

Perspektywy rozwoju cyfrowej patomorfologii

Monika Prochorec-Sobieszek

Postęp technologiczny umożliwił wprowadzenie w patomorfologii innowacyjnych rozwiązań opartych na cyfrowym obrazowaniu, co umożliwi naśladowanie konwencjonalnej mikroskopii wersją cyfrową. Cyfrowa patomorfologia określana jako „wirtualna mikroskopia” polega na tworzeniu, przeglądaniu, zarządzaniu, dzieleniu się, analizie i interpretacji obrazów cyfrowych całych preparatów mikroskopowych (WSI — *whole slide imaging*). Systemy WSI i cyfrowe platformy konsultacyjne znalazły zastosowanie w edukacji, badaniach naukowych, telepatologii/telekonsultacjach i diagnostyce. Pozwalają one na łatwe i interaktywne dzielenie się obrazami cyfrowymi preparatów mikroskopowych oraz integrację z innymi medycznymi systemami informatycznymi. Oprogramowania do analizy obrazu i komputerowego wspomaganie diagnozy wspierają dokładność diagnostyczną oraz ułatwiają standaryzację wyników badań naukowych. Pomimo wielu zalet mikroskopii wirtualnej trzeba pamiętać o jej ograniczeniach, obejmujących duże inwestycje w sprzęt i oprogramowanie, problemy ze standaryzacją jakości obrazów cyfrowych i przede wszystkim obawy patomorfologów przed rutynową diagnostyką cyfrową.

Future perspectives of digital pathology

Technological advances have enabled innovative solutions to be achieved in pathology based on digital imaging, now superseding those of conventional microscopy. Digital pathology has been defined as ‘virtual microscopy’ and depends on computer-generated digital imaging of microscope slides (WSI — *whole slide imaging*) which are in turn created, reviewed, managed, shared, analysed and interpreted. Such WSI systems and digital consulting platforms are now used for teaching, scientific research, telepathology /teleconsultation and diagnosis. They also permit easy and interactive sharing of WSI that can be integrated into other medical information systems. The software for automated image analysis and computer aided diagnosis can thereby make highly accurate diagnoses and help standardise study findings. Despite the technique’s many advantages, its noted drawbacks include high equipment and software costs, image quality issues of standardisation and most importantly, that pathologists are reluctant to use it routinely for making diagnoses.

Biuletyn PTO NOWOTWORY 2016; 1, 1: 1–9

Słowa kluczowe: patomorfologia cyfrowa, obrazy cyfrowe całych preparatów mikroskopowych, telepatologia/telekonsultacje, edukacja, badania naukowe, archiwizacja, diagnostyka cyfrowa, technologie IT

Key words: digital pathomorphology, whole slide images, telepathology/teleconsultation, education, research, archiving, digital diagnostics, IT technologies

Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Artykuł w wersji pierwotnej:

Prochorec-Sobieszek M. Future perspectives of digital pathology. *NOWOTWORY J Oncol* 2016; 66: 277–284.

Należy cytować wersję pierwotną.

Wstęp

Jakość opieki nad chorymi na choroby nowotworowe rozpoczyna się na poziomie komórki i jest ściśle związana z prawidłowym rozpoznaniem patomorfologicznym, uwzględniającym czynniki prognostyczne i predykcyjne. Pomimo kluczowej roli, jaką odgrywa patomorfolog w rozpoznawaniu nowotworów, patomorfologia na razie nie korzysta szeroko z postępu, jaki nastąpił w technologiach informatycznych — w odróżnieniu od radiologii, urologii i kardiologii. Cyfryzacja w patomorfologii sprowadza się do zastosowania do różnych celów cyfrowych obrazów całych preparatów mikroskopowych (WSI — *whole slide imaging*). WSI, często określana jako „wirtualna mikroskopia”, polega na naśladowaniu konwencjonalnej mikroskopii wersją komputerową. Praktycznie składa się z dwóch procesów. Pierwszy opiera się na tworzeniu obrazów cyfrowych z preparatów mikroskopowych przy użyciu skanera. W drugim wykorzystuje się specjalistyczne oprogramowanie (dedykowane przeglądarki) do oglądania i analizy cyfrowych obrazów [1, 2]. Patomorfologię cyfrową można ogólnie zdefiniować jako tworzenie, przeglądanie, zarządzanie, dzielenie się, analizę i interpretację obrazów cyfrowych preparatów mikroskopowych. Zastosowania te obejmują między innymi edukację, badania naukowe, archiwizację, telepatologię/telekonsultacje i rutynową diagnostykę. Cyfrowa transformacja w patomorfologii jest możliwa dzięki ciągłej modernizacji urządzeń skanujących, zwiększaniu mocy obliczeniowych komputerów i prędkości transmisji danych, wprowadzaniu nowych rozwiązań w oprogramowaniach oraz technologii gromadzenia dużych ilości informacji. Jedną z ważnych zalet cyfryzacji w patomorfologii jest możliwość lepszej integracji procesu rozpoznawania i leczenia nowotworów przez ułatwienie współpracy z zespołami lekarzy innych specjalności zajmującymi się diagnostyką i leczeniem tych chorób [1–11].

Podstawą patomorfologii jest interpretacja obrazów komórek i tkanek w rozdzielczości wyższej niż rozdzielczość ludzkiego oka. Przez długi czas mikroskop świetlny był jedynym dostępnym przyrządem stosowanym do tego celu. Warunki oceny preparatów mikroskopowych poprawiały się wraz z coraz lepszą optyką urządzeń i wiązały się ze zwiększeniem rozdzielczości obrazów mikroskopowych [12]. W rutynowej diagnostyce patomorfologicznej nadal standardem jest ocena preparatów w mikroskopie świetlnym. W ciągu ostatnich lat techniki optyczne w patomorfologii zaczęły się stopniowo zmieniać przez instalację w mikroskopach świetlnych aparatów cyfrowych do zdjęć statycznych i kamer wideo umożliwiających ocenę preparatów mikroskopowych w czasie rzeczywistym. Technika ta pozwoliła na wprowadzenie telekonsultacji obrazów mikroskopowych poprzez sieć komputerową między patomorfologami znajdującymi się w odległych lokalizacjach oraz na zdalne wykonywanie badań śródoperacyjnych, obrazy jednak charakteryzowały się stosunkowo niską rozdzielczością [13–16]. Od około

dziesięciu lat postęp techniczny umożliwił wprowadzenie skanerów, za pomocą których można wykonywać cyfrowe zdjęcia całych preparatów mikroskopowych (WSI). Łączą one zalety obrazów z kamer pracujących w czasie rzeczywistym (dostępność całych preparatów) i aparatów cyfrowych (wysoka rozdzielczość) [12, 16].

