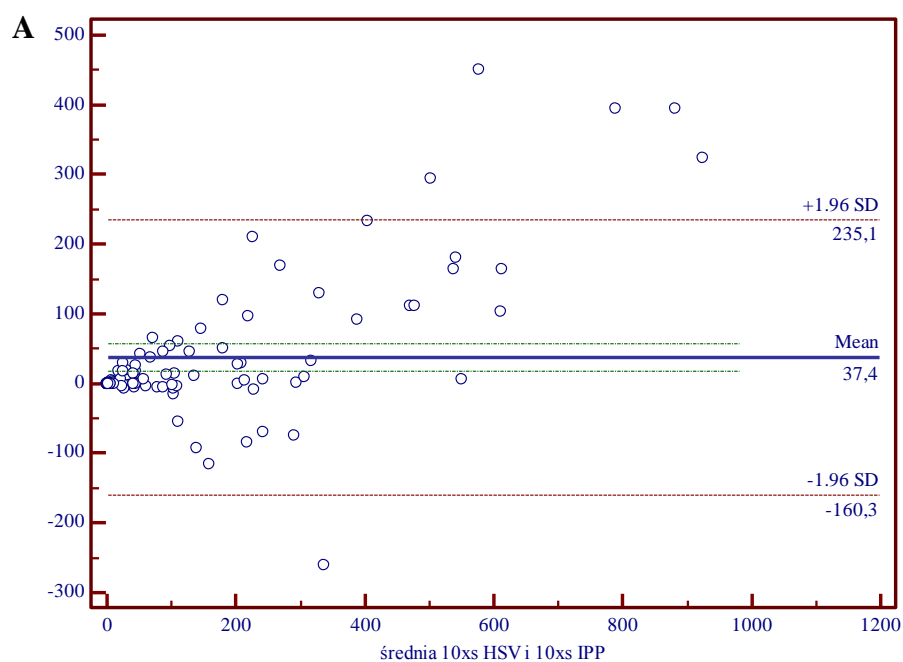
oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia $\pm$ SD	
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	340 $\pm$ 315	197 $\pm$ 187
		20x	339 $\pm$ 317	196 $\pm$ 184
		40x	340 $\pm$ 317	196 $\pm$ 186
	Wysokiej rozdzielczości	10x	339 $\pm$ 314	198 $\pm$ 186
		20x	341 $\pm$ 315	196 $\pm$ 185
		40x	333 $\pm$ 308	196 $\pm$ 180
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	259 $\pm$ 228	165 $\pm$ 119
		20x	260 $\pm$ 229	159 $\pm$ 118
		40x	261 $\pm$ 231	160 $\pm$ 121
	Wysokiej rozdzielczości	10x	259 $\pm$ 229	165 $\pm$ 120
		20x	259 $\pm$ 229	162 $\pm$ 120
		40x	263 $\pm$ 232	162 $\pm$ 124

Tab.VIII E. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ dla czwartego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

