



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00750

(22) Data de depozit: 19.08.2010

(41) Data publicării cererii:
30.08.2011 BOPI nr. 8/2011

(71) Solicitant:
• IANOPOL VASILICA NARCISA,
STR.MOARA DE VÂNT NR.29, IAȘI, IS, RO;
• DANTE J. PIERAMICI,
CALIFORNIA RETINA CONSULTANTS, 515
EAST MICHELTORENA SUITE C,
SANTA BARBARA, CALIFORNIA, US

(72) Inventatori:
• IANOPOL VASILICA NARCISA,
STR.MOARA DE VÂNT NR.29, IAȘI, IS, RO;
• DANTE J. PIERAMICI,
CALIFORNIA RETINA CONSULTANTS, 515
EAST MICHELTORENA SUITE C,
SANTA BARBARA, CALIFORNIA, US

(54) METODĂ PENTRU EVALUAREA CANTITATIVĂ A
LEZIUNILOR FUNDULUI DE OCHI PE FOTOGRAFIILE
ALB-NEGRU

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă pentru evaluarea cantitativă a leziunilor fundului de ochi pe fotografii alb-negru înregistrate digital, în diferite tipuri de investigații utilizate în oftalmologie. Metoda conform invenției constă din măsurarea ariei leziunilor de interes exprimată în pixeli albi sau negri, culoare stabilită convențional, în funcție de tipul leziunii, pe fotografii alb-negru realizate în condiții prestabilite de iluminare, focalizare a imaginilor, dilatare a pupilei, obscuritate ambientală, și prelucrate ulterior, pentru regularizarea tonurilor de gri la un nivel de saturație de până la 50% alb pur și peste 50% negrupur, măsurătorile fiind realizate în interiorul unor arii stabilite în funcție de aspectul leziunilor de interes, sub formă de cerc circumscris leziunii, tangent sau concentric cu un alt cerc circumscris capului nervului optic, rezultatele finale fiind corectate prin aplicarea unui factor de corecție a variației unghiului de incidență sub care sunt înregistrate fotografiile în examinări succesive.

Revendicări: 5
Figuri: 11

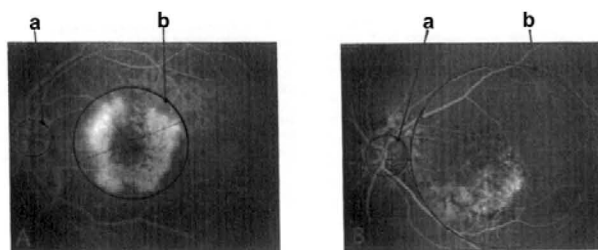
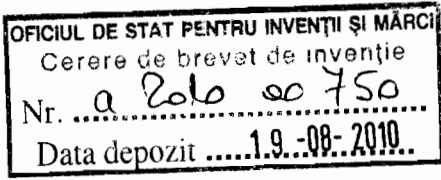


Fig. 4





5

10 **METODĂ PENTRU EVALUAREA CANTITATIVĂ A LEZIUNILOR
FUNDULUI DE OCHI PE FOTOGRAFIILE ALB-NEGRU**

I. DOMENIUL DE UTILIZARE A INVENTIEI

Invenția se referă la o metodă pentru evaluarea cantitativă a leziunilor
15 fundului de ochi analizate pe fotografiile alb-negru înregistrate digital și un
software de aplicare a metodei, în practic toate investigațiile utilizate în
oftalmologie, spre exemplu angiografia fluoresceinică, examinarea în lumină
aneritră, tomografia în coerență optică OCT, oftalmoscopia prin scanare laser, și
alte asemenea, evaluare cantitativă privind măsurători ale ariei leziunilor,
20 efectuate în interiorul unor regiuni de interes prestabilite.

Această metodă cantitativă și software pot fi utilizate și în alte investigații
medicale, oricând trebuie făcută o evaluare a unor leziuni pe fotografii alb-
negru, spre exemplu computer tomografie, rezonanță magnetică nucleară, și
alte asemenea.

25 **II. STADIUL PREZENT AL CERCETĂRII ÎN DOMENIU**

Retina este al treilea și cel mai intern strat al globului ocular, ce acoperă
fundul de ochi. Dacă se face comparația ochiului cu un aparat de fotografiat,
retina este considerată filmul fotografic pe care sunt proiectate imaginile.
Numeroase afecțiuni oculare sunt caracterizate de leziuni ale retinei și straturilor
30 subjacente. Pentru a diagnostica aceste boli este obligatorie o evaluare detaliată
a leziunilor. Investigarea completă a leziunilor retiniene prin utilizarea

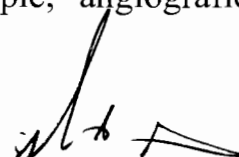
diferitelor teste diagnostice are o importanță particulară în tratamentul principalelor afecțiuni oculare care pot duce la orbire: degenerescenta maculară legată de vârstă, retinopatia diabetică, ocluziile venelor retiniene, etc [1-7].

Toate țesuturile biologice, normale sau patologice, au o evoluție sau involuție tridimensionale, așa încât o evaluare completă a oricărei astfel de leziuni trebuie făcută într-o manieră tridimensională. Bolile fundului de ochi caracterizate de prezența unor *vase de sânge nou formate* (ex. neovascularizație) sau a *altor fenomene patologice induse de aceste leziuni* (ex. extravazarea de fluid sau compuși din sânge înafara vaselor sangvine, numită leakage) necesită pentru diagnosticul lor utilizarea de substanțe de contrast (coloranți). Aceste medicații (ex. Fluoresceina, Verdele de Indocianin) sunt administrate intravenos, și când ajung în vasele de sânge de la fundul de ochi, normale sau patologice, dezvoltă fluorescență care dezvăluie numeroase detalii care altfel ar rămâne obscure la examinarea nativă. Fotografiile de fund de ochi, color sau alb-negru, sunt de obicei utilizate în oftalmologie pentru interpretarea calitatativă dar și cantitativă ce sugerează diagnosticul, dar de asemenea permit monitorizarea progresului bolii cu sau fără tratament.

Evaluarea completă a retinei, într-o manieră tridimensională, necesită o evaluare anatomică în multiple planuri tisulare.

- Planul axial este transversal, care secționează retina. El este evaluat cu acuratețe **calitativ** dar și **cantitativ** prin utilizarea tomografiei în coerență optică OCT. Această metodă modernă de investigație secționează structura retinei, „strat cu strat” [4,8-16]. Din punct de vedere cantitativ, diferitele măsurători realizate de OCT (ex. grosimea retinei) și rezultatele acestora sunt potrivite pentru o interpretare statistică precisă.

- Planul orizontal este definit ca și planul retinian și poate fi analizat în diferite examinări clinice: biomicroscopie, oftalmoscopie, angiografie, etc.



Aceste examinări oferă o adevărată „hartă a leziunilor retiniene” care poate fi interpretată **calitativ**, cu sau fără utilizarea substanțelor de contrast.

Dacă imaginile OCT definesc cu acuratețe straturile retiniene și permit măsurători precise, interpretarea **cantitativă** a imaginilor din planul retinian este
5 afectată de numeroase erori în toate metodele utilizate actualmente în mod curent.

Numeroase publicații au raportat diferite metode de cuantificare a mărimii leziunilor retiniene analizate pe fotografiile alb-negru înregistrate în timpul angiografiei fluoresceinice, examinării în lumină aneritră, oftalmoscopia
10 prin scanare laser, etc. În anumite publicații evoluția leziunilor retiniene a fost urmărită prin măsurarea *celeii mai mari dimensiuni liniare GLD* exprimată în mm – *GLD[mm]* sau pixeli – *GLD[pix]* [5,14,19,22-25]. Alți autori au evaluat *aria leziunilor retiniene delimitate manual cu mousul computerului*, prin cuantificarea în diferite unități: *pixeli – A[pix]* [7,26-30], *unități MPS sau DA*
15 după definirea ariei capului nervului optic ca și o unitate standard MPS sau DA – *A[MPS]* sau *A[DA]* [5,14,20,22,23,25,31-39]. După aproximarea diametrului capului nervului optic ca fiind 1.5 mm sau 1.8 mm, și consecutiv a ariei capului nervului optic ca și 1.77 mm² sau 2.54 mm², în numeroase alte articole și studii clinice, *aria leziunilor retiniene* a fost exprimată în mm² – *A[mm²]*
0 [19,25,34,36,40-43].

Toate metodele menționate mai sus pentru cuantificarea leziunilor retiniene iau în considerație anumite aproximații:

- Stabilirea limitelor leziunilor retiniene este realizată manual, cu mousul computerului [22,25,29]
- 25 - Diametrul și/sau aria capului nervului optic sunt approximate fără a lua în considerație dimensiunile reale ale ochiului și puterea sa de refracție [25,29,44,45]

- Variația dimensiunilor și a formei leziunilor în funcție de modificarea unghiului sub care este fotografiat fundul de ochi sunt neglijate [27,29,44,45]

Metodele mai sus menționate sunt larg utilizate în numeroase trialuri
5 clinice longitudinale care iau în considerație cuantificarea leziunilor retiniene în plan retinian [14,20,23,31,36,38,39,46,47].

III. DEZAVANTAJELE SOLUȚIILOR ACTUALE

10 Toate metodele menționate mai sus pentru cuantificarea leziunilor retiniene în plan retinian oferă rezultate inexacte din mai multe motive:

- Când **stabilirea marginilor leziunilor retiniene este realizată manual**, cu mousul computerului, ea introduce erori legate de interpretarea subiectivă a imaginii [22,25,29]
- 15 - Când **aproximarea diametrului sau ariei capului nervului optic** este considerată ca mai sus, **dimensiunile reale ale globului ocular precum și puterea sa de refracție sunt ignorate**, acest fapt inducând modificări în aprecierea distanțelor; aceasta aproximație afectează semnificativ acuratețea măsurărilor [25,29,44,45]
- 0 - **Variația dimensiunilor și formei imaginilor în funcție de modificarea unghiului sub care sunt fotografiate detaliile fundului de ochi** introduce de asemenea erori în toate metodele în care fotografierea fundului de ochi nu este standardizată în prealabil [27,29,44,45]

Totuși, din lipsa altor metode mai precise, metodele menționate mai sus
25 sunt încă larg utilizate în numeroase studii clinice longitudinale care iau în considerație cuantificarea leziunilor retiniene în plan retinian [14,20,23,31,36,38,39,46,47].