Pomimo wielu zalet mikroskopii wirtualnej trzeba pamiętać o jej ograniczeniach, co ma szczególne znaczenie przy wprowadzaniu cyfryzacji w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej. Niniejszy artykuł omawia zalety i wady tej technologii oraz zastosowania w praktyce klinicznej i nieklinicznej.

Technologie

Technologicznie podstawą patologii cyfrowej są systemy WSI, które obejmują skanery i urządzenia infrastruktury IT. W skład skanera wchodzi: mikroskop optyczny, jeden lub kilka aparatów cyfrowych do robienia zdjęć, zwykle i fluorescencyjne źródła światła, robot do ładowania i podawania preparatów mikroskopowych, stacja robocza oraz oprogramowanie umożliwiające przeglądanie zdjęć w różnych kierunkach i powiększeniach, w sposób porównywalny z zastosowaniem konwencjonalnej mikroskopii. Urządzenia infrastruktury IT zawierają komputer z oprogramowaniem do pozyskiwania i obróbki obrazów oraz do zarządzania plikami obrazów, serwer wraz z pamięcią zewnętrzną do przechowywania obrazów cyfrowych oraz bezpieczną i stabilną sieć komputerową, zapewniającą łączność pomiędzy stacjami roboczymi, serwerami i pamięciami zewnętrznymi przechowującymi zeskanowane obrazy [4].

Skanery preparatów mikroskopowych

Na rynku dostępne są skanery różnych producentów, które różnią się parametrami technicznymi. Jednym z nich jest pojemność, określana liczbą jednocześnie załadowanych szkiełek mikroskopowych. W skanerach wykorzystuje się też różne techniki tworzenia obrazów — skanowanie liniowe, które polega na precyzyjnym liniowym przesuwie statywu z kamerą nad preparatem i skanowanie linia po linii, lub skanowanie z użyciem kamery CCD (*charge coupled device*), która wykonuje cyfrowe zdjęcia kolejnych drobnych, kwadratowych pól obszaru preparatu. Pod koniec procesu linie lub kwadratowe pola są scalane ze sobą, dając w rezultacie ostateczny cyfrowy obraz preparatu [12]. Skanery są wyposażone w obiektywy o różnych powiększeniach i numerycznych aperturach, najczęściej o 20- i 40-krotnym powiększeniu. Cześć skanerów ma możliwość wykonywania skanowania wielowarstwowego w technologii *z-stacking*. Chociaż wykonanie obrazu 3D znacznie wydłuża czas skanowania, jego zaletą jest możliwość oceny rozmazów cytologicznych, skrawków mrożonych oraz innych grubych preparatów, gdzie istnieje potrzeba oceny na różnych poziomach. Ocena mitoz jest również łatwiejsza przy oglądaniu

preparatu w wielu płaszczyznach. Skanery są często wyposażane we fluoroscencyjne źródło światła i wiele innych czujników poprawiających jakość skanowanego obrazu. Skanery te umożliwiają wykonywanie skanów komórek i tkanek, których poszczególne struktury oznaczone są barwnikami fluoroscencyjnymi, oraz konwertowanie ich do wysokiej rozdzielczości kolorowych obrazów. Skanery różnią się też formatami plików zawierających zeskanowane obrazy i obejmują format zamknięty, który często jest własnością producenta, oraz format otwarty — może być to standard jpeg 2000 albo standard DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) z kompresją do jpeg (2000) [17].

Ze względu na konieczność uzyskania dużej rozdzielczości i precyzji w odwzorowaniu szczegółów preparatów mikroskopowych obrazy cyfrowe WSI mają dość duży rozmiar, który wynosi od kilkunastu MB (*megabyte*) do kilkudziesięciu GB (*gigabyte*). Wielkość plików zależy również od powierzchni tkanki znajdującej się w preparacie mikroskopowym. Typowy obraz cyfrowy w rozdzielczości 1600 megapikseli ma rozmiar około 4,6 GB [10]. Obrazy WSI są znacznie większe od plików cyfrowych używanych w radiologii [18]. Istnieją różne techniki redukcji rozmiarów tych ogromnych plików, np. algorytmy redukujące obszar skanowania do rozmiarów wykrytej tkanki oraz metody kompresji obrazu [4]. Czas skanowania preparatów mikroskopowych zależy od rozmiarów tkanki znajdującej się na szkiełku i poszczególnych etapów pracy skanera, które obejmują obsługę szkiełek z preparatami, proces skanowania i zadania końcowe scalające obraz cyfrowy. Wykonanie jednowarstwowych skanów preparatów o wymiarach 15 × 15 mm przy 40-krotnym powiększeniu zajmuje od kilku do kilkudziesięciu minut w zależności od typu skanera [19].

Jakość obrazów cyfrowych, od której zależy właściwa ich interpretacja, związana jest z różnymi czynnikami, takimi jak [20]:

- jakość skanowanych preparatów mikroskopowych, zależna od prawidłowego utrwalenia i przeprowadzenia materiału tkankowego oraz pozbawionego wad technicznych procesu skrojenia, zabarwienia i zaklejenia preparatu;
 - jakość technicznego wykonania obrazów cyfrowych w skanerach, zależna od optyki skanerów, metod ogniskowania, zarządzania kolorami, balansem bieli i kontrastem;
 - dokładność scalania obrazów składowych i stopień kompresji po wykonaniu obrazów cyfrowych;
 - kompletność końcowego obrazu cyfrowego, który powinien zawierać wszystkie fragmenty tkanki znajdujące się w preparacie mikroskopowym;
 - jakość wyświetlacza komputera albo projektora użytego do prezentacji obrazu cyfrowego. Czynniki z tym związane to m.in. rozdzielczość ekranu, dokładność odwzorowania kolorów, jasność i kontrast;
- czynniki obejmujące obsługę i prezentację obrazów cyfrowych, zależne od zastosowanych przeglądark (płynność przewijania, możliwość użycia zmiennego ogniskowania) lub infrastruktury IT (krótkie czasy dostępu).