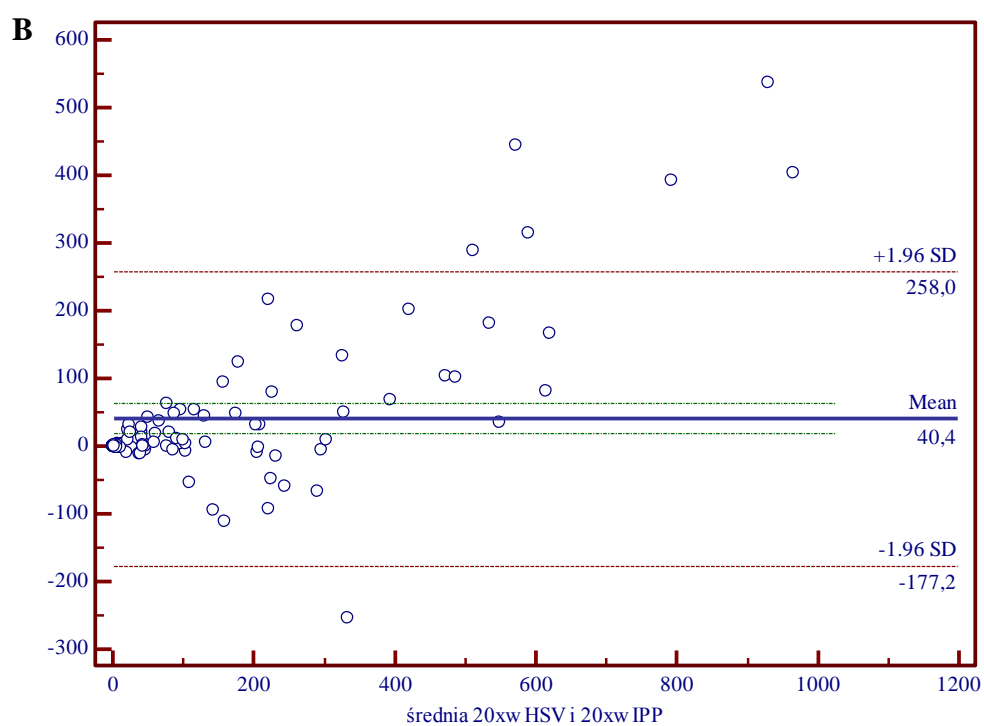
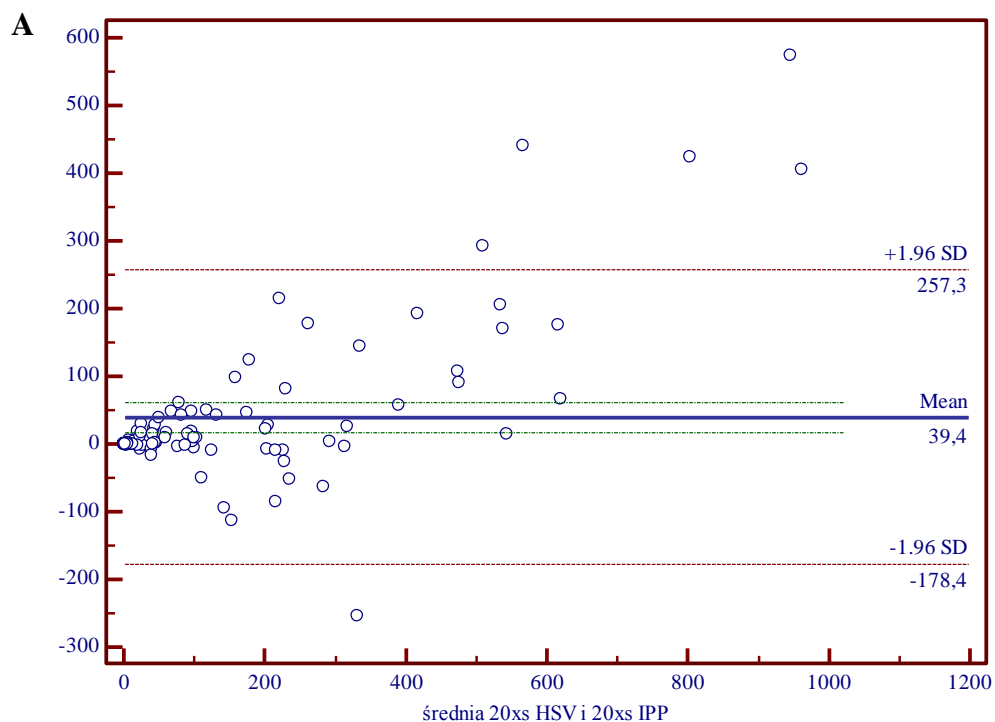
oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia $\pm$ SD	
			próbkowanie systematyczne	próbkowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	237 $\pm$ 328	258 $\pm$ 249
		20x	247 $\pm$ 362	244 $\pm$ 260
		40x	271 $\pm$ 387	281 $\pm$ 284
	Wysokiej rozdzielczości	10x	238 $\pm$ 335	259 $\pm$ 255
		20x	249 $\pm$ 365	245 $\pm$ 252
		40x	259 $\pm$ 372	277 $\pm$ 278
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	178 $\pm$ 220	242 $\pm$ 207
		20x	174 $\pm$ 216	242 $\pm$ 206
		40x	175 $\pm$ 217	232 $\pm$ 198
	Wysokiej rozdzielczości	10x	178 $\pm$ 220	249 $\pm$ 218
		20x	174 $\pm$ 217	240 $\pm$ 206
		40x	174 $\pm$ 216	231 $\pm$ 198

Tab.VIII F. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ dla piątego preparatu histologicznego (wartość średnia, odchylenie standardowe).