IV. PROBLEMA TEHNICĂ REZOLVATĂ DE INVENȚIE

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este ca metoda pentru evaluarea cantitativă a leziunilor fundului de ochi să realizeze o cuantificare a mărimii leziunilor retiniene în plan retinian, ca și o componentă a examinării complete tridimensionale necesară în bolile retiniene, pe baza fotografiilor alb-negru de fund de ochi, în condițiile unei rate scăzute a erorilor legate de:

- transpunerea informației leziunilor în detalii fotografice ale fundului de ochi,
- variația contrastului dintre leziunile alb-negru de interes și fond, pe fotografiile alb-negru,
- 10 - delimitarea marginilor leziunilor,
- fotografierea fundului de ochi sub diferite unghiuri de incidență,
- aproximarea anumitor dimensiuni oculare variabile în mod natural de la un individ la altul

V. SUMARUL INVENTIEI

15 Metoda, conform invenției, și software-ul pentru aplicarea metodei numit în continuare SITE-App au fost concepute să rezolve problema tehnică și să elimine dezavatajele cu care se confruntă metodele anterioare de analiză cantitativă a leziunilor de fund de ochi, fiecare sursă de eroare fiind corectată în diferite stadii ale interpretării cantitative a leziunilor fundului de ochi, de la înregistrarea imaginilor până la exprimarea finală a rezultatelor în unități relative [pixeli albi sau negri], astfel încât :

- Erorile legate de transpunerea informației conținută în leziunea de fund de ochi în detalii fotografice sunt scăzute pentru că metoda stabilește condiții speciale de fotografiere, astfel oferind imagini similare din punctul de vedere al iluminării, strălucirii, contrastului, momentului angiografic și a magnificației.

25 - Procesarea în Adobe Photoshop scade erorile legate de modificările contrastului în fotografiile alb-negru



- Prin realizarea măsurătorilor în interiorul unor arii de interes standardizate, noua metodă scade incidența erorilor legate de delimitarea limitelor leziunii

- Acuratețea măsurătorilor este crescută prin exprimarea rezultatelor în unități relative [pixeli albi, negri sau totali], evitând aproximările necesare pentru utilizarea unităților exacte [mm/mm²].

- Prin corectarea rezultatelor măsurătorilor prin aplicarea unui factor de corecție Fx care individualizează fiecare ochi, metoda scade erorile legate de fotografierea imaginilor sub diferite unghiuri de incidență

VI. AVANTAJELE INVENTIEI

Metoda, conform invenției, și software-ul pentru aplicarea metodei, prezintă următoarele avantaje:

- Este o metodă ușoară, rapidă și ieftină de cuantificare a leziunilor fundului de ochi, posibil de utilizat în numeroase investigații oftalmologice, spre exemplu angiografia fluoresceinică, examinarea în lumină aneritră, tomografia în coerență optică, oftalmoscopia prin scanare laser, etc.

- Scade erorile, îmbunătățind reproductibilitatea, sensibilitatea și acuratețea măsurătorilor prin:

- Stabilirea unor condiții speciale de înregistrare a fotografiilor
- Standardizarea ariilor de interes în interiorul cărora se realizează măsurătorile,
- Înlocuirea subiectului uman cu computerul în procesul de interpretare și procesare a imaginilor
- Exprimarea rezultatelor în unități relative
- Corectarea datelor pentru variația unghiului de incidență în timpul realizării fotografiilor

- Poate fi folosită pentru analiza cantitativă în diferite situații clinice oftalmologice în care măsurătorile nu pot fi realizate prin metodele raportate anterior în literatură, cum sunt în cazuri de leziuni multiple și neomogene,



leziuni în jurul capului nervului optic, leziuni mixte (ex. neovascularizație, leakage, fibroză și hemoragie subretiniană, etc)

– Metoda și software-ul pentru aplicarea metodei (SITE-App) pot fi incluse în software-ul unui dispozitiv capabil să efectueze în același timp tomografia în coerență optică și angiografia fluoresceinică, varianta completă pentru

5 examinarea tridimensională a leziunilor fundului de ochi
- Pot fi utilizate și în alte ramuri ale medicinei pentru interpretarea cantitativă a leziunilor analizate pe imagini digitale alb-negru (ex. computer tomografie, rezonanță magnetică nucleară, etc)

10 VII. EXEMPLE DE UTILIZARE PRACTICĂ A INVENȚIEI – DESCRIEREA DESENELOR ȘI INSTANTANEELOR VIDEO

Înregistrarea fotografiilor de fund de ochi folosite pentru demonstrarea metodei și software-ului au fost realizate în acord cu legislația curentă internațională și folosind investigații oftalmologice standard, aprobate internațional, așa după cum este menționat mai

15 jos:
- Selecționarea pacienților incluși în grupul demonstrativ. Imaginile de fund de ochi incluse în măsurătorile grupului demonstrativ aparțin studiului care investighează Efectul Bevacizumabului (Avastin) în diferite retinopatii proliferative, înregistrate ca și Clinical Trials.gov:NCT00564148. Studiul a fost condus în acord cu Declarația de la Helsinki și Ghidul de bună practică clinică, fiind aprobat de Comisia Locală de Etică din Iași, Romania. Imaginile au fost obținute de la pacienți cu degenerescență maculară legată de vârstă (AMD) și retinopatie diabetică proliferativă (PDR), înainte și după injecții intravitreene cu 1.25 mg

20
- Procedura imagistică și măsurătorile demonstrative. Măsurătorile demonstrative au fost realizate pe imaginile de angiografie fluoresceinică importante de la o fundus camera VISUCAM^{lite} Digital Camera (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany), destinată fotografierii, prezentării și stocării datelor, operând cu sistemul Microsoft Windows (Microsoft Corporation, Redmond, Wash., US). Pentru compararea ariei de neovascularizație și leakage care variază după timpii angiografici, perechi de fotografii înainte și după

25
30 tratament, pe un câmp de 45 grade deschidere, centrat de fovee sau de centrul capului

nervului optic, au fost înregistrate în aceeași fază angiografică (precoce < 1 minut, medie 1 – 3 minute sau tardivă 5 – 10 minute) de la pacienții incluși în grupul demonstrativ.

Se dau în continuare exemple de realizare și utilizare a invenției în practica oftalmologică, cu referire la figurile 1...11, descrise pe scurt mai jos, prezentând secvențe video (Vif.) ce reprezintă instantanee ale celor mai importante pași ai metodei și software-ului de aplicare a metodei (SITE-App), care au fost folosiți pentru interpretarea cantitativă a leziunilor fundului de ochi la pacienții din grupul demonstrativ.

- **Fig.1. Influența iluminării ambientale asupra măsurătorilor în pixeli.** Imagini înregistrate de la un pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă inclus în grupul demonstrativ. Fotografiiile au fost realizate în decursul aceleiași sesiuni de angiografie fluoresceinică, sub diferite grade de iluminare, în timpi angiografici apropiați: 2.11 min (A), 2.15 min (B). Măsurătorile în pixeli (pixeli albi = wpix, pixeli negri = bpix) au fost realizate în interiorul unui cerc albastru tangent la capului nervului optic și având de 4 ori diametrul capului nervului optic: 151990 wpix și 11 bpix în Imaginea A, comparativ cu 25465 wpix și 126536 bpix în Imaginea B.

- **Fig.1.A. Angiografia fluoresceinică la 2.11 minute.**

- **Fig.2.B. Angiografia fluoresceinică la 2.15 minute.**

- **Fig.2. Procesarea în Adobe Photoshop a imaginilor alb-negru importate de la fundus camera.** Contrastul dintre leziunile de interes și backgroundul fundului de ochi sunt îmbunătățite în imaginea procesată (B) comparativ cu imaginea neprocesată (A).

- **Fig.2.A. Imaginea neprelucrată a fundului de ochi, preluată de la fundus camera.**

- **Fig.2.B. Imaginea fundului de ochi după prelucrarea în Adobe Photoshop.**

- **Fig.3. Procesarea în Adobe Photoshop utilizând pașii metodei și software-ului SITE-App.** Imaginea utilizată a fost înregistrată în timpul angiografiei fluoresceinice la un pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă inclus în grupul demonstrativ. Următorii pași sunt esențiali în procesare:

- 5 - **Vif.3.1. Importarea imaginii de la fundus camera.**
- **Vif.3.2. Deschiderea imaginii importate în programul Adobe Photoshop.**
- **Vif.3.3. Excluderea marginilor „negru pur” cu bagheta magică.**
- **Vif.3.4. Ajustarea imaginii rămase din Menu (Image).**
- **Vif.3.5. Reglarea automată a tonurilor de gri (Auto - Levels).**

10

- **Fig.4. Stabilirea ariei de interes în interiorul căreia se fac măsurătorile în diferitele metode secvențiale utilizând metoda și software-ul SITE-App.** Standardizarea ariei de interes ca și **cercul albastru** în metoda SITE-App (A,B,C). **Cercul roșu** înconjurând capului nervului optic a fost ales ca și referință (B,C). Aria de interes ca și cerc albastru înconjurând o leziune maculară solitară – **metoda cercului circumscris** (A). Evaluarea leziunilor maculare cu **metoda cercului tangent** în fotografiile centrate de fovee (B). Evaluarea leziunilor retiniene din jurul capului nervului optic prin **metoda cercului concentric** în fotografiile centrate pe centrul capului nervului optic (C). **Aria delimitată cu mousul** utilizată pentru măsurători realizate prin alte metode raportate în literatură și exprimată în pixeli albi - **A[wpix]**, total pixeli– **A[tpix]**, unități MPS – **A[MPS]** sau mm^2 – **A[mm²]**, după aproximarea diametrului capului nervului optic ca fiind 1,5 mm și a ariei capului nervului optic ca fiind $1 \text{ MPS} = 1.77 \text{ mm}^2$. (D).

- 25 - **Fig.4.A. Standardizarea ariei de interes în metoda cercului circumscris.**
- **Fig.4.B. Standardizarea ariei de interes în metoda cercului tangent.**
- **Fig.4.C. Standardizarea ariei de interes în metoda cercului concentric.**

- Fig.4.D. Delimitarea manuală, cu mousul computerului, a marginilor leziunilor analizate.

- Fig.5. Pașii metodei cercului circumscris pentru demonstrarea
5 utilizării metodei și a software-ului SITE-App. Imaginea demo a fost
înregistrată în timpul angiografiei fluoresceinice de la un pacient cu
degenerescență maculară legată de vârstă exudativă inclus în grupul
demonstrativ. Leziunea analizată este **solitară** și **albă**, potrivită pentru metoda
cercului circumscris și măsurătorile în **pixeli albi**. Metoda include următorii
10 pași:

- Vif.5.1. Importarea imaginii de la fundus camera.
- Vif.5.2. Alegerea opțiunii <Diameter/Area Method> din Menu.
- Vif.5.3. Alegerea opțiunii <Draw Circle>
- Vif.5.4. Desenarea cercului roșu înconjurând capul nervului optic.
- 15 - Vif.5.5. Desenarea celui mai mic cerc albastru care înconjură leziunea
analizată.
- Vif.5.6. Citirea celui mai mic diametru al cercului albastru exprimat în
[mm] ca și <Diametru Leziune>
- Vif.5.7. Citirea ariei cercului albastru exprimată în [mm²] ca și <Area>
- 20 - Vif.5.8. Citirea diametrului cercului albastru ca și număr total de pixeli
pe segmentul albastru.
- Vif.5.9. Selecționarea secțiunii <Tangente> din Menu.
- Vif.5.10. Scrierea dimesniunilor pentru <Secondary Radius> ca și
jumătate din diametrul cercului albastru obținut în Vif.5.8.
- 25 - Vif.5.11. Desenarea cercului albastru pentru a circumscrie în totalitate
leziunea analizată.
- Vif.5.12. Citirea ariei leziunilor albe incluse în interiorul cercului
albastru, exprimată în [pixeli albi].