Obrazy cyfrowe mają następujące zalety w stosunku do tradycyjnej techniki mikroskopowej [3]:

- ich jakość nie zmienia się w czasie;
- mogą być oglądane jednocześnie przez wielu patomorfologów na całym świecie za pośrednictwem internetu;
- mogą być udostępniane do cyfrowej analizy obrazu i pomiarów morfometrycznych;
- są bardziej mobilne niż szkiełka mikroskopowe i mogą być łatwo pozyskiwane z cyfrowych archiwów do różnych celów klinicznych i nieklinicznych;
- mogą być łatwo zintegrowane z innymi elektronicznymi rekordami chorego;
- przeglądarka obrazów cyfrowych pozwala na oglądanie kilku obrazów jednocześnie, co ułatwia porównanie wybranych struktur w różnych barwieniach;
- istnieje możliwość jednoczesnej obserwacji na monitorze podglądu obrazu i właściwego obrazu w większym powiększeniu, co pozwala na lepszą orientację i łatwą nawigację w interesujące pola preparatu.

Infrastruktura IT

Po zeskanowaniu obrazy cyfrowe preparatów mikroskopowych są przekazywane użytkownikom i przesyłane do laboratoryjnego systemu informatycznego (LIS — *laboratory information system*). Konieczna jest integracja z LIS. Identyfikację i archiwizację obrazów oraz integrację z LIS umożliwia zastosowanie barkodów. Do przechowywania plików obrazów WSI niezbędna jest pamięć masowa o odpowiedniej pojemności. Wielkość pamięci zależy od docelowego zastosowania obrazów cyfrowych. Przechowywanie ograniczonej liczby obrazów do celów konsultacyjnych, naukowych czy edukacyjnych nie wymaga zbyt dużej ilości pamięci, natomiast skanowanie na dużą skalę, np. wszystkich przypadków w średniej wielkości laboratorium, wymaga środowiska z ogromną przestrzenią pamięci zewnętrzną, nawet do 50 TB (*terabyte*) na rok, bez przestrzeni na kopie zapasowe, tzw. *backup* [19]. W zależności od liczby skanerów oraz liczby użytkowników może być wymagane zastosowanie kontrolerów i połączeń światłowodowych. Szybki dostęp do danych może zapewnić rozwiązanie z użyciem dysków w technologii SSD (*solid-state drive*). Ponieważ nie wszystkie obrazy cyfrowe muszą być dostępne natychmiastowo, starsze obrazy mogą być archiwizowane na wolniejszych, ale tańszych mediach, jakimi są taśmy magnetyczne. Wpływ na ocenę cyfrowych obrazów ma jakość użytych wyświetlaczy. Rozdzielczość jest w tym wypadku najważniejszym parametrem, który determinuje jakość obrazu i wielkość przedstawianego pola. Monitory

o rozdzielczości 1600 × 1200 pikseli są w stanie wyświetlić zaledwie około 20% całości obrazu możliwego do obejrzenia w mikroskopie [21]. Na jakość obrazów cyfrowych ma również wpływ kalibracja kolorów, kontrast i jasność. Przepustowość sieci również stanowi ograniczenie w przekazywaniu obrazów i musi być odpowiednio duża do szybkiego przesyłania dużych plików zawierających obrazy cyfrowe. Zwykle przepustowość sieci 100 Mbs (*megabits per second*) jest wystarczająca. Większość przeglądarek stosuje wydajne mechanizmy w celu zapewnienia właściwej szybkości przeglądania obrazów. Zamiast ściągania całych plików obrazowych są dociągane jedynie jego wycinki z interesującą częścią całego obrazu z pamięci dyskowych. Następnie taka informacja jest składowana w pamięci podręcznej, w celu szybszego dostępu do niej przy kolejnych, późniejszych odwołaniach. Wiele przeglądarek wyświetla najpierw obraz w mniejszej rozdzielczości, zanim dociągnie wszystkie szczegóły do prezentacji obrazu w wysokiej rozdzielczości. W przypadkach kiedy obrazy muszą być dostępne dla wielu użytkowników jednocześnie (np. w przypadku cyfrowych sesji konsultacyjnych lub kursów), stosowane są specjalnie skonfigurowane serwery, realizujące mechanizmy udostępniania obrazów z pamięci podręcznej. Obecnie większość producentów zapisuje skanowane obrazy w plikach z użyciem własnych formatów. Niestandardowe formaty stanowią niedogodność dla użytkowników końcowych, ponieważ wymaga to instalacji dedykowanych przeglądarek, co stanowi duże utrudnienie na rynku cyfrowej mikroskopii. Dlatego proponuje się ujednoczenie formatu do jpeg 2000 [22].

Zastosowanie obrazów cyfrowych w patomorfologii

Coraz lepsza rozdzielczość obrazów cyfrowych, większa szybkość skanowania, łatwość obsługi przeglądarek i możliwość przesyłania obrazów na odległość (telepatologia) spowodowały, że systemy WSI znalazły wiele zastosowań w patomorfologii [4]. Pomimo wielu zalet tej technologii obrazy cyfrowe są w tej chwili wykorzystywane praktycznie głównie do aplikacji niezwiązanych bezpośrednio z diagnostyką, takich jak edukacja, archiwizacja, spotkania multidyscyplinarne oraz badania naukowe. Z zastosowań diagnostycznych przyjęły się telekonsultacje i zdalne wykonywanie badań śródoperacyjnych. Rutynowa patomorfologiczna diagnostyka cyfrowa nie jest w chwili obecnej tak szeroko akceptowana i rozpowszechniona jak cyfrowa diagnostyka radiologiczna [23].

Cyfrowa diagnostyka

Obecny stan techniki pozwala już na prowadzenie rutynowej diagnostyki cyfrowej, jednak jedynie nieliczne laboratoria na świecie są całkowicie ucyfrowione. Powody są różne. Obsługa laboratoryjnej linii technologicznej zakończonej wytworzeniem WSI zajmuje więcej czasu niż tradycyjna

organizacja pracy, ponieważ wiąże się z dodatkową procedurą wykonania obrazów cyfrowych. Pomimo wielu zalet diagnostyki cyfrowej większość patomorfologów czuje się bezpieczniej, diagnozując przy użyciu mikroskopów świetlnych, szczególnie, jeśli ich edukacja przebiegała w sposób konwencjonalny [23]. Pomimo udogodnień związanych z automatyczną analizą obrazu za pomocą mikroskopów świetlnych diagnozuje się szybciej i łatwiej niż przy użyciu komputerów. Randell i wsp. [24] wykazali, że rutynowa diagnostyka wykonywana przez patomorfologa przy użyciu narzędzi cyfrowych jest średnio o 60% wolniejsza niż diagnostyka mikroskopowa. Przy wprowadzaniu rutynowej diagnostyki cyfrowej potrzebne są duże inwestycje w strukturę IT obejmujące sprzęt i oprogramowanie oraz konieczne jest dodatkowe szkolenie personelu [19]. Należy wziąć pod uwagę, że nawet najnowocześniejsze skanery ciągle nie obejmują w pełni wszystkich funkcjonalności nowoczesnych mikroskopów optycznych [23].