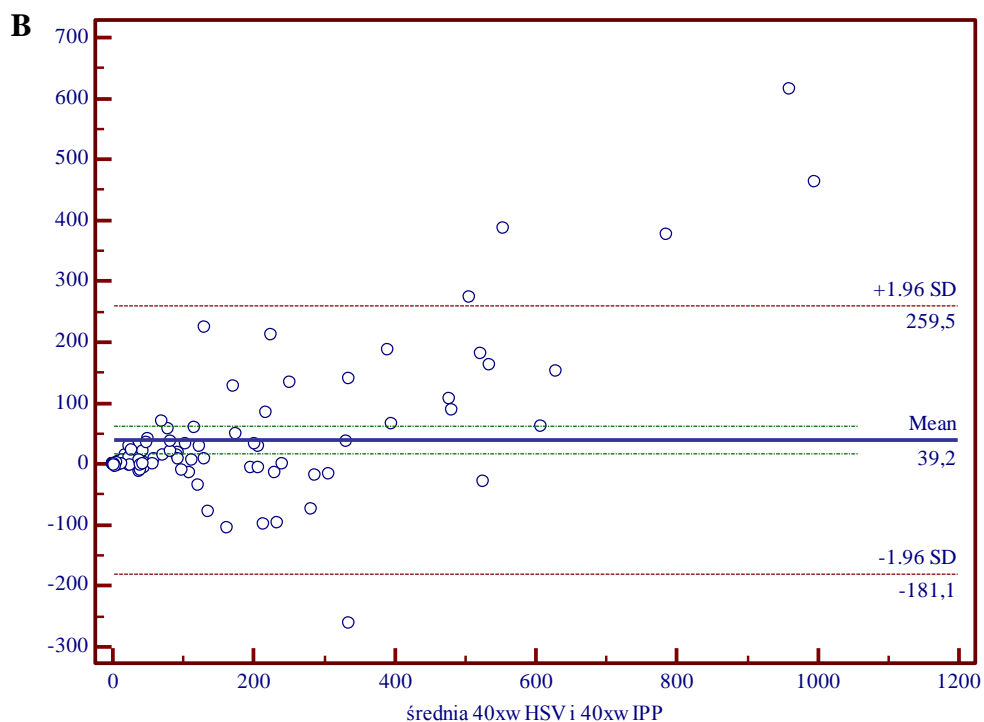
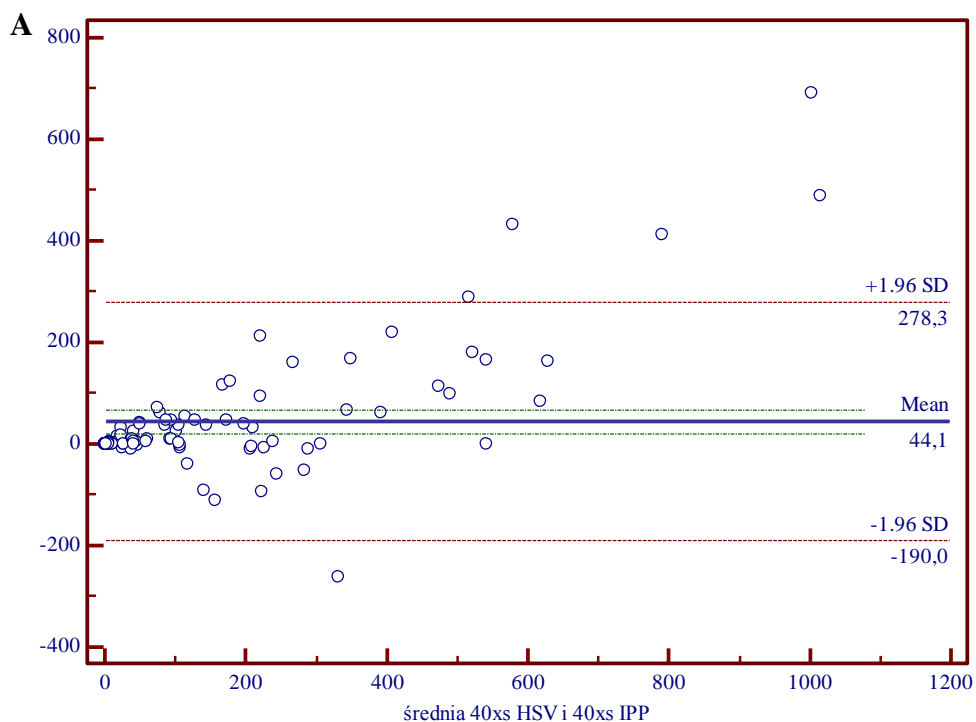
oprogramowanie	jakość rejestracji preparatu	powiększenie	średnia $\pm$ SD	
			próbkiowanie systematyczne	próbkiowanie losowe
Filtr HSV	Średniej rozdzielczości	10x	92 $\pm$ 95	58 $\pm$ 67
		20x	92 $\pm$ 94	58 $\pm$ 68
		40x	91 $\pm$ 94	59 $\pm$ 69
	Wysokiej rozdzielczości	10x	92 $\pm$ 95	57 $\pm$ 66
		20x	92 $\pm$ 95	58 $\pm$ 67
		40x	85 $\pm$ 89	54 $\pm$ 65
Image-Pro Premier	Średniej rozdzielczości	10x	66 $\pm$ 72	45 $\pm$ 47
		20x	65 $\pm$ 67	43 $\pm$ 49
		40x	66 $\pm$ 71	46 $\pm$ 48
	Wysokiej rozdzielczości	10x	66 $\pm$ 68	44 $\pm$ 47
		20x	65 $\pm$ 70	46 $\pm$ 49
		40x	61 $\pm$ 72	45 $\pm$ 48