- Fig.6. Pașii metodei cercului tangent pentru a demonstra utilizarea metodei și software-ului SITE-App. Imaginea a fost înregistrată în timpul angiografiei fluoresceinice de la un pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă inclus în grupul demonstrativ. Leziunile analizate sunt **multiple, albe și neomogene**, plasate în maculă, potrivite pentru metoda cercului tangent și măsurători în **pixeli albi**. Metoda include următorii pași:

- Vif.6.1. Importare imaginii de la fundus camera.

- Vif.6.2. Selectarea secțiunii *<Diameter/Area Method>* din Menu.

- Vif.6.3. Desenarea cercului roșu cu diametrul său după selectarea opțiunii *<Draw Circle>*

- Vif.6.4. Citirea valorii diametrului cercului roșu exprimat în [pixeli] pe săgeata roșie.

- Vif.6.5. Selectarea secțiunii *<Tangente>* din Menu.

- Vif.6.6. Stabilirea *<Primary Radius>* ca și jumătate din diametrul cercului roșu.

- Vif.6.7. Stabilirea *<Secondary Radius>* care este raza cercului albastru, ca fiind de 4 ori valoarea *<Primary Radius>*

- Vif.6.8. Stabilirea gadului de excentricitate a cercului albastru raportat la cercul roșu, la valoarea de 0 grade, în secțiunea *<Angle>*

- Vif.6.9. Plasarea cercului roșu în jurul capului nervului optic, consecutiv, cercul albastru găsindu-și poziți sa în maculă.

- Vif.6.10. Citirea valorii ariei leziunilor albe incluse în regiunea maculară a cercului albastru, ca și numărul de pixeli albi prezentat în caseta din dreapta sus.

- Fig.7. Pașii metodei cercului concentric pentru demonstrarea utilizării metodei și a software-ului SITE-App. Imaginea analizată a fost înregistrată în timpul angiografiei fluoresceinice la un pacient cu retinopatie

diabetică proliferativă severă, parțial fotocoagulată, pacient inclus în grupul demonstrativ. Leziunile analizate sunt **multiple, albe și neomogene**, plasate în jurul capului nervului optic, potrivite pentru metoda cercului concentric și măsurătorile în **pixeli albi**. Metoda include următorii pași:

- 5 - **Vif.7.1. Importare imaginii de la fundus camera.**
- **Vif.7.2. Selectarea secțiunii <Diameter/Area Method> din Menu.**
- **Vif.7.3. Desenarea cercului roșu prin selectarea opțiunii <Draw Circle>**
- **Vif.7.4. Plasarea cercului roșu în jurul capului nervului optic.**
- **Vif.7.5. Citirea diametrului cercului roșu exprimat în [pixeli] pe săgeata**
10 **roșie.**
- **Vif.7.6. Selectarea secțiunii <Concentric> din Menu.**
- **Vif.7.7. Stabilirea valorii <Primary Radius> ca și jumătate din valoarea**
diametrului cercului roșu.
- **Vif.7.8. Stabilirea valorii <Secondary Radius>, raza cercului albastru, ca**
15 **fiind de 4 ori valoarea razei cercului roșu.**
- **Vif.7.9. Stabilirea gradului de excentricitate a cercului albastru raportat**
la cercul roșu, la valoarea de 0 grade în secțiunea <Angle>
- **Vif.7.10. Plasarea cercului roșu în jurul capului nervului optic, consecutiv,**
cercul albastru găsindu-și poziția, concentric cu cercul roșu.
- **Vif.7.11. Citirea ariei detaliilor de fund de ochi colorate în alb, incluse în**
20 **cercul albastru, ca și valoare exprimată în [pixeli albi] ce este prezentată în**
casetă din dreapta sus.

- **Fig.8. Realizarea măsurătorilor, în interiorul ariei delimitate cu**
25 **mousul, prin folosirea metodei și software-ului SITE-App precum și a altor**
metode cantitative raportate în literatură. Imaginea analizată a fost
înregistrată în timpul angiografiei fluoresceinice la un pacient cu
degenerescență maculară legată de vârstă exudativă inclus în grupul

19-08-2010

demonstrativ. Leziunea analizată este considerată **multiplă, neomogenă, albă** și plasată în maculă. Metoda include următorii pași:

- **Vif.8.1. Importarea imaginii de la fundus camera.**
- **Vif.8.2. Selectarea secțiunii <Diameter/Area Method> din Menu.**
- 5 - **Vif.8.3. Stabilirea cercului roșu și a diametrului său prin alegerea opțiunii <Draw Circles>**
- **Vif.8.4. Citirea valorii diametrului cercului roșu exprimată în [pixeli albi].**
- **Vif.8.5. Selectarea secțiunii <Free Area>**
- **Vif.8.6. Înconjurarea primei părți a leziunii cu mousul.**
- 10 - **Vif.8.7. Selectarea opțiunii <Append> pentru a permite adăugarea altor părți din leziune în procesul de selectare a leziunilor de interes.**
 - **Vif.8.8. Selectarea opțiunii <Calculate> pentru a verifica dacă aria de interes delimitată de computer (*marcată în verde*) este corectă, înafara backgroundului (*colorat în albastru*).**
- 15 - **Vif.8.9. Alegerea răspunsului negativ <No> pentru acest exemplu, în care computerul nu a selectat corect leziunea de interes. Întrebarea computerului este <Forma detectata correct?>**
 - **Vif.8.10. Alegerea răspunsului afirmativ <Yes> pentru a doua variantă, corectată, în care leziunea analizată este delimitată corespunzător.**
- 20 - **Vif.8.11. Utilizarea opțiunii <Preview> pentru a analiza imaginea ca o combinație de alb pur și negru pur, după regularizarea scalei de tonuri de gri de către computer.**
 - **Vif.8.12. Citirea rezultatelor măsurătorilor în caseta din dreapta sus prin urmărirea parametrilor caracteristici pentru fiecare metodă: *aria în pixeli albi* sau *aria în pixeli negri* din interiorul regiunii delimitate cu mousul, *cea mai mare dimensiune liniară a leziunii GLD* exprimată în [mm], *aria leziunii delimitate cu mousul* exprimată în *pixeli totali sau unități MPS* (considerând 1 unitate MPS = aria capului nervului optic).**

- **Fig.9. Măsurarea distanțelor utilizând software-ul SITE-App.**

Măsurătorile segmentelor fixe pe două fotografii succesive ale fundului de ochi înregistrate de la același ochi, înainte (A) și după tratament (B), utilizate pentru definiția factorului de corecție Fx. Distanța dintre a 2-a și a 3-a ramificație a venei temporale superioare (**segmentul roșu**). Distanța dintre a 2-a și a 4-a ramificație a venei temporale superioare (**segmentul albastru**). Măsurarea celei mai mari dimensiuni liniare a leziunii retiniene GLD (**segmentul albastru**) în pixeli sau mm, după aproximarea capului nervului optic ca fiind 1.5 mm (C).

- **Fig.9.A. Imagine angiografică demo înainte de tratament.**

- **Fig.9.B. Imaginea angiografică a fundului de ochi din (A) după tratament.**

- **Fig.9.C. Măsurarea celei mai mari dimensiuni liniare a leziunii retiniene.**

- **Fig.10. Măsurarea celei mai mari dimensiuni liniare GLD a leziunii retiniene utilizând software-ul SITE-App.** Imaginea demo a fost înregistrată la un pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă inclus în grupul demonstrativ. Sunt urmăriți următorii pași:

- **Vif.10.1. Importarea imaginii de la fundus camera.**

- **Vif.10.2. Selectarea secțiunii <Diameter/Area Method> din Menu.**

- **Vif.10.3. Desenarea cercului roșu după selectarea opțiunii <Draw Circle>**

- **Vif.10.4. Inactivarea opțiunii <Draw Circle> pentru a putea selecta numai diametrul cercului albastru ca și segment, fără cercul aferent.**

- **Vif.10.5. Alegerea celei mai mari dimensiuni a leziunii din mai multe variante încercate, citite ca și valori în pixeli pe săgeata albastră.**

- **Fig.11. Măsurarea parametrilor fișei ai fundului de ochi utilizând metoda și software-ul SITE-App pentru definirea factorului de corecție Fx al variației unghiului de incidență sub care sunt înregistrate fotografiile.** Fotografiile fundului de ochi aparțin unui pacient cu degenerescență maculară



legată de vârstă inclus în grupul demonstrativ și au fost înregistrate sub diferite unghiuri de incidență. **Diametrul capului nervului optic, distanța dintre a 2-a și a 3-a ramificație a venei temporale superioare și aria capului nervului optic** sunt măsurate în [pixeli].

5

VIII. DESCRIEREA DETALIATĂ A METODEI ȘI SOFTWARE-ULUI SITE-APP

APLICABILITATEA METODEI ȘI SOFTWARE-ULUI. Software-ul SITE-App poate fi utilizat pentru măsurători în pixeli albi și negri, în interiorul unor arii standardizate, pe orice tip de fotografie alb-negru înregistrată în timpul diferitelor examinări medicale. Pentru alte imagini decât cele ale fundului de ochi, metoda poate fi aplicată în toți pașii ei, exceptând ultimul pas, al corectării datelor cu factorul de corecție Fx.

În oftalmologie, orice tip de fotografie sau imagine înregistrată digital de diferite dispozitive de examinare a fundului de ochi poate fi interpretată cantitativ utilizând metoda și software-ul SITE-App, în toți timpii săi (ex. angiografia fluoresceinică, examinarea în lumină aneritră, tomografia în coerență optică, oftalmoscopia cu scanre laser, etc).

În funcție de localizarea leziunilor (în maculă, peripapilar, etc) precum și de caracteristicile lor (leziuni solitare sau multiple, omogene sau neomogene), una dintre cele 3 metode SITE-App pot fi alese (metoda cercului circumscris, tangent sau concentric).

După analiza aspectului leziunilor de interes se stabilește culoarea albă sau neagră a pixelilor care se numără. De exemplu, în bolile oculare caracterizate de *neovascularizație* sau *leakage* (ex. degenerescență maculară legată de vârstă, retinopatie diabetică proliferativă, alte tipuri de neovascularizație, etc), leziuni care sunt analizate pe imaginile de angiografie fluoresceinică, se vor cuantifica pixelii albi. Când leziunea de interes este o



hemoragie subretiniană în maculă și imaginile analizate sunt fotografiile în lumină aneritră și/sau angiografiile fluoresceinice, pixelii de interes sunt cei negri. Aria cu fibroză poate fi cuantificată pe imaginile în lumină aneritră și trebuie exprimată în pixeli albi. Dacă imaginile sunt analizate în dinamică și informația obținută de la angiografia fluoresceinică este combinată cu cea a examinării în lumină aneritră, se pot obține informații suplimentare referitoare la leziunile retiniene.