Zgodnie z dostępnym piśmiennictwem w zakładach patomorfologii, w których wprowadzono rutynową diagnostykę cyfrową, wykazano wysoką korelację z diagnostyką wykonywaną z użyciem konwencjonalnej mikroskopii; procent błęd wynosił ok. 1–5% [24–32]. Rozbieżności między oceną obrazów cyfrowych i konwencjonalnych szkiełek mikroskopowych wynikały głównie z gorszej jakości obrazu i braku doświadczenia patomorfologa w tej technice. W holenderskim laboratorium w Heerlen podczas skanowania 20% biopsji chirurgicznej zgodność rozpoznania wynosiła 82,1% [33]. Czas potrzebny do oceny obrazów cyfrowych wydaje się być powracającym tematem w wielu publikacjach. Mniejsze biopsje zajmują mniejszą powierzchnię na szkiełku i zazwyczaj szybciej się je skanuje i potem ogląda. Digitalizacja większych skrawków tkankowych nie tylko zajmuje więcej czasu, ale preparat może wykraczać poza szkiełko nakrywkowe, co sprawia trudności z uzyskaniem odpowiedniej ostrości przy skanowaniu. Należy zwrócić uwagę, że słabo zabarwione małe wycinki tkankowe nie zawsze są „zauważone” przez systemy skanujące, chociaż badania wykazują, że systemy WSI mogą być efektywnie stosowane również przy biopsjach gruboigłowych [34].

WSI może być także wykorzystywane w cytopatologii, chociaż aktualnie bardziej do celów edukacyjnych niż diagnostycznych. Wynika to z trudności właściwego skanowania rozmazów cytologicznych, które ze względu na grubość preparatów wymagają obserwacji w wielu płaszczyznach [35]. W celu uzyskania odpowiednich jakościowo obrazów cyfrowych konieczne jest długotrwałe skanowanie w technice z-stacking [36].

Jednym z ważnych udogodnień patologii cyfrowej jest możliwość zastosowania w diagnostyce cyfrowej analizy obrazu, która może poprawić precyzję rozpoznania w patomorfologii. Oprogramowania do obliczeń ilościowych oznaczanych immunohistochemicznie ekspresji białek na

podstawie obrazów cyfrowych poprawiają obiektywną ocenę immunoreaktywności [37]. Najczęściej spotykanym zastosowaniem aplikacji do analizy obrazu w ocenie barwień immunohistochemicznych jest zintegrowana ocena ekspresji receptorów estrogenowych, progesteronowych, białka HER2/Neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) i indeksu proliferacyjnego Ki67 w raku piersi [38]. Analiza oparta na obrazach WSI zapewnia wyższy wskaźnik zgodności oceny ekspresji HER2/Neu z wynikami amplifikacji genu metodą FISH (*fluorescence in situ hybridization*) w raku piersi niż tradycyjna ocena w mikroskopie [39]. Jednak analiza cyfrowa nie jest w pełni skuteczna we wszystkich aplikacjach; w ocenie liczby figur podziału, stosując najbardziej zaawansowane oprogramowanie do analizy obrazu, osiągnięto 80–85-procentową zgodność w porównaniu z konwencjonalną mikroskopią [40]. Omówiona powyżej analiza cyfrowa jest bardzo przydatnym narzędziem informatycznym, jednak ocena ilościowa immunohistochemii stanowi jedynie niewielki procent całej diagnostycznej pracy patomorfologa.

Ostatnio obserwuje się duże zainteresowanie aplikacjami informatycznymi komputerowego wspomaganie diagnozy (CAD, *computer-aided diagnosis*), które działają w oparciu o systemy WSI [41–43]. Łącząc WSI z narzędziami do automatycznej analizy obrazu, można obiektywnie oceniać czynniki mające znaczenie w kwalifikacji chorych do odpowiednich terapii, takie jak stopniowanie histologiczne nowotworów (*grading*) [44], oraz automatycznie wybierać obszary do analizy w celu oceny tzw. „hot spotów” (najbardziej aktywnych proliferacyjnie obszarów nowotworów) [45]. W celu wspomaganie diagnozy w patomorfologii prowadzono także badania nad systemami wyszukiwania i porównywania obrazów z baz cyfrowych, jednak jak dotychczas nie znalazły one zastosowania w rutynowej diagnostyce [46].

Telepatologia

Diagnostyka cyfrowa z użyciem telepatologii, czyli przesyłania obrazów cyfrowych na odległość, obejmuje głównie konsultacje trudnych diagnostycznie przypadków (tzw. *second opinions*) oraz zdalne wykonywanie badań śródoperacyjnych. Cyfrowa szybka diagnostyka z materiałów mrożonych stanowi wsparcie dla szpitali, w których nie ma możliwości wykonywania badań śródoperacyjnych z powodu braku patomorfologów. Telepatologia umożliwia również wykonywanie telekonsultacji. Zaletą tej technologii jest skrócenie czasu badania; mogą być one przeprowadzone w ciągu kilku godzin w porównaniu z tradycyjnym przesyłaniem preparatów pocztą, co zajmuje zwykle kilka dni. Technologia ta polega na zastosowaniu specjalistycznych oprogramowań, tzw. platform cyfrowych, gdzie patomorfolog przez połączenie z internetem może przesłać swój przypadek w formie obrazu cyfrowego do innego konsultującego patomorfologa. Możliwe jest omówienie przy-

padku przez Internet, gdzie jedna strona konsultuje i może przesłać obraz oraz zmieniać powiększenia, podczas gdy inni uczestnicy mogą oglądać obrazy na ekranach swoich komputerów, tabletów i smartfonów w czasie rzeczywistym. W podobny sposób mogą odbywać się spotkania ekspertów z różnych stron świata w określonych specjalistycznych obszarach patologii w celu omówienia trudnych przypadków. System WSI pozwala patomorfologom na pracę zdalną, np. z domu lub z dowolnego miejsca na świecie [47, 48].

Spotkania multidyscyplinarne

Ważnym zastosowaniem systemów WSI, szczególnie dla chorych na nowotwory, są spotkania zespołów multidyscyplinarnych. Patomorfolodzy, omawiając przypadki chorych z lekarzami innych specjalności (onkologami, chirurgami, radiologami), mogą prezentować w dowolnym miejscu na ekranach komputerów obrazy cyfrowe preparatów mikroskopowych z funkcjonalnościami zmiany powiększeń, przesuwania obrazów, dostępnymi w mikroskopach świetlnych, oraz wykonywania adnotacji [3].