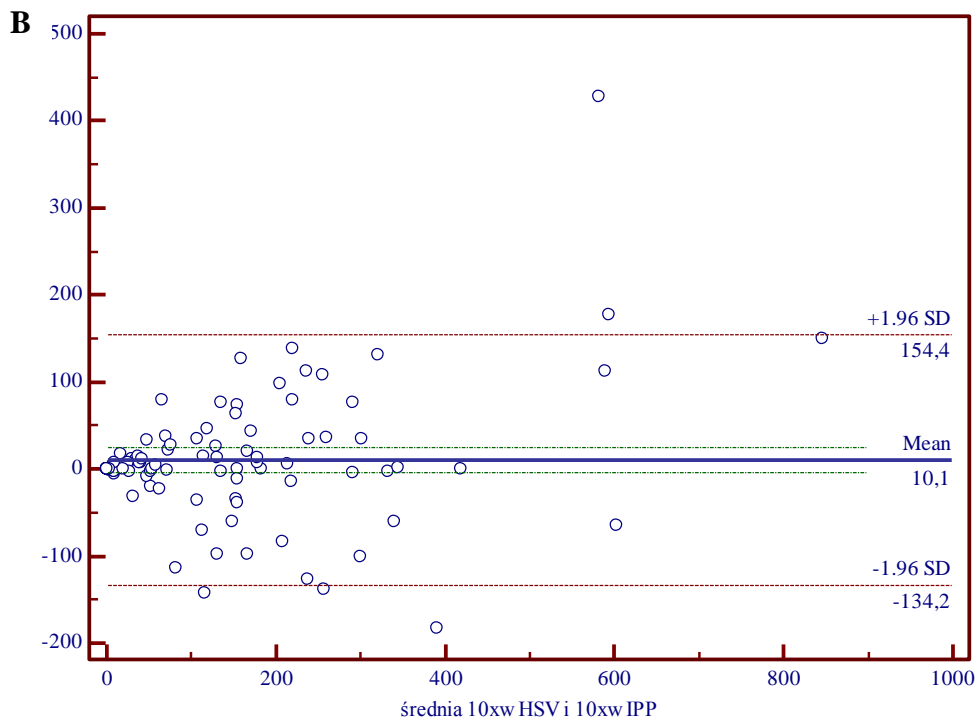
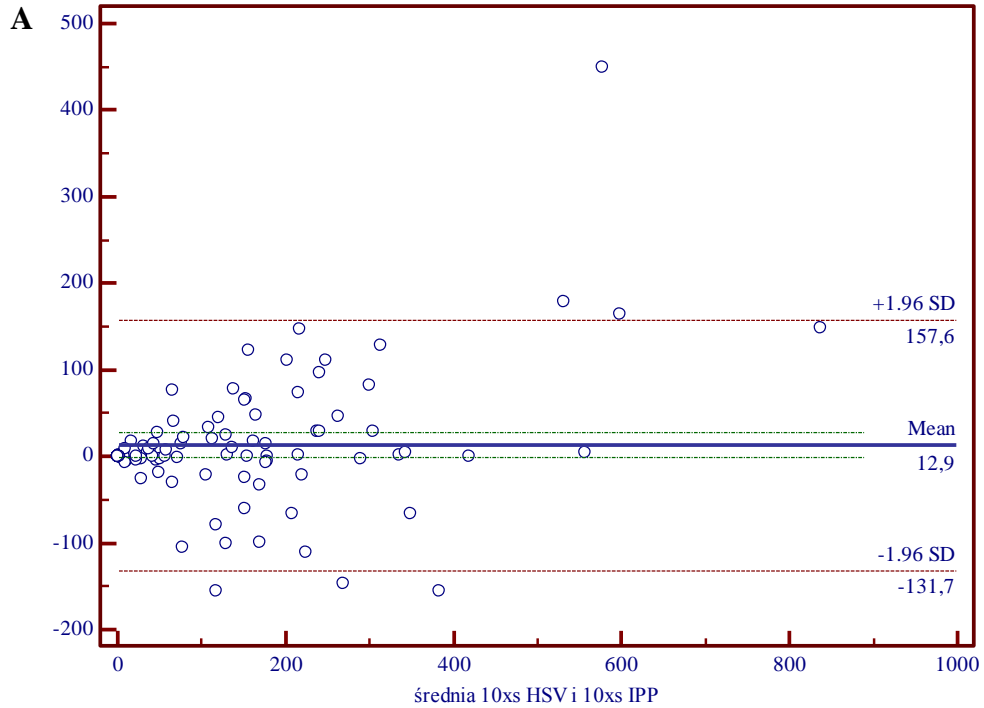
Ryc. 31. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) dla próbkowania systematycznego i 10-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 6%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 6%.