STANDARDIZAREA PROCESULUI DE ÎNREGISTRARE A FOTOGRAFIILOR. Necesitatea stabilirii anumitor condiții standardizate pentru înregistrarea imaginilor fundului de ochi a pornit de la observația noastră că măsurătorile sunt afectate semnificativ de variația acestor condiții.

Fig.1 prezintă un caz cu degenerescență maculară legată de vârstă inclus în grupul de control. Imaginea fundului de ochi a fost fotografiată în timpi angiografici foarte apropiați, care oferă condiții pentru focusarea analizei aproximativ pe aceeași fază a neovascularizației și leakage-ului aferent, astfel încât numărul de pixeli albi care indică o anumită arie ar trebui să nu fie semnificativ diferit în cele două imagini. S-a cuantificat numărul de pixeli albi (wpix) și negri (bpix) dintr-un cerc albastru plasat în maculă, tangent la capul nervului optic și având un diametru de 4 ori diametrul capului nervului optic. S-au observat modificări semnificative în cele două imagini, odată cu modificarea iluminării (Fig.1.A,B): 151990 wpix și 11 bpix în imaginea A, comparativ 25465 wpix și 126536 bpix în imaginea B.

Ca o consecință a acestor observații, metoda SITE-App a stabilit anumite condiții preliminare pentru procesul de înregistrare a fotografiilor de fund de ochi în scopul stabilirii unei referințe fixe a strălucirii și contrastului pentru fiecare pereche de imagini comparate în interpretările longitudinale:

- Captura imaginilor trebuie făcută în aceleași condiții de iluminare și magnificație pentru ambele imagini comparate



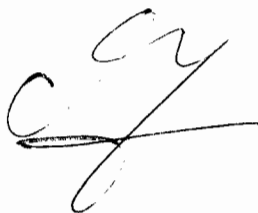
- Pentru a putea interpreta o arie retiniană maximă, fotografiile trebuie făcute sub cel mai mare unghi de deschidere (45 grade sau chiar mai mult pentru noile tipuri de fundus camera)
- Fotografiile de fund de ochi trebuie realizate într-o cameră obscură, evitându-se suprapunerea unor alte surse de iluminare necontrolată
- Pupila trebuie să fie dilatată peste 5 mm, pentru prevenirea umbrelor suplimentare
- Imaginea trebuie să fie bine focalizată înainte de înregistrarea fotografiei, pentru eliminarea pe cât posibil a reflexelor și umbrelor vizibile

PAȘII METODEI SITE-APP – DESCRIEREA GENERALĂ ȘI SECȚIUNEA DEMONSTRATIVĂ. Metoda SITE-APP a fost dezvoltată pentru măsurarea ariei diferitelor leziuni de interes, exprimată în pixeli albi sau negri, pe fotografiile alb-negru înregistrate digital în timpul diferitelor examinări medicale,

Pentru detaliile fundului de ochi, metoda SITE-App a fost imaginată pentru măsurătorile **ariei leziunilor în plan retinian**, după includerea acestor leziuni în anumite regiuni standardizate de examinare.

Pașii metodei SITE-App, descriși mai jos pentru leziunile fundului de ochi evaluate pe angiografia fluoresceinică, pot fi adaptați cu ușurință pentru orice tip de fotografie digitală a fundului de ochi înregistrată în diferite alte metode de investigație utilizate în prezent în oftalmologie (tomografie în coerență optică, oftalmoscopia cu scanare laser, etc):

1. **Importarea imaginilor alb-negru** de la fundus camera pe un computer având instalat programul Adobe-Photoshop
2. **Procesarea imaginilor de analizat în Adobe-Photoshop**
3. **Standardizarea ariilor de interes** în funcție de leziunile analizate
4. **Realizarea măsurătorilor** în interiorul ariilor de interes standardizate



5. **Corectarea datelor** prin aplicarea factorului de corecție Fx

Pașii metodei SITE-App sunt demonstrați mai jos pe grupul de imagini demonstrative. Pentru imagini ale fundului de ochi obținute de la pacienți cu *degenerescență maculară legată de vârstă exudativă și retinopatie diabetică proliferativă*, leziunile de interes analizate au fost leziuni albe, analizate pe angiografia fluoresceinică. Toate cele trei secvențe ale metodei SITE-App au fost demonstrate de filme din care au fost selecționate instantanee relevând cei mai importanți pași. Pentru comparația dintre metoda SITE-App și alte metode raportate în literatură, măsurătorile au fost realizate de asemenea și în interiorul ariei leziunii delimitată cu mousul computerului, prin utilizarea software-ului SITE-App.

PROCESAREA ÎN ADOBE-PHOTOSHOP – SECȚIUNEA DEMONSTRATIVĂ. Scopul procesării în Adobe Photoshop este de a regulariza scala tonurilor de gri și de a îmbunătăți contrastul dintre leziunile retiniene și backgroundul fundului de ochi.

În grupul de imagini demonstrative, fotografiile neprelucrate alb-negru ale fundului de ochi având o rezoluție de 720x576 pixeli au fost exportate în format JPEG (X.jpg) de la fundus camera la un computer cu sistemul de operare Microsoft Windows și având instalat programul Adobe Photoshop (Versiunea 9.0, CS2; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, US) (Fig.2.A).

Fig.2.A prezintă o fotografie de fund de ochi de la un pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă exudativă inclus în grupul demonstrativ. Fig.2.B este aceeași fotografie a fundului de ochi din Fig.2.A după prelucrarea în Adobe Photoshop. Contrastul dintre leziunea centrală de interes și backgroundul din jur este îmbunătățit după procesare, astfel încât cititorul de imagine poate interpreta mai bine care sunt marginile leziunii.

Fig.3 demonstrează, într-o succesiune instantanee video înregistrate în timpul aplicării metodei și software-ului SITE-App, care sunt pașii care trebuie

urmați pentru procesarea în Adobe Photoshop a imaginii inițiale preluată de la fundus camera:

- Imaginea importată (Vif.3.1) este deschisă în Adobe Photoshop (Vif.3.2)
- Marginile „negru pur” ale fotografiei și care nu aparțin fundului de ochi sunt excluse cu bagheta magică prin selectarea „**ctrl+shift+i**” (Vif.3.3)
- Imaginea rămasă este ajustată din Menu (**Image**) (Vif.3.4), prin regularizarea automată (**Auto**) a tonurilor de gri (**Levels**) (Vif.3.5)

STANDARDIZAREA ARIILOR RETINIENE DE INTERES – SECȚIUNEA DEMONSTRATIVĂ. Toate programele computerizate destinate măsurătorilor în pixeli a ariilor delimitate în prealabil cu mousul sunt afectate de erori la nivelul „unghiurilor și inflexiunilor” (Fig.4.D). În scopul scăderii acestor erori, metoda SITE-App a *standardizat ariile de interes* în interiorul cărora se fac măsurătorile, sub forma definirii „*cercului albastru*” (Fig.4.A,B,C).

Pentru leziunile solitare, metoda SITE-App utilizează cel mai mic cerc circumscris leziunilor retiniene analizate – „**metoda cercului circumscris**” (Fig.4.A). În serii de imagini înregistrate de la același ochi, înainte și după tratament, diametrul cercului albastru este modificat succesiv pentru a înconjura leziunea în noile ei circumstanțe. Comparativ cu aria delimitată cu mousul în care cititorul trebuie să interpreteze limitele leziunii într-o infinitate de puncte ale marginilor acesteia, în metoda cercului circumscris SITE-App cititorul are de stabilit numai câteva puncte în care leziunea analizată este tangentă și inclusă în cercul circumscris. Astfel, numărul de erori scade semnificativ de la o infinitate de puncte la numai câteva puncte.

Pentru leziunile multiple cercul albastru este raportat la *cercul roșu*, definit ca cel mai mic cerc circumscris capului nervului optic (Fig.4.B,C). Dimensiunea acestui cerc este un parametru care caracterizează un anumit ochi,

astfel încât pe o serie de imagini înregistrate de-a lungul timpului el ar trebui să rămână constant. De aceea, el a fost considerat ca și referință pentru cercul de interes albastru.

Pe serii de fotografii înregistrate de-a lungul timpului, *diametrul cercului albastru* trebuie să fie menținut fix, obținut prin multiplicarea diametrului cercului roșu (ex. cercul albastru considerat cu un diametru de 4 ori diametrul cercului roșu, de 3 ori, etc), pentru a se putea face comparația între aceeași regiune retiniană analizată în momente succesive.

Poziția cercului albastru este aleasă în funcție de leziunile analizate și definește următoarele secvențe ale metodei SITE-App:

- „**metoda cercului tangent**”, imaginată pentru leziunile maculare și care utilizează fotografii centrate pe fovee (Fig.4.B)
- „**metoda cercului concentric**“, creată pentru evaluarea leziunilor din jurul capului nervului optic, metodă în care fotografiile trebuie centrate pe centrul capului nervului optic (Fig.4.C)

SOTWARE-UL SITE-APP – DESCRIERE GENERALĂ. Software-ul SITE-App a fost dezvoltat pentru computere cu sistemul de operare Microsoft Windows și a fost pentru prima dată comunicat ca și poster, prezentând pașii și primele măsurători, în timpul Meetingului Anual ARVO din Forth Lauderdale, Florida, USA, în 2008, ulterior în 2009 [48,49]. În prima lui versiune, software-ul SITE-App a fost utilizat pentru realizarea de măsurători în interiorul unei arii delimitată cu mousul, incluzând leziunile de interes, dar cu limitele depășind aceste leziuni. Principalele diferențe dintre metoda SITE-App și metodele raportate anterior în literatură au fost că:

- SITE-App standardiza condițiile de fotografiere și procesa imaginile de fund de ochi înainte de măsurători.

19-08-2010

- aria delimitată cu mousul utilizată de SITE-App era mai mare decât aria leziunii de interes, comparativ cu metodele anterioare în care leziunea analizată era delimitată cu mousul manual, pe granițele ei.

Metoda și software-ul SITE-App au fost ulterior modificate pentru a li se
5 îmbunătăți acuratețea și sensibilitatea, iar rezultatele măsurătorilor ulterioare au
fost raportate la meetingul anual de cercetare ARVO – Forth Lauderdale,
Florida, USA în 2010 [50]. Modificările față de versiunea anterioară includ un
mod diferit de **standardizare a ariilor de interes** în interiorul cărora se fac
măsurătorile, rezumate la **3 secvențe ale metodei SITE-App – metodele**
10 **cercului circumscris, tangent și concentric**. Rezultatele măsurătorilor sunt
exprimate în **pixeli albi sau negri**, în funcție de leziunea analizată, pentru
parametrul evaluat care este **aria** leziunilor retiniene. Versiunea finală a
software-ului SITE-App este capabilă să realizeze orice tip de măsurători în
interiorul oricărei arii delimitate în prealabil, indiferent că această arie este
15 delimitată cu mousul ca în metodele anterioare sau este standardizată ca și
cercuri, ca în metoda nouă SITE-App. Rezultatele măsurătorilor sunt exprimate
în: **pixeli albi, negri, totali** (wpix, bpix, tpix), **unități MPS, mm, mm²** (după
aproximarea diametrului capului nervului optic ca fiind 1.5 mm iar aria capului
nervului optic ca fiind 1MPS = 1.77 mm²). Măsurătorile făcute cu software-ul
20 SITE-App pot viza **distanțe** sau **arii de interes**, în interiorul ariilor
standardizate circulare sau delimitate cu mousul (Fig.4.D). În aceste fel,
rezultatele măsurătorilor obținute cu metoda SITE-App pot fi comparate cu cele
ale celorlalte metode publicate anterior în literatură (citate în bibliografia
atașată), iar reproductibilitatea, sensibilitatea și acuratețea acestor metode poate
25 fi evaluată și comparată.