Kontrola jakości

Kolejnym przykładem zastosowania telepatologii i obrazów WSI są zewnętrzne kontrole jakości barwień i rozpoznania histopatologicznych. W celu ich zapewnienia dokonuje się weryfikacji wybranych przypadków w jednostkach zajmujących się akredytacją. Wysyłanie preparatów mikroskopowych zwykłą pocztą zajmuje dużo czasu i jest zagrożone zaginięciem lub uszkodzeniem preparatów. Wykonanie tego zadania metodą cyfrową przyspiesza ten proces i eliminuje potrzebę wysyłania preparatów. Obecnie niektóre cyfrowe platformy WSI posiadają oprogramowania do wewnętrznej kontroli jakości obrazów cyfrowych preparatów mikroskopowych [48].

Walidacja

Zastosowanie systemu WSI w rutynowej diagnostyce wymaga walidacji. Konieczne jest wykazanie równoważności diagnostyki opartej na obrazach cyfrowych z diagnostyką konwencjonalną, opartą na ocenie w mikroskopie świetlnym. Na wynik zgodności obu procesów mają wpływ zarówno parametry sprzętu komputerowego, jak i doświadczenie patomorfologów w diagnostyce cyfrowej. Należy zaznaczyć, że w konwencjonalnej diagnostyce mikroskopowej też istnieją różnice w interpretacji poszczególnych przypadków; wzrastają wraz z ich trudnością. Istnieją rekomendacje dotyczące zastosowania systemu WSI w diagnostyce, m.in. wytyczne Collage of American Pathologists (CAP), Digital Pathology Association, Royal College of Pathologists [49]. Zgodnie z wytycznymi CAP każde laboratorium, które zdecyduje się wykonywać diagnostykę cyfrową, powinno przeprowadzić wewnętrzną kontrolę jakości. Proces walidacji całego systemu WSI powinien być wykonywany przez specjalistów patomorfologów i być przeprowadzony w sposób naśl-

dujący proces rutynowej diagnostyki patomorfologicznej w danym zakładzie patomorfologii. CAP rekomenduje objęcie walidacją co najmniej 60 przypadków jednego rodzaju, np. preparaty tkanek utrwalonych zabarwione hematoksyliną-eozyną, preparaty cytologiczne, skrawki mrożone wykonywane podczas badań śródoperacyjnych. Wybrane przypadki muszą odzwierciedlać zakres badań wykonywanych w rutynowej praktyce zakładu patomorfologii. Podczas walidacji odstęp czasowy pomiędzy oglądaniem szkiełek mikroskopowych i obrazów cyfrowych powinien wynosić co najmniej 2 tygodnie.

Cyfrowa edukacja

Tradycyjnie edukacja w patomorfologii polega na wspólnym oglądaniu preparatów mikroskopowych z użyciem mikroskopów dwu- lub wielostanowiskowych, co ogranicza liczbę studentów lub patomorfologów mających jednocześnie dostęp do preparatów. Oprócz oglądania preparatów pod mikroskopem możliwa jest również edukacja poprzez oprogramowanie szkoleniowe z wpisanymi statycznymi zdjęciami cyfrowymi preparatów mikroskopowych. Edukacja stała się jednym z pierwszych zastosowań technologii i platform WSI poprzez łatwość tworzenia i zarządzania repozytoriami obrazów cyfrowych. Systemy WSI dostarczają ten sam cyfrowy obraz preparatów mikroskopowych wykładowcy i nielimitowanej liczbie studentów, nawet w odległych lokalizacjach. W ten sposób platformy cyfrowe spełniają funkcję mikroskopu wielostanowiskowego i jednocześnie przy użyciu profesjonalnego oprogramowania obrazy są bardziej interaktywne przez możliwość wykonywania notatek, zadawania pytań, korzystania z linków, klipów audio/wideo oraz testów *on-line* pozwalających uzyskać odpowiednie certyfikaty w edukacji przed- i podyplomowej. Edukacja cyfrowa ma charakter bardziej wystandaryzowany, ponieważ materiały szkoleniowe obejmujące zestawy obrazów cyfrowych preparatów mikroskopowych są takie same dla wszystkich studentów i patomorfologów. Repozytoria obrazów cyfrowych mają szczególne znaczenie edukacyjne w przypadku chorób rzadkich, małych biopsji, preparatów cytologicznych i unikalnych przypadków konsultacyjnych, gdzie trudno jest wykonać preparaty mikroskopowe dla licznych studentów. Inwestycje w systemy edukacyjne oparte na WSI są opłacalne ekonomicznie, ponieważ uniwersytety nie muszą kupować setek mikroskopów i przygotowywać kolekcji szkiełek mikroskopowych, które łatwo ulegają uszkodzeniu. Ponadto studenci nie są już przywiązani do laboratorium w szkole medycznej — mogą korzystać zdalnie z repozytoriów w dowolnym miejscu i czasie, używając komputerów, tabletów oraz smartfonów mających połączenie z Internetem po zalogowaniu się na platformy cyfrowe z dostępem do materiałów edukacyjnych.

