

UNIwersYTET MEDYCZNY w BIAŁYMSTOKU
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII OGÓLNEJ

15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 13
e-mail: sekretariat_zpo.amb@op.pl

tel. i fax: (085) 748 59 96
centr. AMB (085) 748 54 00

Białystok, 20.09.2022

Wew. 04.10.22
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNEJ
zastępca przewodniczącego
M. Podhorska-Okołów
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

| | |
|---|------------|
| Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNEJ | |
| wpl. dnia | 03-10-2022 |
| L. dz. RN-BM/ | 1576 |

Ocena

rozprawy doktorskiej lek. Łukasza Fuławki pt.

**Wykorzystanie metod komputerowej analizy obrazu do oceny indeksu
proliferacyjnego w raku piersi.**

Rak piersi niestety wciąż zajmuje niechlubne pierwsze miejsce u kobiet w zachorowalności na nowotwory złośliwe. Taki stan rzeczy przekłada się oczywiście na zwiększone zainteresowanie wśród klinicystów jak i naukowców tym nowotworem. Ostatnie lata przyniosły nowe spojrzenie na biologię raka piersi. Wyodrębnia się klasyfikację histologiczną wg WHO oraz molekularną (opartą na mikromacierzach ekspresyjnych - wyodrębniającą 4 podtypy - molekularne). Jednakże w rutynowej diagnostyce wykorzystuje się klasyfikację opartą o immunohistochemię. Wymienia się tzw. kliniczno-patologiczne podtypy zastępcze (clinicopathological surrogate subtypes, obejmujące następujące kategorie: luminalny A (luminal A-like), luminalny B - HER2 ujemny (luminal B-like - HER2 negative), luminalny B - HER2 dodatni (luminal B-like - HER2 positive), HER2 dodatni - Nieluminaly (HER2 positive - non-luminal) oraz trójujemny (triple-negative). Celem klasyfikacji do określonego podtypu, w przypadku każdego nowo rozpoznanego raka piersi rutynowo wykonywane jest badanie immunohistochemiczne pod kątem statusu receptorów estrogenowych (ER), progesteronowych (PgR), HER2 oraz białka jądrowego Ki-67, będącego markerem proliferacji.

Ocena tych poszczególnych parametrów jest kluczowa do podjęcia właściwego postępowania terapeutycznego u pacjentki.

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII OGÓLNEJ

15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 13
e-mail: sekretariat_zpo.amb@op.pl

tel. i fax: (085) 748 59 96
centr. AMB (085) 748 54 00

W praktyce lekarza patomorfologa oceny rec. Estrogenowych, rec. Progesteronowych jak i HER-2 dokonuje się półilościowo, zgodnie z oparcowanymi wytycznymi St Gallen, ulegającymi stałej aktualizacji. Ocena natomiast statusu ekspresji Ki67, ocena indeksu proliferacyjnego, wymaga wyliczenia stosunku odsetka komórek nowotworowych Ki67(+) do całkowitej liczby komórek nowotworowych (Ki67-dodatnich + Ki67-ujemnych). Trzeba przyznać, że jest to metoda dość czasochłonna.

Dlatego też uważam, że wybór tematu pracy doktorskiej **Wykorzystanie metod komputerowej analizy obrazu do oceny indeksu proliferacyjnego w raku piersi lek. Łukasza Fuławki** jest w pełni uzasadniony, ciekawy i bardzo aktualny wskazujący na znajomość przez Doktoranta obecnych trendów zaangażowania sztucznej inteligencji w diagnostyce patomorfologicznej.

Celami zbioru powiązanych tematycznie publikacji naukowych stanowiących rozprawę doktorską były:

1. Opracowanie algorytmu informatycznego do oceny ilościowej ekspresji białek jądrowych wykrywanych metodą immunohistochemiczną.
2. Porównanie skuteczności opracowanego algorytmu z istniejącymi obecnie rozwiązaniami opartymi na najbardziej aktualnej wiedzy.
3. Ocena skuteczności algorytmu opartego na uczeniu głębokim i wnioskowaniu rozmytym w detekcji jąder komórkowych.
4. Ewaluacja możliwości zastosowania istniejącej aplikacji ImmunoRatio w rutynowej diagnostyce histopatologicznej.
5. Stworzenie kolekcji obrazów preparatów immunohistochemicznych Ki-67 raka piersi oznaczonych metodą referencyjną wraz z obliczonym indeksem proliferacyjnym jako bazy danych dla uczenia i testowania algorytmów.
6. Analiza różnic w ocenie indeksu proliferacyjnego pomiędzy patologami (interobserver variability).