Exceptând leziunile oculare, software-ul SITE-App poate fi utilizat pentru
măsurători în pixeli albi și negri în interiorul unor arii de interes stabilite pe
orice tip de imagini digitale alb-negru înregistrate în timpul diferitelor



19-08-2010

examinări realizate în alte ramuri ale medicinei (ex. computer tomografia, rezonanță magnetică nucleară, etc).

SOFTWARE-UL SITE-APP – SECȚIUNEA DEMONSTRATIVĂ.

Utilizarea metodei și software-ului SITE-App pentru evaluarea cantitativă a
5 leziunilor retiniene este demonstrată în secvențele video din Fig.5,6,7 descriind
diferite situații care necesită diferite abordări ale măsurătorilor. Utilizarea
software-ului SITE-App pentru realizarea anumitor măsurători care permit
comparația cu alte metode publicate în literatură este demonstrată în Fig.10
10 pentru cea mai mare dimensiune liniară a leziunii GLD și în Fig.8 pentru aria
leziunii delimitată cu mousul.

Vif.5.1 relevă o fotografie de fund de ochi înregistrată în timpul
angiografiei fluoresceinice la un pacient cu degenerescență maculară legată de
vârstă exudativă inclus în grupul demonstrativ. Leziunea analizată este
neovascularizația și leakage-ul care apar ca o leziune solitară albă centrală,
15 pozitivă la angiografia fluoresceinică. Metoda este potrivită pentru *metoda*
cercului circumscris și pentru măsurători în *pixeli albi*.

Fig.5 demonstrează, într-o succesiune de instantanee video înregistrate în
timpul aplicării metodei și software-ului SITE-App, pașii care trebuie urmați în
metoda cercului circumscris pentru a obține cuantificarea finală a leziunii
20 analizate în pixeli albi.

Primele secțiuni ale Fig.5 demonstrează pașii necesari înainte de
măsurătorile finale:

- Opțiunea **<Diameter/Area Method>** este aleasă din Menu (Vif.5.2), după importarea imaginii în programul computerizat (Vif.5.1).
 - Opțiunea **<Draw Circle>** este utilizată inițial pentru stabilirea *cercurilor roșu și albastru* împreună cu diametrele lor (Vif.5.3).
- 25



19-08-2010

- Este desenat **cercul roșu** care înconjură capul nervului optic (Vif.5.4). Numărul de pixeli caracterizând diametrul cercului roșu este indicat pe săgeata roșie.
- Este stabilit cel mai mic **cerc albastru** care înconjură leziunea analizată (Vif.5.5). Numărul de pixeli al **diametrului cercului albastru** este indicat pe săgeata albastră (Vif.5.8).

Considerând aproximația pentru diametrul capului nervului optic ca fiind 1.5 mm, software-ul SITE App calculează automat în caseta din dreapta sus:

- Diametrul celui mai mic cerc albastru circumscris leziunii, exprimat în [mm], indicat ca și **<Diametru Leziune>** (Vif.5.6)
- Aria cercului albastru exprimată în [mm²] ca și **<Area>** (Vif.5.7)

În a doua secțiune a Fig.5, măsurătorile sunt realizate în interiorul cercului circumscris albastru:

- Secțiunea **<Tangente>** este aleasă din Menu (Vif.5.9)
- Cercul albastru este desenat prin fixarea dimensiunilor sale ca și **<Secondary Radius>** în caseta din dreapta jos (Vif.5.10)
- Poziția cercului albastru este stabilită astfel încât să înconjure leziunea analizată (Vif.5.11)
- **Aria leziunilor albe incluse în cercul albastru** este exprimată în pixeli albi și prezentată în caseta din dreapta sus (Vif.5.12)

Vif.6.1 prezintă o fotografie de fund de ochi înregistrată la un pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă exudativă inclus în grupul demonstrativ. Neovascularizația și leakage-ul apar ca leziuni albe după contrastarea cu fluoresceină. Aceste leziuni sunt multiple, neomogene plasate în maculă. Metoda potrivită pentru evaluarea acestor leziuni este *metoda cercurilor tangente* în care diametrul cercului albastru a fost ales să fie de 4 ori

diametrul cercului roșu – capului nervului optic. Pixelii de interes sunt *pixelii albi*.

Fig.6 demonstrează pas cu pas, într-o succesiune de instantanee video înregistrate în timpul aplicării metodei și software-ului SITE-App, procesarea
5 leziunilor multiple neomogene evidente pe angiografia fluoresceinică prin utilizarea metodei cercului tangent în vederea obținerii ariei exprimate în pixeli albi.

Procesarea imaginilor fundului de ochi folosind metoda cercului tangent începe cu stabilirea unui parametru care individualizează ochiul respectiv –
10 diametrul cercului roșu:

- Opțiunea **<Diameter/Area Method>** este aleasă din Menu (Vif.6.2), după importarea imaginii în programul computerizat (Vif.6.1).
- Opțiunea **<Draw Circle>** este utilizată pentru stabilirea *cercului roșu* împreună diametrul său (Vif.6.3).
- 15 • După desenarea *cercului roșu* în jurul capului nervului optic, valoarea diametrului acestuia se citește pe săgeata roșie, fiind exprimat în pixeli (Vif.6.4). Consecutiv se calculează raza cercului roșu ca fiind jumătate din valoarea diametrului aceluiași cerc.

După alegerea opțiunii **<Tangente>** din Menu (Vif.6.5), măsurătorile sunt
20 realizate urmând pașii de mai jos:

- **<primary radius>** este stabilit ca fiind raza cercului roșu, valoare deja obținută mai sus (Vif.6.6)
- **<secondary radius>** aparține cercului albastru și pentru această imagine această rază este considerată de 4 ori raza cercului roșu
25 (Vif.6.7)
- Gradul de excentricitate al cercului albastru în raport cu cercul roșu este stabilit la **0 grade** în opțiunea **<Angle>** (Vif.6.8)

19-08-2010

- Cercul roșu este plasat în jurul capului nervului optic plasând săgeata mousului în centrul papilei. Consecutiv, cercul albastru își va găsi singur poziția în zona maculară (Vif.6.9).

Caseta din dreapta sus indică:

- 5 ○ *Aria leziunilor albe* incluse în regiunea standardizată a cercului albastru, arie exprimată în *pixeli albi*, care reprezintă unitatea de măsură de interes în acest caz (Vif.6.10)
- Aria acoperită de *pixeli negri* din interiorul cercului albastru, măsurătoare care ar putea fi de interes în situații în care leziunea analizată ar apare neagră
- 10 la angiografia fluoresceinică (ex. hemoragie subretiniană)

Vif.7.1 este o imagine de angiografie fluoresceinică înregistrată la un pacient cu retinopatie diabetică proliferativă parțial fotocoagulată, inclusă în grupul demonstrativ. Leziunea de interes este localizată în jurul capului nervului optic, reprezentând neovascularizație și leakage, ce apar ca și leziuni albe, multiple, neomogene. *Metoda cercului concentric* este singura cale de a

15 cuantifica asemenea leziuni pe angiografiile fluoesceinice sau pe alte imagini obținute de la alte investigații, nici o altă metodă raportată anterior neputând fi folosită pentru realizarea măsurătorilor în astfel de situații. Acest caz relevă unul dintre avantajele metodei SITE-App față de celelalte metode anterioare.

20 Fig.7 demonstrează, într-o succesiune de instantanee video înregistrate în timpul aplicării metodei și software-ului SITE-App, procesul de interpretare cantitativă a leziunilor multiple plasate în jurul capului nervului optic, utilizând metoda cercului concentric. Rezultatul final este aria măsurată în pixeli albi. Procesarea imaginii prin metoda cercului concentric începe de asemenea cu

25 măsurarea diametrului cercului roșu și cu calcularea razei cercului roșu:

- După importarea imaginii de la fundus camera în program (Vif.7.1), se alege opțiunea *<Diameter/Area Method>* din Menu (Vif.7.2).

- Opțiunea <**Draw Circle**> este utilizată inițial pentru desenarea *cercului roșu* împreună cu diametrul său (Vif.7.3).
- După ce *cercul roșu* este plasat în jurul capului nervului optic (Vif.7.4) săgeată roșie indică valoarea în pixeli a diametrului capului nervului optic (Vif.7.5), permițând calcularea razei cercului roșu, prin divizarea la 2.

Opțiunea <**Concentric**> este aleasă din Menu (Vif.7.6) pentru ca ulterior să fie realizate următoarele etape:

- <**primary radius**> este fixat ca și raza cercului roșu (Vif.7.7)
- <**secondary radius**> este raza cercului albastru și este stabilit în acest caz de 4 ori raza cercului roșu (Vif.7.8)
- Gradul de excentricitate al cercului albastru în raport cu cercul roșu este stabilit la **0 grade** în secțiunea <**Angle**> (Vif.7.9)
- Cercul roșu este plasat în jurul capului nervului optic prin plasarea mousului în centrul papilei, astfel încât cercul albastru își găsește poziția în aria peripapilară (Vif.7.10).

Rezultatele măsurătorilor sunt prezentate în caseta din dreapta sus (Vif.7.11). Aria leziunilor albe incluse în regiunea standardizată a cercului albastru este exprimată în *pixeli albi* și reprezintă măsurătoarea de interes în acest caz.

Vif.8.1 prezintă fotografia de fund de ochi înregistrată în timpul angiografiei fluoresceinice la un pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă exudativă inclus în grupul demonstrativ. Leziunea analizată este neovascularizația și leakage-ul interpretate ca și leziuni maculare albe, cu margini neregulate, situate în maculă și pozitive la angiografia fluoresceinică. Acest tip de leziune poate fi interpretat cantitativ atât prin celelalte metode publicate în literatură cât și prin metoda SITE-App.

Abilitatea software-ului SITE-App de a realiza toate tipurile de măsurători necesare pentru toate metodele cantitative permite comparația dintre metode și obținerea de concluzii referitoare la reproductibilitatea, sensibilitatea și acuratețea fiecăreia aceste metode.