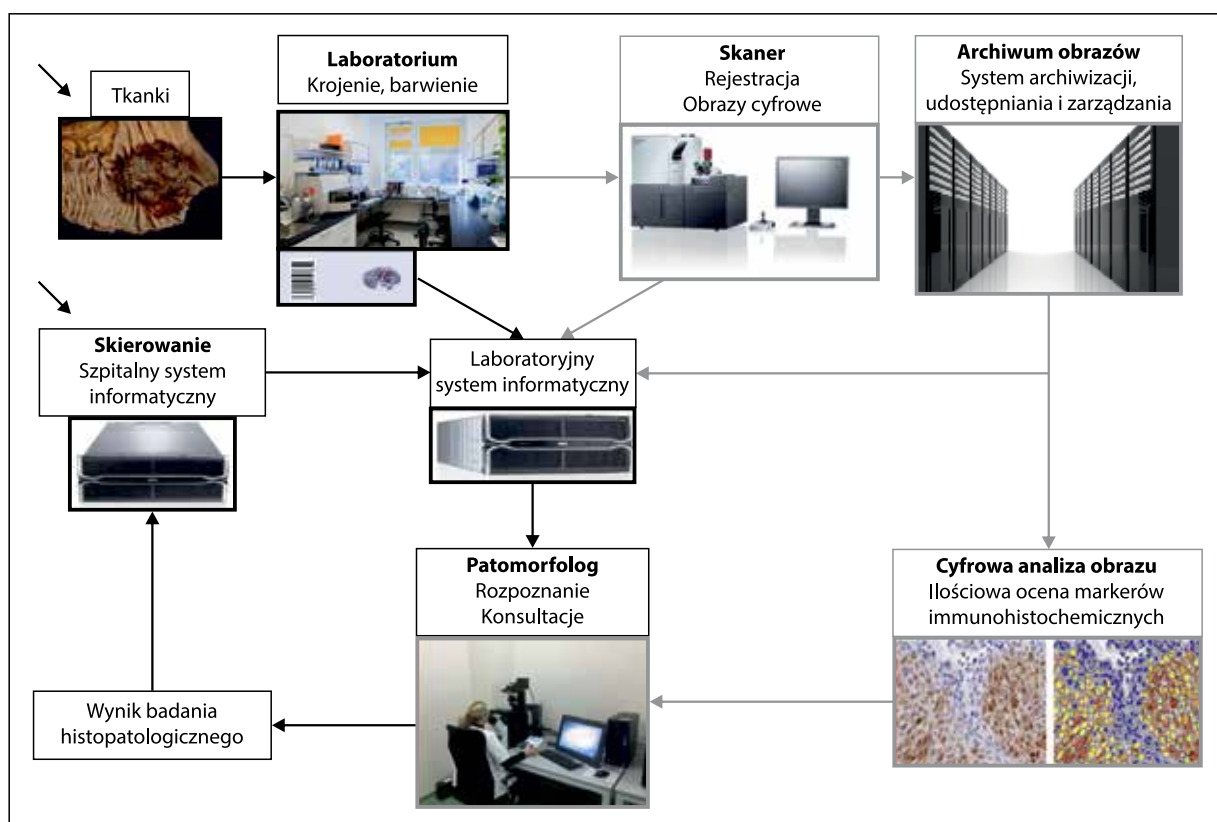
Edukacja cyfrowa posiada również pewne ograniczenia. Studenci i patomorfolodzy opierają swoją wiedzę na obrazach cyfrowych, nie używając mikroskopów, co w przyszłości może mieć wpływ na jakość diagnozy w mikroskopie świetlnym. Edukacja cyfrowa jest całkowicie uzależniona od dobrze funkcjonującej infrastruktury IT i jakkolwiek awaria może spowolnić system i wpłynąć na proces nauczania. Ponadto rozdzielczość obrazów WSI z dobrego skanera może być słabsza niż rozdzielczość obrazów w dobrym mikroskopie, chociaż wydaje się, że jest wystarczająco dobra do prowadzenia szkoleń z ich użyciem. Użytkownicy systemów WSI bywają niezadowoleni z prędkości pracy przeglądarek i opóźnień w ściąganiu ogromnych plików z obrazami w wolno pracującej sieci.

Laboratoria prowadzące edukację przy użyciu wirtualnej mikroskopii istnieją na wielu uniwersytetach na całym świecie. Wydaje się, że studenci szybko zaakceptowali system nauczania z użyciem obrazów WSI, przedkładając go nad konwencjonalną edukację z zastosowaniem mikroskopów. Rezultaty testów i egzaminów po prowadzonych wirtualnie szkoleniach były podobne [50–52].

Cyfrowa archiwizacja

Archiwizacja w patomorfologii polega na przechowywaniu m.in. szkiełek mikroskopowych. Ten sposób archiwizacji powoduje liczne problemy, takie jak: konieczność posiadania dużych pomieszczeń magazynowych ze wzmocnionymi podłogami, łatwość uszkodzenia kruchych szkiełek mikroskopowych, blaknięcie barwień z upływem czasu oraz kwestie związane z logistyką wypożyczenia i zwrotów preparatów. W porównaniu z tradycyjnymi metodami archiwizowania cyfrowe archiwa preparatów oparte na obrazach WSI posiadają wiele zalet:

- obrazy WSI są przechowywane bez utraty jakości (szczególnie preparaty immunofluorescencyjne);
- istnieje łatwość pobierania z archiwum obrazów WSI do rekonsultacji, celów edukacyjnych, badań naukowych, organizacji spotkań kliniczno-patomorfologicznych i do zewnętrznych kontroli jakości;
- obrazy WSI mogą być włączane w raporty patomorfologiczne i historie chorób pacjentów w informatycznych systemach szpitalnych;
- cyfrowej archiwizacji mogą podlegać preparaty konsultacyjne przed odesłaniem ich do jednostki macierzystej. Takie obrazy cyfrowe są przydatne do ewentualnej analizy porównawczej przy kolejnych badaniach chorych. Stanowią też ciekawy materiał do wykorzystania w celach edukacyjnych;
- często obrazy cyfrowe stanowią jedyną dokumentację chorego po „zeskrobaniu” ze szkiełka materiału komórkowego do badań molekularnych [12].



Rycina 1. Cyfrowa organizacja pracy w Zakładzie Patomorfologii

Badania naukowe

Platformy WSI umożliwiają łatwą i szybką wymianę tysięcy obrazów cyfrowych wraz z adnotacjami pomiędzy naukowcami w ramach krajowych i międzynarodowych projektów naukowych. Największe zastosowanie mają oprogramowania do analizy obrazu wykonujące pomiary morfometryczne i ilościową ocenę ekspresji oznaczonych immunohistochemicznie białek lub amplifikacji genów. Szczególne znaczenie ma analiza obrazów cyfrowych mikromacierzy tkankowych TMA (*tissue microarrays*). Zawarte na jednym szkiełku mikroskopowym, a potem w jednym obrazie cyfrowym próbki od licznych chorych mogą być analizowane całościowo w sposób wystandaryzowany lub każda próbka z osobna może stanowić doskonały materiał do oglądania i analizy indywidualnej. Podstawą badań naukowych są cyfrowe archiwa obrazów, stanowiące hurtownie danych, zawierające ogromne ilości informacji. Są one jeszcze cenniejsze, gdy są zintegrowane z bazą rozpoznaw histopatologicznych oraz z repozytorium tkanek świeżych i utrwalonych, tworząc struktury biobanków [53, 54].