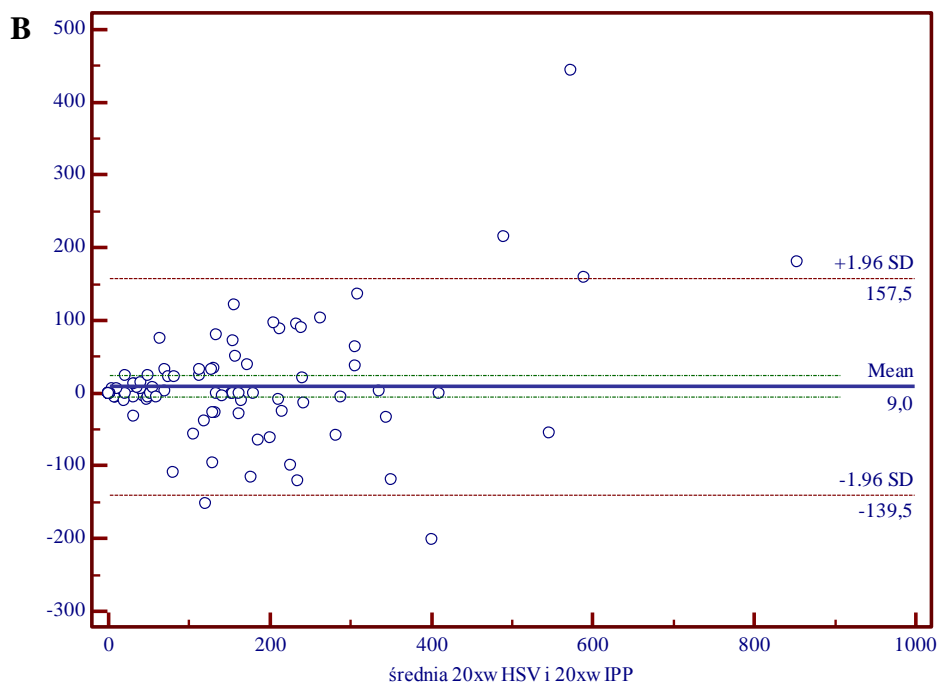
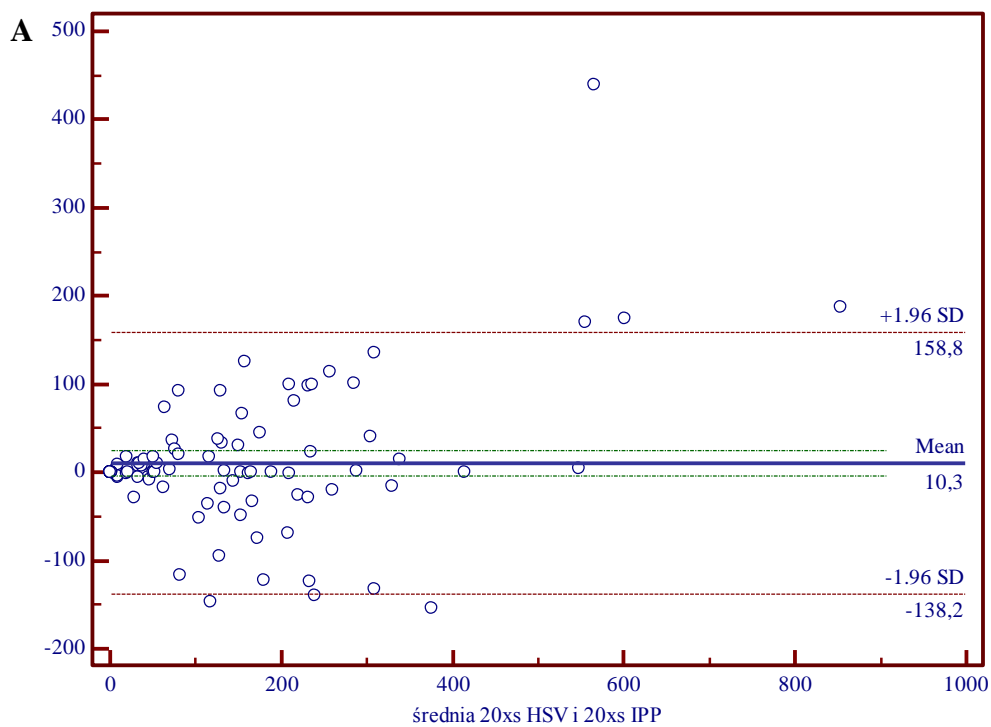
Ryc.32. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) dla próbkowania systematycznego i 20-krotnego powiększenia skanera: (A)średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 6%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 7%.