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska obejmuje 3 publikacje o zasięgu międzynarodowym i łącznym Impact Factor IF:6.846, pkt. MNiSW/KBN/MNiE 175.

UNIwersYTET MEDYCZNY w BIAŁYMSTOKU
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII OGÓLNEJ

15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 13
e-mail: sekretariat_zpo.amb@op.pl

tel. i fax: (085) 748 59 96
centr. AMB (085) 748 54 00

1. Proliferation index evaluation in breast cancer using ImageJ and Immuno Ratio applications. **Łukasz Fuławka**, Agnieszka Hałoń. Anticancer Res. 2016 Vol.36/no.8 /s.3965-3972
2. Ki-67 evaluation in breast cancer: the daily diagnostic practice. **Łukasz Fuławka**, Agnieszka Hałoń. Indian J.Pathol.Microbiol. 2017 Vol.60 no.2 s.177-184
3. Assessment of Ki-67 proliferation index with deep learning in DCIS (ductal carcinoma in situ). **Łukasz Fuławka**, Jakub Błaszczyk, Martin Tabakov, Agnieszka Hałoń. Sci. Rep. 2022 Vol.12 art.3166 [12 s.]

W pracy pierwszej "Proliferation index evaluation in breast cancer using ImageJ and Immuno Ratio applications"

Autorzy przeanalizowali grupę 98 pacjentów, u których zdiagnozowano inwazyjnego raka piersi. Z każdego przypadku wykonano cyfrowy obraz gorącego punktu. Wtyczka Cell Counter platformy ImageJ została wykorzystana do precyzyjnego zliczania jąder zabarwionych na brązowo i na niebiesko. Te same obrazy analizowano przy użyciu ImmunoRatio. Wyniki porównano za pomocą współczynników Pearsona i Spearmana. Uzyskując w wynikach Współczynnik korelacji Pearsona na poziomie 0,84 ($p < 0,05$), współczynnik korelacji Spearmana 0,83 ($p < 0,05$). Umiarkowaną zgodność wykazało obliczenie kappa Cohena ($K = 0,47$; $p < 0,05$). Co pozwoliło stwierdzić, że w 26 przypadkach zakwalifikowano guzy do różnych podtypów biologicznych w zależności od metody oceny Indeksu proliferacji (PI). W związku z tym stwierdzono, że ImmunoRatio wymaga dalszych udoskonaleń, aby stać się niezawodnym narzędziem diagnostycznym.

Druga publikacja pt. "Ki-67 evaluation in breast cancer: the daily diagnostic practice"

W tym opracowaniu zaproszono do współpracy czworo patologów i poproszono o ocenę Indeksu proliferacji, ocenianego w praktyce codziennej rutynowej diagnostyki w grupie 98 przypadków raka piersi. Analiza wyników wykazała współczynnik korelacji Pearsona na poziomie 0.77 - 0.84 ($P < 0.001$) oraz współczynnik korelacji rang Spearmana 0.68 - 0.83 ($P < 0.001$). Współczynnik kappa Fleissa dla wartości granicznej 14% wyniósł 0.58, dla 20% - 0.60.

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII OGÓLNEJ

15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 13
e-mail: sekretariat_zpo.amb@op.pl

tel. i fax: (085) 748 59 96
centr. AMB (085) 748 54 00

Natomiast współczynnik kappa Cohena 0.45 - 0.69 dla 14% oraz 0.53 - 0.67 przy 20% punktu odcięcia. Test rang Friedmana wykazał istotne statystycznie rozbieżności pomiędzy oceniającymi patologami ($P < 0.001$). Ponadto zaobserwowano znaczące różnice pomiędzy metodami ewaluacji indeksu proliferacji (PI) stosowanymi przez patologów.

Ostatnia trzecia publikacja Assessment of Ki-67 proliferation index with deep learning in DCIS (ductal carcinoma in situ).

W tym opracowaniu została zgromadzona nową kolekcję 95 wirtualnych preparatów mikroskopowych Ki-67 na bazie retrospektywnej grupy przypadków raka przewodowego in situ (DCIS). Dla każdego z nich wybrano pROI, z których utworzono referencyjną bazę obrazów i przyporządkowanych im wartości indeksu proliferacji (PI), wyliczonych za pomocą metodologii (ImageJ). Celem tego etapu badań było opracowanie algorytmu do precyzyjnego określania PI w obrazach mikroskopowych.