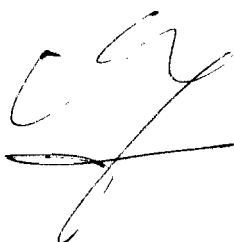
5 Fig.8 demonstrează, printr-o succesiune de instantanee video, aplicarea metodei și software-ului SITE-App precum și a celorlalte metode cantitative publicate în literatură care măsoară leziunile după delimitarea lor manuală cu mousul computerului. Rezultatele finale sunt aria leziunii exprimată în diferite unități de măsură în funcție de metoda utilizată.

10 După importarea imaginii în program (Vif.8.1), procesul începe cu măsurarea razei cercului roșu:

- Opțiunea <**Diameter/Area Method**> este aleasă din Menu (Vif.8.2),
- Opțiunea <**Draw Circle**> este utilizată pentru stabilirea *cercului roșu și a cercului albastru* împreună cu diametrele lor (Vif.8.3).
- 15 • Se desenează *cercul roșu* în jurul capului nervului optic. Valoarea diametrului cercului roșu este prezentată pe săgeata roșie și este exprimată în pixeli (Vif.8.4). Raza cercului roșu reprezintă jumătate din diametrul cercului roșu.

20 Este aleasă secțiunea <**Free Area**> (Vif.5) iar imaginea apare printr-un simplu click în mijlocul ferestrei. Pentru obținerea ariei delimitate cu mousul în cazul leziunilor multiple și omogene exprimate în diferite unități de măsură, sunt necesari următorii pași:

- Printr-un click continuu al butonului din stânga, se delimitează cu mousul prima parte a leziunii analizate (Vif.8.6).
- 25 • Se activează opțiunea <**Append**> pentru continuarea delimitării în același fel pentru următoarelor părți ale leziunii de interes (Vif.8.7)



- Alegând opțiunea <**Calculate**> leziunea analizată este prezentată în **verde**, pe fond **albastru** (Vif.8.8).
- La acest pas este necesară o corecție a delimitării leziunii analizate deoarece computerul poate interpreta ca o singură leziune anumite părți separate ale desenului neomogen. Interpretul analizează dacă
5 “**Forma este detectata corect?**”. Dacă există regiuni externe care ar trebui să nu fie incluse în regiunea analizată, răspunsul este <**No**> (Vif.8.9). Programul va corecta ulterior aria selecționată în acord cu aria delimitata de interpretul de imagine. Dacă aria este corect delimitată răspunsul final este <**Yes**> (Vif.8.10).
- Prin alegerea opțiunii <**Preview**> software-ul va prezenta leziunea analizată ca o combinație de **negru pur** și **alb pur**, după aproximarea scalei de griuri ca și negru pur sau alb pur (Vif.8.11). Această aproximare se face în acord cu poziționarea griurilor față de nivelul de
10 saturație de 50% - griurile sub 50% saturație vor fi asimilate ca și alb pur, în timp ce griurile peste 50% saturație ca și negru pur.

Caseta din dreapta sus (Vif.8.12) prezintă rezultatele diferitelor măsurători în funcție de metoda aleasă pentru interpretarea cantitativă a leziunii:

- **Aria acoperită de [pixeli negri]** este prezentată prima în casetă și relevă „leziunile negre” din interiorul ariei delimitate manual cu
20 mousul
- **Aria în [pixeli albi]** reprezintă „leziunile albe” incluse în leziunea neomogenă delimitată manual cu mousul
- **Cea mai mare dimensiune liniară a leziunii – GLD** este măsurată
25 dacă leziunea este interpretată ca una solitară. Acest parametru este exprimat în [**mm**], după considerarea aproximării diametrului capului nervului optic ca fiind 1.5 mm.



- *Aria leziunii delimitată manual cu mousul* este prezentată în număr [total de pixeli] sau în unități [MPS] (1 unitate MPS = aria capului nervului optic)

Fig.9 relevă măsurarea distanțelor pe imaginile înregistrate de la pacienții cu degenerescență maculară legată de vârstă incluși în grupul demonstrativ. Pe de o parte, utilitatea practică a acestor măsurători este legată de posibilitatea de măsurare a **celeii mai mari dimensiuni liniare a leziunii – GLD**, un parametru utilizat de metodele raportate anterior în literatură. Pe de altă parte, este posibil de măsurat anumite distanțe fixe ale fundului de ochi (ex. distanța dintre două vase de sânge normale, etc), care reprezintă parametri ce individualizează ochiul respectiv și pot fi utilizați pentru **definirea factorului de corecție Fx**.

Fig.10 demonstrează, ca o succesiune de instantanee înregistrate în timpul aplicării metodei și software-ului SITE-App, anumiți pași necesari pentru măsurarea celeii mai mari dimensiuni liniare a leziunii la un pacient cu degenerescență maculară legată de vârstă inclus în grupul demonstrativ. Măsurătorile urmează următorii pași:

- Imaginea este importată în program (Vif.10.1) și se alege secțiunea *<Diameter/Area Method>* din Menu (Vif.10.2).
- Opțiunea *<Draw circle>* este preferată pentru stabilirea cercului roșu care trebuie făcută în cel mai precis mod posibil (Vif.10.3).
- Ulterior, varianta fără cerc este aleasă prin dezactivarea opțiunii *<Draw circle>* (Vif.10.4), deoarece măsurătoarea celeii mai mari dimensiuni liniare a leziunii este mai ușoară cu segmentul albastru singur, decât cu combinația segment albastru și cerc aferent
- Valoarea în pixeli a **celeii mai mari dimensiuni liniare a leziunii** este prezentată pe săgeată albastră (Vif.10.5).

19-08-2010

CORECTAREA REZULTATELOR MĂSURĂTORILOR CU FACTORUL DE CORECȚIE F_x . Corectarea datelor cu un factor care depinde de **variația unghiului de incidență** sub care sunt înregistrate fotografiile trebuie luată în considerație pentru imaginile de fund de ochi.

5 Globul ocular este asimilat cu o sferă iar pereții săi sunt figuri geometrice spațiale, curbe într-o manieră tridimensională. În consecință, când se interpretează o imagine de fund de ochi, structura tridimensională a pereților oculari este asimilată cu un plan. Nici o funcție matematică nu este perfectă pentru corectarea acestei transformări (polinomială, afină, rotație, translație, etc), astfel încât aproximarea induce erori în toate interpretările matematice ale datelor [25].

Fig.11 relevă variația diferitelor distanțe fixe ale fundului de ochi în funcție de variația unghiului de incidență sub care sunt înregistrate fotografiile. Diametrul capului nervului optic a variat de la 90 pix (Fig.11.A), la 98 pix (Fig.11.B) până la 96 pic (Fig.11.C), în timp ce distanța între a 2-a și a 3-a ramificație a venei temporale superioare a fost modificată de la 196 pix, (Fig.11.A), la 195 pix (Fig.11.B), la 201 pix (Fig.11.C). Măsurătorile ariei capului nervului optic au arătat de asemenea modificări de la 6349 total pix (Fig.11.A), la 7521 total pix (Fig.11.B), la 7209 total pix (Fig.11.C).

20 În încercarea de a corecta erorile induse de variația unghiului de incidență și asimilarea structurilor retiniene curbe cu unele plane, am definit **factorul de corecție F_x** , un parametru caracterizând ultimul pas al metodei SITE-App – corectarea rezultatelor măsurătorilor.

F_x a fost definit ca și raportul dintre aria (πr^2) a aceluiași cerc fotografiat în două fotografii succesive A și B (Fig.9.A, B):

$$F_x = r_A^2 / r_B^2$$

Pentru a raporta o leziune din imaginea B la același unghi prin care imaginea A a fost înregistrată, aria S rezultată din măsurătorile imaginii B trebuie astfel multiplicată cu Fx:

$$S_B = S \times r_A^2 / r_B^2$$

5 Teoretic, orice segment fix poate fi utilizat pentru definirea factorului Fx: *diametrul capului nervului optic, distanțele dintre 2 ramuri succesive ale venelor temporale superioare, etc* (Fig.9.A,B). Pentru a verifica dacă această observație este reală, am utilizat metoda și software-ul SITE-App pentru
10 măsurători în subgrupul de imagini înregistrate de la pacienți incluși în grupul demonstrativ. Măsurătorile au demonstrat că nu este nici o diferență statistic semnificativă între diferitele segmente utilizate pentru definirea factorului de corecție Fx.

Standardizarea condițiilor de înregistrare a imaginilor stabilite de metoda SITE-App au urmărit să scadă erorile legate de variația mărimii și formei
15 imaginilor în condițiile variației unghiului de incidență sub care fotografiile sunt înregistrate. Prin centrarea fotografiilor de fund de ochi în centrul maculei (fovee) sau în centrul capului nervului optic, metoda SITE-App a scăzut aceste erori. După aplicarea factorului de corecție Fx suplimentar față de aceste condiții, eroarea legată de variația unghiului de incidență sub care se fac
20 fotografiile fundului de ochi este minimă.

INCIDENȚA SCAZUTĂ A ERORILOR COMPARATIV CU ALTE METODE. Necesitatea existenței unei noi metode de interpretare a leziunilor de fund de ochi în variate investigații oftalmologice care oferă informații despre leziunile din plan retinian a pornit de la observația că toate celelalte metode
25 publicate anterior, larg utilizate în trialuri clinice, sunt afectate de numeroase erori și astfel, oferă măsurători imprecise și nesigure.

Înainte de imaginarea noii metode, am început să evaluăm: „De unde vin erorile și cum pot fi ele evitate?”. Pentru a răspunde la aceste întrebări și a găsi soluțiile, am analizat procesul de interpretare a imaginilor în toate etapele sale:

1. *Captura și selectarea imaginilor.*

5 2. *Delimitarea ariei de interes pentru măsurători.*

3. *Procedeul de măsurare.*

Etapa de captură și selectare a imaginilor este un pas foarte important de la care începe toată analiza. Literatura oferă numeroase publicații în care autorii descriu condiții de bază pentru luarea de imagini: ***focalizarea cât mai exactă a imaginii, dilatație pupilară bună, contrast bun***, etc [1,25,57,58]. Există de asemenea și alte lucrări care descriu menținerea ***aceleiași magnificații a imaginilor*** ca fiind o condiție esențială de obținere a imaginilor care urmează a fi comparate [15,27,29,46,52,55,60]. Anumiți autori au sugerat normalizarea scalei tonurilor de gri prin utilizarea ***procesării imaginilor în Adobe Photoshop înainte de măsurători*** [24,30,59], în timp ce alții descriu ***utilizarea filtrelor Gaussiene*** suprapuse peste dispozitivele de captură a imaginii [25]. Totuși, nici una dintre aceste publicații nu a reunit toate aceste condiții de captură a imaginilor fundului de ochi și, din cunoștințele noastre, în nici un articol standardizarea iluminării în timpul fotografierii nu a fost luată în considerație.