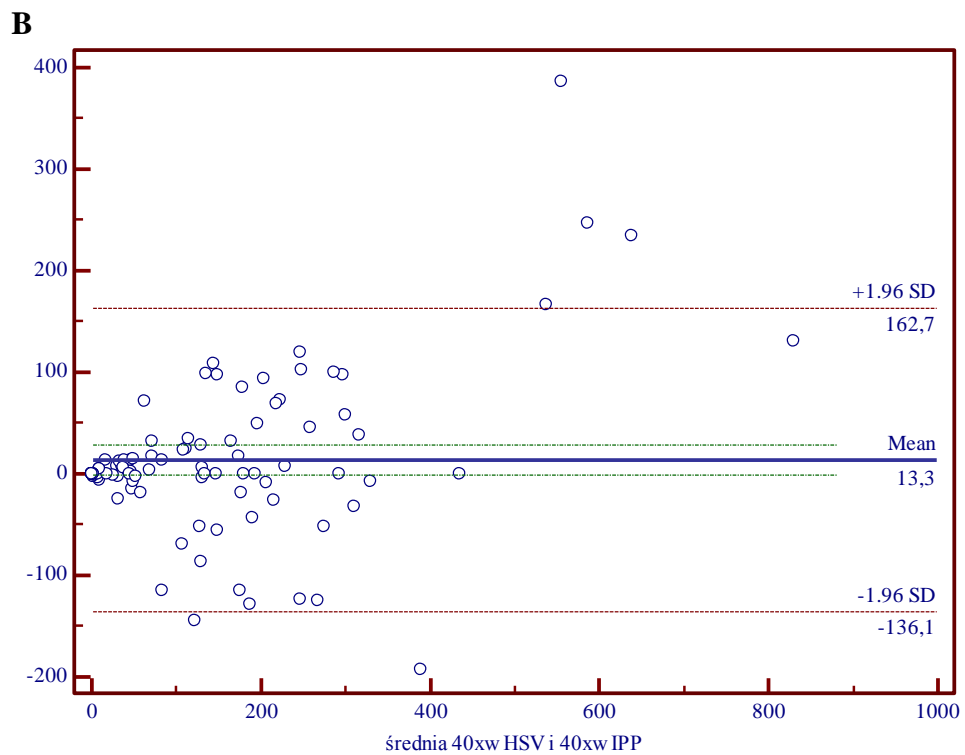
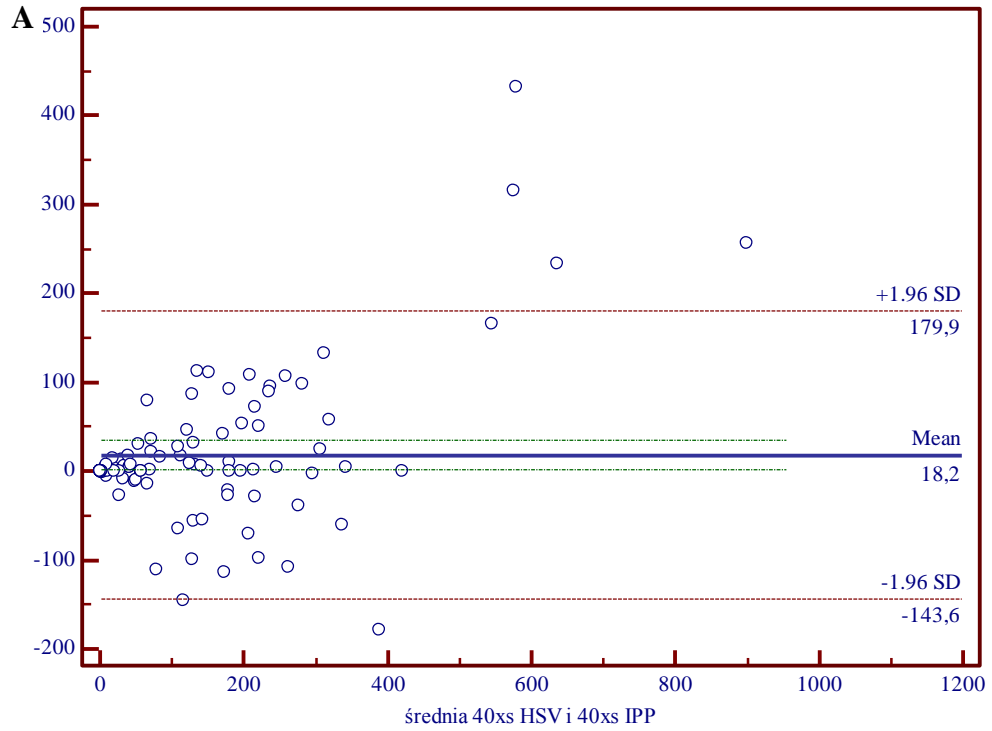
Ryc.33. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) dla próbkowania systematycznego i 40-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 6%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 6%.



Ryc.34. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) dla próbkowania losowego i 10-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 6%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 5%.



Ryc.35. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA<sup>+</sup> pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image-Pro Premier* (ozn. IPP) dla próbkowania losowego i 20-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 7%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 6%.



Ryc.36. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem *Filtr HSV* (ozn. HSV) a *Image Pro-Premier* (ozn. IPP) dla próbkowania losowego i 40-krotnego powiększenia skanera: (A) średnia rozdzielczość skanera (s), współczynnik Blanda-Altmana 6%; (B) wysoka rozdzielczość skanera (w), współczynnik Blanda-Altmana 6%.