Badania kliniczne

Technologia WSI ma coraz większe znaczenie w badaniach klinicznych. W celu zapewnienia prawidłowego rozpoznania patomorfologicznego i ujednolicenia doce-

lowej populacji pacjentów zgodnie z kryteriami włączenia do próby preparaty mikroskopowe i bloczki parafinowe chorych na nowotwory muszą być powtórnie ocenione w wyznaczonych laboratoriach przez doświadczonych patomorfologów. Obecnie preparaty mikroskopowe przesyłane są pocztą do różnych ośrodków, co wymaga czasu i wydłuża proces kwalifikacji chorych. Wykorzystanie platform WSI i przesyłanie cyfrowych obrazów wraz z możliwością telekonsultacji znacznie skraca, upraszcza i ujednolica proces kwalifikacji. W ramach prób klinicznych, w badanych dużych grupach chorych, istnieje też możliwość wystandaryzowanej oceny ilościowej oznaczonych immunohistochemicznie białkowych celów terapeutycznych przy użyciu aplikacji do automatycznej analizy obrazów cyfrowych [55]. W ten sposób powstają ogromne cyfrowe repozytoria wystandaryzowanych rozpoznań i próbek, które mogą być w przyszłości wykorzystane do dalszych badań nad nowymi celami terapeutycznymi.

Podsumowanie

Technologia WSI stanowi przyszłościowy trend w patomorfologii (ryc. 1). Systemy WSI znalazły wiele nowoczesnych zastosowań w edukacji, diagnostyce i badaniach naukowych. Platformy WSI umożliwiły łatwe i interaktywne dzielenie się obrazami cyfrowymi i lepszą integrację

obrazów cyfrowych z innymi systemami informatycznymi. Udoskonalone oprogramowania do analizy obrazu i komputerowego wspomaganie diagnozy zaakceptowane w rutynowej diagnostyce umożliwią bardziej precyzyjną i powtarzalną ocenę stopniowania w niektórych nowotworach oraz ilościową ocenę biomarkerów o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym. W celu uzyskania diagnostycznej jakości obrazów cyfrowych konieczna jest standaryzacja wykonania preparatów mikroskopowych (utrwalanie, krojenie, barwienie i zaklejenie), jak i standaryzacja wykonania zdjęcia cyfrowego (rozdzielczość, liczba skanowanych warstw i odległość pomiędzy nimi, kalibracja kolorów). Ważny z punktu widzenia użytkowników jest otwarty, jednolity format plików, w których zapisywane są obrazy cyfrowe. Wydaje się, że cyfryzacja w patomorfologii nie przyjmie się tak szybko jak cyfryzacja w radiologii. Ograniczeniem będzie konieczność dużych inwestycji w sprzęt i oprogramowanie, spowolnienie procesu diagnostycznego, trudności w skanowaniu niektórych materiałów oraz przede wszystkim obawy patologów co do wykorzystywania systemów WSI w rutynowej diagnostyce. Wprowadzenie cyfrowej patomorfologii należy rozpocząć od aplikacji nieklinicznych, takich jak edukacja, badania naukowe, archiwizacja i telekonsultacje. Wydaje się, że wprowadzenie cyfrowej patomorfologii do rutynowej diagnostyki wymaga jeszcze ulepszeń technologicznych i zmiany przekonań.

Podziękowania

Podziękowania dla pana mgr. inż. Jerzego Mrozka za wsparcie w zakresie wiedzy technicznej i informatycznej.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Prof. dr hab. n. med. Monika Prochorec-Sobieszek

Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej
Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa
e-mail: monika.prochorec@interia.pl

Otrzymano i przyjęto do druku: 6 kwietnia 2016 r.

Piśmiennictwo

- Pantanowitz L, Valenstein PN, Evans AJ i wsp. Review of the current state of whole slide imaging in pathology. *J Pathol Inform* 2011; 2: 36.
- Leong FJ, Leong AS. Digital photography in anatomical pathology. *J Postgrad Med* 2004; 50: 62–69.
- Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest P. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology* 2012, 61: 1–9.
- Farahani N, Parwani AV, Pantanowitz L. Whole slide imaging in pathology: advantages, limitation, and emerging perspectives. *Pathol Lab Med Int* 2015, 7: 23–33.
- Wiley CA, Murdoch G, Parwani A i wsp. Interinstitutional and interstate teleuropathology. *J Pathol Inform* 2011; 2: 21.
- Evans AJ, Chetty R, Clarke BA i wsp. Primary frozen section diagnosis by robotic microscopy and virtual slide telepathology: the University Health Network experience. *Hum Pathol* 2009; 40: 1070–1081.
- Gifford AJ, Colebatch AJ, Litkouhi S i wsp. Remote frozen section examination of breast sentinel lymph nodes by telepathology. *ANZ J Surg* 2012; 82: 803–808.