Baza obrazów została losowo podzielona na 4 grupy: 3 zbiory uczące po 25 obrazów oraz jeden zbiór testowy zawierający 20 obrazów. Okazało się, że proponowana metoda wykorzystuje głębokie uczenie oraz teorię zbiorów rozmytych (fuzzy-set theory). Uzyskane ROI jest wykorzystywane do segmentacji właściwie rozpoznanych jąder komórek nowotworowych za pomocą klasycznych metod przetwarzania obrazów. Wartość PI jest szacowana na podstawie obliczenia stosunku powierzchni zajmowanej przez immunopoztywne jądra do całkowitej powierzchni jąder rozpoznanych komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki porównano z wartościami referencyjnymi. W celu zwiększenia skuteczności algorytmu, modele były uczone w trzech turach, podczas których porównywano wpływ różnych hiperparametrów.

Wykazano, że zastosowanie segmentacji komórek poprzez ROI oparte na sieciach neuronowych znacząco poprawia końcowe wyniki ewaluacji PI (zmniejszenie MAE z poziomu 0.17 do 0.024–0.11). Ponadto rozmiar okna ma istotny wpływ na poprawność oceny PI (MAE 0.02 vs. 0.11 dla modelu zespolonego). Dowiedziono, iż implementacja metody Otsu powoduje w większości przypadków zmniejszenie liczby niedopasowanych segmentacji tła, a zatem znacząco obniża błąd oceny PI z poziomu 0.058 na 0.034 (dla pojedynczego modelu z oknem 96 px). Co wskazuje, że opracowany algorytm przewyższa skutecznością inne najbardziej aktualne rozwiązania.

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII OGÓLNEJ

15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 13
e-mail: sekretariat_zpo.amb@op.pl

tel. i fax: (085) 748 59 96
centr. AMB (085) 748 54 00

Przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantowi na wyciągnięcie następujących wniosków.

1. Opracowany algorytm do określania PI w obrazach mikroskopowych przewyższa skutecznością istniejące rozwiązania oparte na najbardziej aktualnych modelach głębokiego uczenia.

1.1. Model zespolony osiąga wyższą dokładność w porównaniu do niezależnie ocenianych modeli składowych.

1.2. Zastosowanie segmentacji komórek poprzez ROI oparte na sieciach neuronowych znacząco poprawia końcowe wyniki ewaluacji PI.

1.3. Rozmiar okna ma istotny wpływ na poprawność oceny PI.

1.4. Implementacja metody Otsu powoduje zmniejszenie liczby niedopasowanych segmentacji tła.

1.5. Traktowanie wyjścia sieci neuronowej jako reprezentacji rozmytej znacząco zmniejsza wpływ komórek nienowotworowych i artefaktów na ostateczną segmentację komórek.

2. ImmunoRatio wymaga dalszego dopracowania, aby mogło zostać wykorzystane w rutynowej diagnostyce histopatologicznej.

3. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy stosowanymi przez patologów metodami ewaluacji PI oraz potwierdzono znaczącą rozbieżność w wynikach jego oceny (interobserver variability).

Ostatnie lata znacząco wskazują na udział sztucznej inteligencji, w medycynie. Dostępne na rynku oprogramowania wspomagające diagnostykę radiologiczną, patomorfologiczną, wydają się kreować przyszłość i stawiać nieodzowne wyzwania dla lekarzy we współpracy z informatykami.

UNIwersYTET MEDYCZNY w BIAŁYMSTOKU
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII OGÓLNEJ

15-269 Białystok, ul. Waszyngtona 13
e-mail: sekretariat_zpo.amb@op.pl

tel. i fax: (085) 748 59 96
centr. AMB (085) 748 54 00

Podsumowując, oceniam pozytywnie wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej, należy podkreślić, że podjęty temat jest niezwykle istotny, natomiast eksperymenty zostały zaprojektowane i przeprowadzone skrupulatnie i prawidłowo, uzyskane wyniki odzwierciedlają założenia i cele pracy. Niniejsza praca doktorska wskazuje na znakomite przygotowanie teoretyczne Autora oraz opanowanie przez niego warsztatu badawczego i umiejętności krytycznej analizy uzyskanych wyników. Przedstawiona do oceny praca doktorska pt.: **„Wykorzystanie metod komputerowej analizy obrazu do oceny indeksu proliferacyjnego w raku piersi”** spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Zgodnie z podstawą prawną art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) oraz art.179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r., postępowanie o nadanie stopnia doktora prowadzone jest na podstawie ustawy z dnia 20 lipca 2018r.prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 zezm.),dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana lekarza Łukasza Fuławkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Zakład Patomorfologii Ogólnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Prof. dr hab. n. med.
Katarzyna Guzińska-Ustymowicz