## SPIS TABEL

Tab.I. Wyniki oceny morfometrycznej, histopatologicznej i sonoelastograficznej w próbie pilotażowej .....	43
Tab.II A. Parametry statystyki opisowej włóknienia śródmiąższu wątroby w poszczególnych grupach oraz wyniki testu Wilcoxon .....	44
Tab.II B. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla pierwszego preparatu .....	81
Tab.II C. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla drugiego preparatu histologicznego .....	81
Tab.II D. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla trzeciego preparatu histologicznego .....	82
Tab.II E. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla czwartego preparatu histologicznego .....	82
Tab.II F. Szczegółowe wyniki procentu włóknienia śródmiąższu wątroby dla piątego preparatu histologicznego .....	83
Tab.III. Wartości współczynnika korelacji liniowej oraz współczynnika zgodności Cronbacha wyników procentu reakcji czerwieni Syriusza na preparatach rejestrowanych przy ustalonym powiększeniu (10,20,40) oraz średniej (s) i wysokiej (w) rozdzielczości z użyciem programu <i>Filtr HSV</i> .....	45
Tab.IV. Wartości współczynnika korelacji liniowej oraz współczynnika zgodności Cronbacha wyników procentu reakcji czerwieni Syriusza na preparatach rejestrowanych przy ustalonym powiększeniu (10,20,40) oraz średniej (s) i wysokiej (w) rozdzielczości z użyciem programu <i>Image-Pro Premier</i> .....	46
Tab.V. Wyniki analizy korelacji Pearsona oraz korelacji Spearmana dla wyników otrzymanych programem <i>Filtr HSV</i> .....	47
Tab.VI. Wyniki analizy korelacji Pearsona oraz korelacji Spearmana dla wyników otrzymanych programem <i>Image-Pro Premier</i> .....	47
Tab.VII. Porównanie metod próbkowania (systematyczne vs. losowe) metodą regresji Passinga-Babloka .....	49
Tab.VIII A. Parametry statystyczne jąder komórkowych PCNA+ w poszczególnych grupach oraz wynik testu Wilcoxon .....	50

Tab.VIII B. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ dla pierwszego preparatu histologicznego .....	90
Tab.VIII C. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ pozytywnych dla drugiego preparatu histologicznego .....	90
Tab.VIII D. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ pozytywnych dla trzeciego preparatu histologicznego .....	91
Tab.VIII E. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ dla czwartego preparatu histologicznego .....	91
Tab.VIII F. Szczegółowe wyniki liczby jąder komórkowych PCNA+ dla piątego preparatu histologicznego .....	92
Tab. IX. Wyniki analizy korelacji (wyznaczony współczynnik korelacji liniowej) oraz współczynnik zgodności Cronbacha dla wyników morfometrycznych otrzymanych w programie <i>Filtr HSV</i> .....	51
Tab. X. Wyniki analizy korelacji (wyznaczony współczynnik korelacji liniowej) oraz współczynnik zgodności Cronbacha dla wyników morfometrycznych otrzymanych w programie <i>Image-Pro Premier</i> .....	51
Tab.XI. Wyniki analizy korelacji Pearsona oraz korelacji Spearmana dla wyników otrzymanych programem <i>Filtr HSV</i> .....	53
Tab.XII. Wyniki analizy korelacji Pearsona oraz korelacji Spearmana dla wyników otrzymanych programem <i>Image-Pro Premier</i> .....	53
Tab.XIII. Porównanie metod próbkowania (systematyczne vs. losowe) metodą regresji Passinga-Babloka .....	55
Tab.XIV. Ocena współczynnika jądrowego NAF jąder komórkowych PCNA <sup>+</sup> .....	56

## SPIS RYCIN

Ryc.1. Fragment zeskanowanego preparatu histologicznego z widocznym podziałem na równe pola.....	8
Ryc.2. Skaner preparatów histologicznych Mirax-Midi (Carl Zeiss) wraz z podajnikiem, który umożliwia automatyczne skanowanie preparatów.....	9
Ryc.3. Okno dialogowe programu Mirax Viewer (Carl Zeiss) prezentujące miniatury zeskanowanych preparatów oraz panoramę wybranego do analizy preparatu .....	9
Ryc.4. Analiza wybranego fragmentu cyfrowego preparatu w programie OlyVia (Olympus) przy powiększeniach: (A) 4x i (B) 8x.....	11
Ryc.5. Analiza wybranego fragmentu cyfrowego preparatu w programie OlyVia (Olympus) przy powiększeniach: (A) 10x i (B) 20x.....	12
Ryc.6. Okno dialogowe w programie OlyVia (Olympus).....	13
Ryc.7. Próbkowanie preparatów histopatologicznych, materiałów z biopsji wątroby wybarwiony Czerwienią Syriusza (A). Próbkowanie preparatu wirtualnego w powiększeniu: losowe proste (B), losowe systematyczne (C).....	16
Ryc.8. Systematyczne próbkowanie losowe podobrazów preparatu.....	16
Ryc.9. Segmentacja obrazów kolorowych w programie autorskim <i>Filtr HSV</i> na przykładzie preparatów wątroby wybarwionych czerwienią Syriusza.....	20
Ryc.10. Segmentacja metodą działów wodnych w programie ImageJ .....	22
Ryc.11. Elastogram wątroby w czasie rzeczywistym, kodowany kolorem.....	25
Ryc.12. Zrzut ekranowy z programu OlyVia .....	29
Ryc.13. Uproszczony schemat próbkowania preparatu wybarwionego czerwienią Syriusza .....	30
Ryc.14. Obraz przed segmentacją (A) oraz po segmentacji włókien kolagenowych (B) w programie autorskim <i>Filtr HSV</i> .....	32
Ryc.15. Fragment wirtualnego slajdu przed segmentacją (A) i po segmentacji ze zliczonymi strukturami PCNA (B) w programie autorskim <i>Filtr HSV</i> .....	33
Ryc.16. Fragment preparatu cyfrowego i segmentacja włókien kolagenowych wybarwionych czerwienią Syriusza (klasa 1) .....	34
Ryc.17. Segmentacja włókien kolagenowych wybarwionych czerwienią Syriusza- etap klasyfikacji pikseli, wyróżniona klasa 2- szkiełko podstawowe.....	35