20 - **CONSECUTIV ACESTOR OBSERVAȚII: Metoda SITE-App a standardizat condițiile pentru captura digitală a imaginilor fundului de ochi:**

- *Cameră întunecată* pentru fotografiere în scopul creării unor niveluri similare de iluminare ambientală pentru toată seria de fotografii [25]
- *Midriaza depășind 5 mm*, pentru a elimina umbrele determinate de marginea unei pupile mici [25]
- *Aceeași iluminare fixată în prima examinare a unui ochi, menținută pe toată seria înregistrată în dinamică la ochiul respectiv*, în scopul de a obține



19-08-2010

reflexii similare ale backgroundului fundului de ochi și un contrast similar între leziunile de fund de ochi și background la marginile leziunii; această condiție este citată în câteva alte publicații [24,25,42,55] dar nu s-a raportat găsirea unei soluții.

5

După analizarea imaginilor alb-negru de fund de ochi oferite de fundus camera, am observat că uneori, chiar și în aceste condiții de standardizare a capturii imaginii, mici mișcări ale camerei și modificarea unghiului de incidență sub care sunt înregistrate fotografiile pot încă influența umbrirea fotografiilor finale de fund de ochi.

10

- CONSECUTIV ACESTOR OBSERVAȚII: Metoda SITE-App menține procesarea imaginilor în Adobe Photoshop înainte de realizarea măsurătorilor, pentru a se obține cel mai bun contrast între leziunile analizate și backgroundul ocular.

15

Aria neovascularizației și leakage-ului evidente pe imaginile de angiografie fluoresceinică depind în mare măsură de timpii angiografici [1]. Numeroși autori au raportat măsurători pe secvențe selectate în timpul „**acelorași timpi angiografici**” reprezentând fazele principale ale angiografiei - precoce < 1 min, mediu 1-3 min și tardiv 5-10 min [4,5,22,29]. Totuși observațiile noastre indică faptul că intervalul dintre secvențele alese pentru interpretare trebuie să fie încă și mai mic, până la 30 secunde, deoarece umplerea vaselor patologice nu este uniformă și variază larg de la un ochi la altul.

20

- CONSECUTIV ACESTOR OBSERVAȚII: Metoda SITE-App a stabilit un interval între secvențele angiografice alese pentru măsurători de până la 30 secunde.

25




Arhitectura tridimensională a pereților oculari (ca ai unei sfere) la fel ca și mișcările fundus camerei pentru obținerea unei focalizări cât mai bune duc la modificări ale unghiului de incidență sub care sunt capturate imaginile [25,29], această modificare influențând semnificativ rezultatele măsurătorilor.

5 - **CONSECUTIV ACESTOR OBSERVAȚII: Metoda SITE-App a considerat două aspecte pentru corectarea acestor surse de eroare:**

- *Stabilirea unor condiții pentru captura fotografiilor:* imaginile de fund de ochi să fie centrate pe fovee pentru leziunile maculare sau în centrul capului nervului optic pentru leziunile peripapilare
- 10 • *Mentținerea corectării rezultatelor cu factorul de corecție Fx* definit mai sus

Delimitarea ariei de interes în care se fac măsurătorile este o sursă de eroare foarte importantă. Un singur interpret uman sau computerizat al imaginilor nu este suficient pentru obținerea unor rezultate precise, acest tip de
15 măsurători necesitând o combinație între computer și interpretul uman.

Toate celelalte metode cantitative publicate anterior realizează măsurători în interiorul **ariei delimitate manual cu mousul**, delimitare stabilită de interpretul uman. Într-o infinitate de puncte ale marginilor leziunii, un prim interpret uman face o primă interpretare a limitelor leziunii, opțiune care are
20 șanse foarte mici să fie aleasă în mare parte de al doilea interpret uman al imaginii, indiferent dacă fotografiile sunt interpretate după proiectarea lor pe un ecran mare și sunt de bună calitate. Astfel, delimitarea marginilor leziunii cu mousul reprezintă o sursă infinită de eroare, ceea ce induce în continuare erori în măsurători. Pe de altă parte, după delimitarea manuală a marginilor leziunilor
25 care sunt neregulate, computerul introduce o nouă serie de erori la nivelul unghiurilor și inflexiunilor.



- **CONSECUTIV ACESTOR OBSERVAȚII: Metoda SITE-App a standardizat aria de interes în interiorul căreia se realizează măsurătorile:**

➤ **Mai întâi, toate ariile măsurate sunt cercuri în interiorul cărora este inclusă leziunea analizată;** acest fapt reduce numărul de puncte în care interpretul uman are de făcut o anumită interpretare.

➤ **Tipul de standardizare a regiunilor de interes este adaptat leziunii analizate:**

- *Cerc circumscris* – pentru leziuni solitare,
- *Cerc tangent* – toate tipurile de leziuni din aria maculară
- *Cerc concentric* – toate tipurile de leziuni peripapilare

Considerând toate aceste observații și măsuri consecutive, software-ul și metoda SITE-App reduce incidența erorilor comparativ cu alte metode cantitative raportate anterior în literatură.

AVANTAJELE METODEI ȘI SOFTWARE-ULUI SITE-APP.

Aceste avantaje sunt determinate de standardizarea ariei de interes în interiorul căreia se fac măsurătorile:

- Metoda SITE-App poate interpreta cantitativ și **leziuni multiple și neomogene** (prin metoda cercului tangent pentru leziunile maculare), situație foarte dificilă sau uneori chiar imposibil de manageriat prin alte metode cantitative
- Metoda SITE-App poate de asemenea cuantifica **leziuni în jurul capului nervului optic** (prin metoda cercului concentric), acest tip de leziuni fiind imposibil de cuantificat prin celelalte metode
- Metoda SITE-App exprimă rezultatele măsurătorile în unități relative și de asemenea standardizează condițiile de captură a imaginii, astfel încât pentru un același ochi se pot combina și corela informațiile din mai multe tipuri de investigații oftalmologice (angiografie fluoresceinică,



examinarea în lumină aneritră, etc); astfel, *leziunile mixte* (ex. neovascularizație, fibroză, hemoragii subretiniene, etc) pot fi interpretate în dinamică, acest tip de leziuni fiind aproape imposibil de urmărit prin metodele raportate în literatură până în prezent.

5



5

REVENDICĂRI

1. Metodă pentru evaluarea cantitativă a leziunilor fundului de ochi pe
10 fotografiile alb-negru, înregistrate digital în diferite tipuri de investigații
utilizate în oftalmologie, spre exemplu angiografia fluoresceinică, examinarea
în lumină aneritră, tomografia în coerență optică OCT, oftalmoscopia prin
scanare laser, și altele asemenea, **caracterizată prin aceea că**, măsoară aria
leziunilor de interes exprimată în pixeli albi sau negri, culoare stabilită
15 convențional în funcție de tipul leziunii, pe fotografiile alb-negru realizate în
condiții prestabilite legate de iluminare, focalizarea imaginilor, dilatarea pupilei,
obscuritate ambientală și prelucrate ulterior în Adobe Photoshop pentru
regularizarea tonurilor de gri la un nivel de saturație până la 50% ca alb pur și
peste 50% saturație ca negru pur, măsurătorile fiind realizate în interiorul unor
20 arii standardizate stabilite în funcție de aspectul leziunilor de interes sub formă
de cerc albastru (b) circumscris leziunii, tangent sau concentric cu un cerc roșu
(a) de referință circumscris capului nervului optic, rezultatele finale fiind
corectate prin aplicarea unui factor de corecție F_x la variația unghiului de
incidență sub care sunt înregistrate fotografiile în examinări succesive, metoda
25 fiind aplicabilă și pe oricare alte fotografii alb-negru înregistrate digital în alte
investigații medicale spre exemplu computer tomografie, rezonanță magnetică
nucleară și altele asemenea.



19-08-2010

2. Metodă pentru evaluarea cantitativă a leziunilor fundului de ochi pe fotografiile alb-negru, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, în scopul stabilirii unei referințe fixe a strălucirii și contrastului pentru fiecare pereche de imagini comparate în interpretările longitudinale se îndeplinește un set de condiții preliminare pentru procesul de înregistrare a fotografiilor de fund de ochi, captura imaginilor fiind făcută în aceleași condiții de iluminare și magnificație pentru ambele imagini comparate, și realizată într-o cameră obscură, cu pupila dilatată peste 5 mm, pentru prevenirea umbrelor suplimentare, și o focalizare maximă a imaginii înainte de înregistrarea fotografiei pentru eliminarea reflexelor și umbrelor vizibile.

3. Metodă pentru evaluarea cantitativă a leziunilor fundului de ochi pe fotografiile alb-negru, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, procesarea imaginilor în Adobe Photoshop se face înainte de efectuarea măsurătorilor pe fotografiile alb negru, procesarea realizând regularizarea scalei tonurilor de gri și mărirea contrastului dintre leziunile retiniene și backgroundul fundului de ochi.

4. Metodă pentru evaluarea cantitativă a leziunilor fundului de ochi pe fotografiile alb-negru, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, măsurătorile se fac în interiorul unor regiuni standardizate sub formă de cerc albastru (b) a cărui diametru este ales ca multiplu al diametrului cercului roșu (a) circumscris capului nervului optic și luat ca referință, poziția cercului albastru fiind aleasă în funcție de tipul leziunii de interes după cum urmează: cerc albastru circumscris leziunii de interes pentru leziuni solitare, cerc albastru tangent la cercul roșu și incluzând leziunile de interes când acestea sunt plasate în regiunea maculară, cerc albastru concentric cu cercul de referință roșu pentru leziunile multiple situate în jurul capului nervului optic.



19-08-2010

5. Metodă pentru evaluarea cantitativă a leziunilor fundului de ochi pe fotografiile alb-negru, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că,** utilizează un factor de corecție F_x definit ca raport dintre aria (πr^2) a aceluiași cerc fotografiat în două fotografii succesive (A și B), $F_x = r_A^2 / r_B^2$, pentru corecția rezultatelor la variația unghiului sub care se fotografiază imaginile, pentru raportarea unei leziuni din a doua imagine (B) la același unghi sub care prima imagine (A) a fost înregistrată, aria cercului (S) rezultată din măsurătorile din a doua imagine (B) fiind corectată cu factorul F_x , încât $S_B = S \times r_A^2 / r_B^2$.

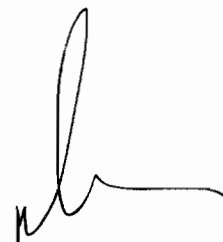
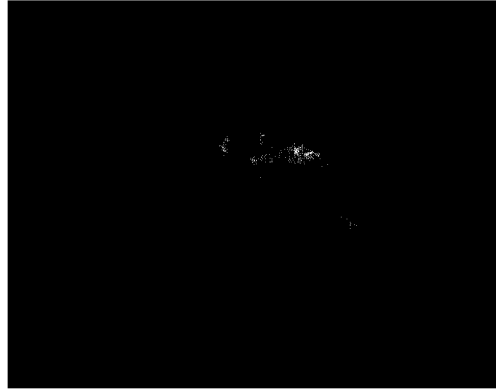
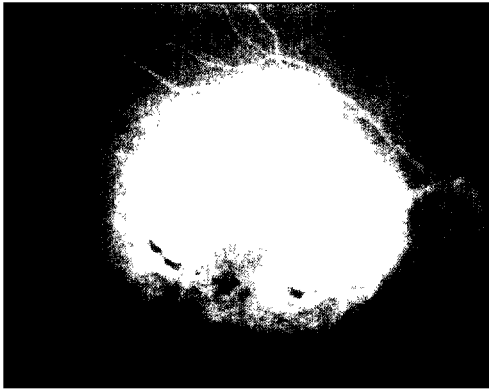


Fig. 1



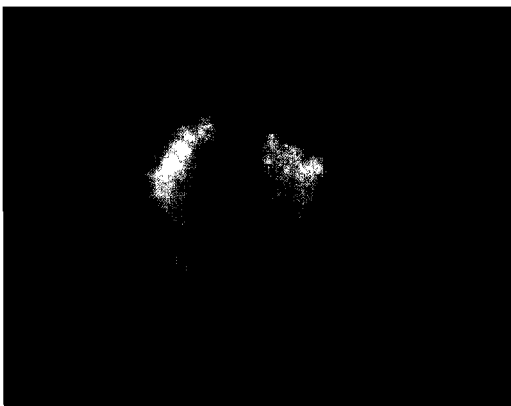
5

Fig. 1A.