- Yagi Y, Gilbertson JR. Digital imaging in pathology: the case for standardization. *J Telemed Telecare* 2005; 11: 109–116.
- Wilbur DC. Digital cytology: current state of the art and prospects for the future. *Acta Cytol* 2011; 55: 227–238.
- Park S, Pantanowitz L, Parwani AV. Digital imaging in pathology. *Clin Lab Med* 2012; 32: 557–584.
- Chlipala E, Elin J, Eichhorn O i wsp. Archival and retrieval in digital pathology systems. *Digital Pathology Association* 2011: 1–10. <https://digitalpathologyassociation.org/>.
- Huisman A, Looijen A, van den Brink SM i wsp. Creation of a fully digital pathology slide archive by high-volume tissue slide scanning. *Hum Pathol* 2010; 41: 751–757.
- Weinstein RS. Innovations in medical imaging and virtual microscopy. *Hum Pathol* 2005; 36: 317–319.
- Teodorovic I, Isabelle M, Carbone A i wsp. TuBaFrost 6: virtual microscopy in virtual tumour banking. *Eur J Cancer* 2006; 42: 3110–3116.
- Weinstein RS. Prospects for telepathology. *Hum Pathol* 1986; 17: 433–434.
- Baak JP, van Diest PJ, Meijer GA. Experience with a dynamic inexpensive video-conferencing system for frozen section telepathology. *Anal Cell Pathol* 2000; 21: 169–175.
- Rojo MG, Garcia GB, Mateos CP i wsp. Critical comparison of 31 commercially available digital slide systems in pathology. *Int J Surg Pathol* 2006; 14: 285–305.
- Hipp JD, Fernandez A, Compton CC i wsp. Why a pathology image should not be considered as a radiology image. *J Pathol Inform* 2011; 2: 26.
- Stathonikos N, Veta M, Huisman A i wsp. Going fully digital: Perspective of a Dutch academic pathology lab. *J Pathol Inform* 2013; 4: 15.
- Glatz-Krieger K, Spornitz U, Spatz A i wsp. Factors to keep in mind when introducing virtual microscopy. *Virchows Arch* 2006; 448: 248–255.
- Treanor D, Jordan-Owers N, Hodrien J i wsp. Virtual reality Powerwall versus conventional microscope for viewing pathology slides: an experimental comparison. *Histopathology* 2009; 55: 294–300.
- Tuominen VJ, Isola J. The application of JPEG2000 in virtual microscopy. *J Digit Imaging* 2009; 22: 250–258.
- Feldman M.D. Whole slide imaging in pathology: what is holding us back? *Pathol Lab Med Int* 2015; 7: 35–38.
- Randell R, Ruddle RA, Mello-Thoms C i wsp. Virtual reality microscope versus conventional microscope regarding time to diagnosis: an experimental study. *Histopathology* 2013; 62: 351–358.
- Thorstenson S, Molin J, Lundström C. Implementation of large-scale routine diagnostics using whole slide imaging in Sweden: digital pathology experiences 2006–2013. *J Pathol Inform* 2014; 5: 14.
- Pantanowitz L, Wiley CA, Demetris A i wsp. Experience with multimodality telepathology at the University of Pittsburgh Medical Center. *J Pathol Inform* 2012; 3: 45.
- Al Habeeb A, Evans A, Ghazarian D. Virtual microscopy using whole-slide imaging as an enabler for teledermatopathology: a paired consultant validation study. *J Pathol Inform* 2012; 3: 2.
- Al-Janabi S, Huisman A, Vink A i wsp. Whole slide images for primary diagnostics in dermatopathology: a feasibility study. *J Clin Pathol* 2012; 65: 152–158.
- Nielsen PS, Lindebjerg J, Rasmussen J i wsp. Virtual microscopy: an evaluation of its validity and diagnostic performance in routine histologic diagnosis of skin tumors. *Hum Pathol* 2010; 41: 1770–1776.
- Leinweber B, Massone C, Kodama K i wsp. Teledermatopathology: a controlled study about diagnostic validity and technical requirements for digital transmission. *Am J Dermatopathol* 2006; 28: 413–416.
- Massone C, Soyer HP, Lozzi GP i wsp. Feasibility and diagnostic agreement in teledermatopathology using a virtual slide system. *Hum Pathol* 2007; 38: 546–554.
- Koch LH, Lampros JN, Delong LK i wsp. Randomized comparison of virtual microscopy and traditional glass microscopy in diagnostic accuracy among dermatology and pathology residents. *Hum Pathol* 2009; 40: 662–667.
- Al-Janabi S, Huisman A, Nap M i wsp. Whole slide images as a platform for initial diagnostics in histopathology in a medium-sized routine laboratory. *J Clin Pathol* 2012; 65: 1107–1111.
- Campbell WS, Hinrichs SH, Lele SM i wsp. Whole slide imaging diagnostic concordance with light microscopy for breast needle biopsies. *Hum Pathol* 2014; 45: 1713–1721.
- House JC, Henderson-Jackson EB, Johnson JO i wsp. Diagnostic digital cytopathology: are we ready yet? *J Pathol Inform* 2013; 4: 28.
- Kaplan KJ. Telecytopathology for immediate evaluation of fine-needle aspiration specimens. *Cancer Cytopathol* 2010; 118: 115–118.

37. Fine JL, Grzybicki DM, Siwash R i wsp. Evaluation of whole slide image immunohistochemistry interpretation in challenging prostate needle biopsies. *Hum Pathol* 2008; 39: 564–572.
38. Lloyd MC, Allam-Nandyala P, Purohit CN i wsp. Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: how reliable is it? *J Pathol Inform* 2010; 1: 29.
39. Minot DM, Kipp BR, Root RM i wsp. Automated cellular imaging system III for assessing HER2 status in breast cancer specimens: development of a standardized scoring method that correlates with FISH. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 133–138.
40. Veta M, van Diest PJ, Willems SM i wsp. Assessment of algorithms for mitosis detection in breast cancer histopathology images. *Med Image Anal* 2015; 20: 237–248.
41. DiFranco MD, O'Hurley G, Kay EW i wsp. Ensemble based system for whole-slide prostate cancer probability mapping using color texture features. *Comput Med Imaging Graph* 2011; 35: 629–645.
42. Samsi S, Krishnamurthy AK, Gurcan MN. An efficient computational framework for the analysis of whole slide images: application to follicular lymphoma immunohistochemistry. *J Comput Sci* 2012; 3: 269–279.
43. Sertel O, Kong J, Shimada H i wsp. Computer-aided prognosis of neuroblastoma on whole-slide images: classification of stromal development. *Pattern Recognit* 2009; 42: 1093–1103.
44. Yeh FC, Parwani AV, Pantanowitz L i wsp. Automated grading of renal cell carcinoma using whole slide imaging. *J Pathol Inform* 2014; 5: 23.
45. Lu H, Papathomas TG, van Zessen D i wsp. Automated Selection of Hotspots (ASH): enhanced automated segmentation and adaptive step finding for Ki67 hotspot detection in adrenal cortical cancer. *Diagn Pathol* 2014; 9: 216.
46. Akakin HC, Gurcan MN. Content-based microscopic image retrieval system for multi-image queries. *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 2012; 16: 758–769.
47. Ho J, Parwani AV, Jukic DM i wsp. Use of whole slide imaging in surgical pathology quality assurance: design and pilot validation studies. *Hum Pathol* 2006; 37: 322–331.
48. Pantanowitz L, Dickinson K, Evans AJ i wsp. American Telemedicine Association clinical guidelines for telepathology. *J Pathol Inform* 2014; 5: 39.
49. Pantanowitz L, Sinard JH, Henricks WH i wsp. Validating whole slide imaging for diagnostic purposes in pathology: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1710–1722.
50. Dee FR, Meyerholz DK. Teaching medical pathology in the twenty-first century: virtual microscopy applications. *J Vet Med Educ* 2007; 34: 431–436.
51. Heidger PM Jr, Dee F, Consoer D i wsp. Integrated approach to teaching and testing in histology with real and virtual imaging. *Anat Rec* 2002; 269: 107–112.
52. Kumar RK, Velan GM, Korell SO i wsp. Virtual microscopy for learning and assessment in pathology. *J Pathol* 2004; 204: 613–618.
53. Hipp JD, Lucas DR, Emmert-Buck MR i wsp. Digital slide repositories for publications: lessons learned from the microarray community. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 783–786.
54. Hipp JD, Sica J, McKenna B i wsp. The need for the pathology community to sponsor a whole slide imaging repository with technical guidance from the pathology informatics community. *J Pathol Inform* 2011; 2: 31.
55. Mroz P, Parwani AV, Kulesza P. Central pathology review for phase III clinical trials: the enabling effect of virtual microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 492–495.