Ryc.18. Obraz wynikowy segmentacji włókien kolagenowych wybarwionych czerwienią Syriusza.....	35
Ryc.19. Fragment wirtualnego slajdu i segmentacja komórek pozytywnych z reakcją PCNA .....	37
Ryc.20. Porównanie wyników oceny morfometrycznej, elastograficznej i histopatologicznej w skali METAVIR odniesionych do spodziewanych wartości maksymalnych .....	43
Ryc.21. Zgodność pomiarów procentu włóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> w przypadku próbkowania systematycznego i 40-krotnego powiększenie skanera oraz wysokiej rozdzielczości skanera .....	46
Ryc.22. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> w przypadku próbkowania systematycznego i 10-krotnego powiększenia skanera .....	84
Ryc.23. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> w przypadku próbkowania systematycznego i 20-krotnego powiększenia skanera .....	85
Ryc.24. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> w przypadku próbkowania systematycznego i 40-krotnego powiększenia skanera .....	86
Ryc.25. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> w przypadku próbkowania losowego i 10-krotnego powiększenia skanera .....	87
Ryc.26. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> w przypadku próbkowania losowego i 20-krotnego powiększenia skanera .....	88
Ryc.27. Zgodność pomiarów procentu zwłóknienia śródmiąższu wątroby pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> w przypadku próbkowania losowego i 40-krotnego powiększenia skanera .....	89
Ryc.28. Wykres korelacji liniowej pomiędzy pomiarami procentu włóknienia śródmiąższu wątroby uzyskany pod 40-krotnym powiększeniem skanera oraz przy średniej rozdzielczości skanera, metodą próbkowania systematycznego (S) a losowego (L) w programie <i>Filtr HSV</i> .....	48

Ryc.29. Wykres korelacji liniowej pomiędzy pomiarami procentu włóknienia śródmiaższu wątroby uzyskany pod 40-krotnym powiększeniem skanera oraz przy wysokiej rozdzielczości skanera, metodą próbkowania systematycznego (S) a losowego (L) w programie <i>Image-Pro Premier</i> .....	48
Ryc.30. Wykres Blanda-Altmana dla jąder komórkowych PCNA+ zliczanych programem <i>Filtr HSV</i> i <i>Image-Pro Premier</i> przy 10-krotnym powiększeniu oraz wysokiej rozdzielczości skanera oraz próbkowaniu losowym .....	52
Ryc. 31. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> dla próbkowania systematycznego i 10-krotnego powiększenia skanera .....	93
Ryc.32. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> dla próbkowania systematycznego i 20-krotnego powiększenia skanera .....	94
Ryc.33. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> dla próbkowania systematycznego i 40-krotnego powiększenia skanera .....	95
Ryc.34. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> dla próbkowania losowego i 10-krotnego powiększenia skanera .....	96
Ryc.35. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA <sup>+</sup> pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> dla próbkowania losowego i 20-krotnego powiększenia skanera .....	97
Ryc.36. Zgodność liczby jąder komórkowych PCNA+ pomiędzy oprogramowaniem <i>Filtr HSV</i> a <i>Image-Pro Premier</i> dla próbkowania losowego i 40-krotnego powiększenia skanera .....	98
Ryc.37. Wykres korelacji liniowej pomiędzy liczbą jąder komórkowych PCNA+ uzyskanych przy 40-krotnym powiększeniu oraz wysokiej rozdzielczości skanera metodą próbkowania systematycznego (S) i losowego (L) w programie <i>Filtr HSV</i> .....	54
Ryc.38. Wykres korelacji liniowej pomiędzy liczbą jąder komórkowych PCNA+ przy 40-krotnym powiększeniu oraz wysokiej rozdzielczości skanera metodą próbkowania systematycznego (S) a losowego (L) w programie <i>Image-Pro Premier</i> .....	54