Fig. 1B.

10

Fig.2.



15

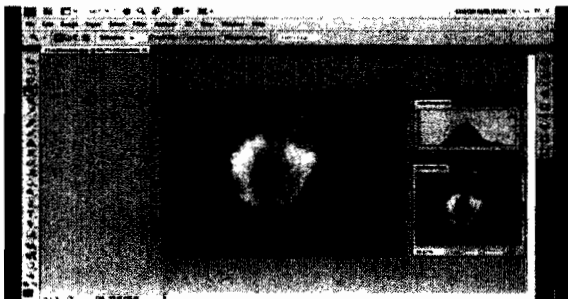
Fig.2A.

Fig.2B.

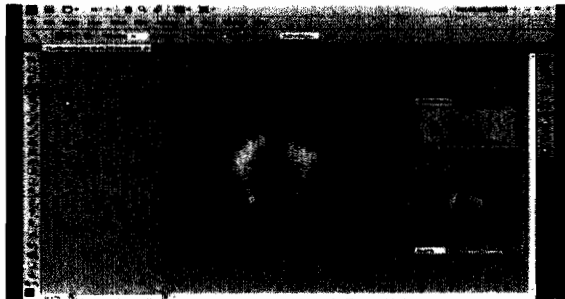
20

Fig.3.

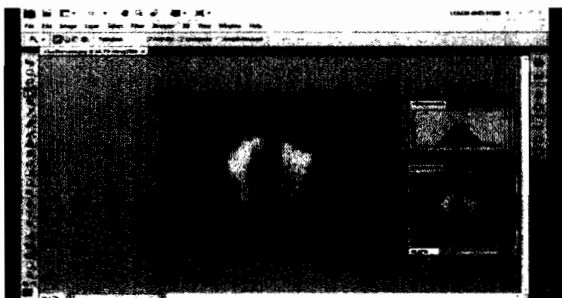
41



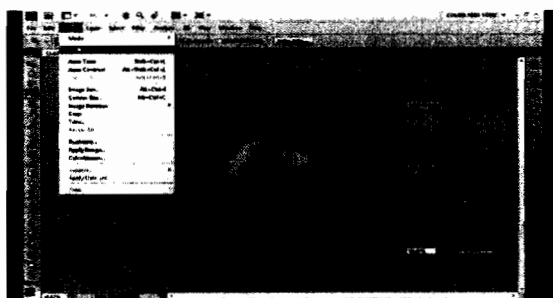
Vif.3.1



Vif.3.2

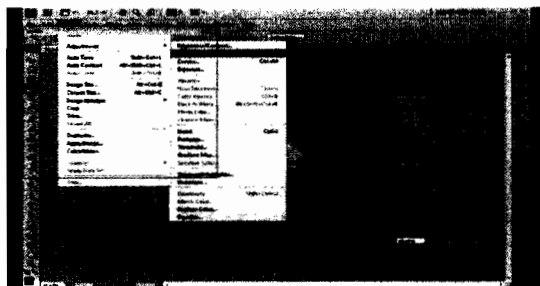


Vif.3.3



Vif.3.4

5



Vif.3.5

10

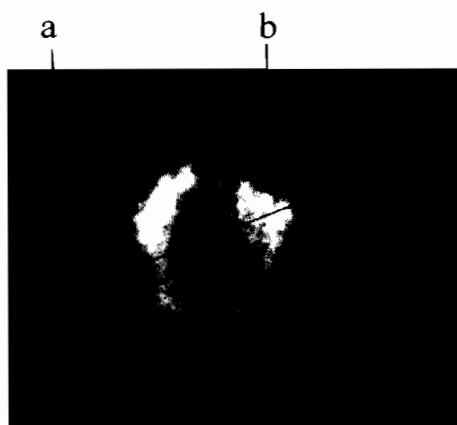


Fig.4A.

Fig.4

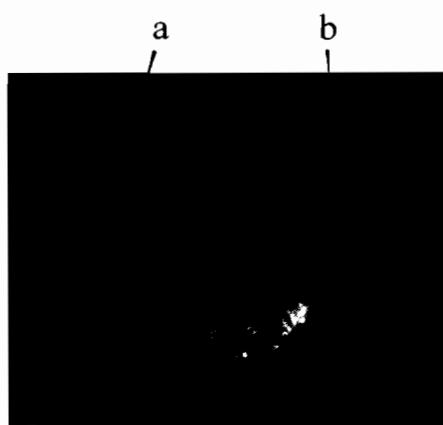


Fig.4B.

15

19-08-2010

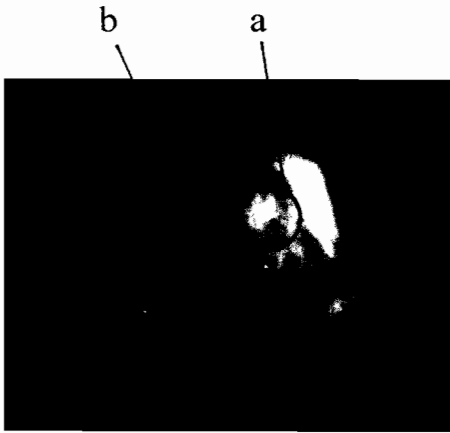


Fig.4C.

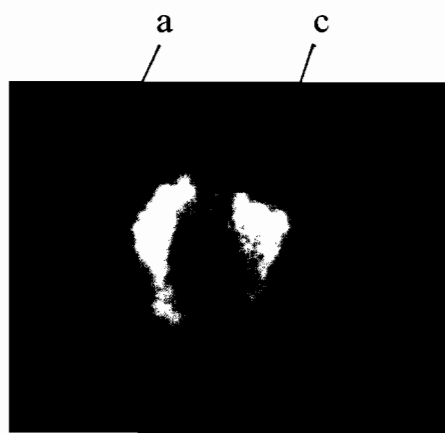
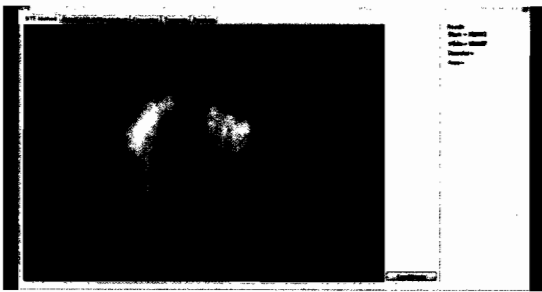


Fig.4D.

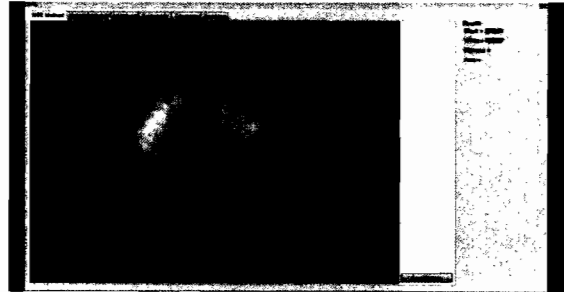
5

Fig.5

10

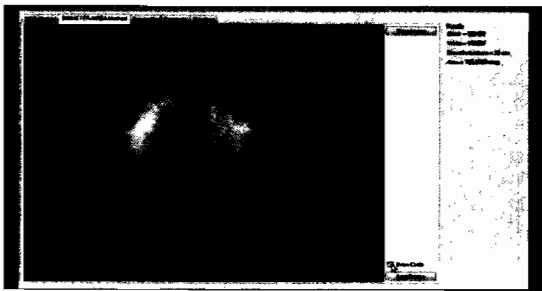


Vif.5.1

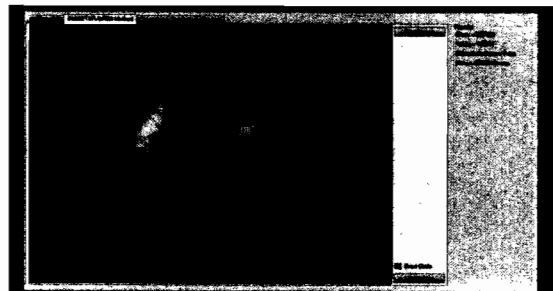


Vif.5.2

15



Vif.5.3



Vif.5.4

20

Handwritten signature

Handwritten signature

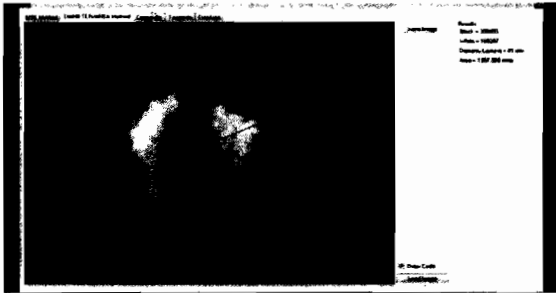


Vif.5.5

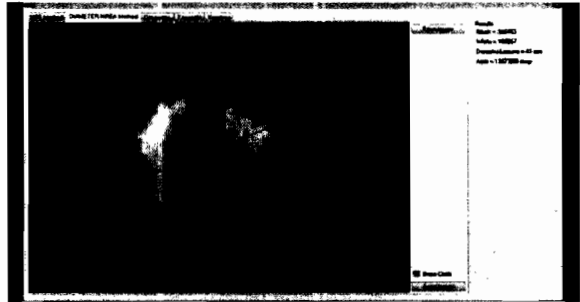


Vif.5.6

5

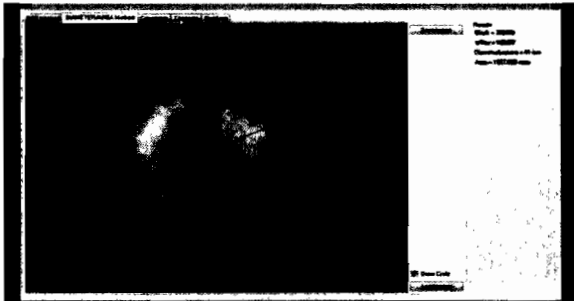


Vif.5.7

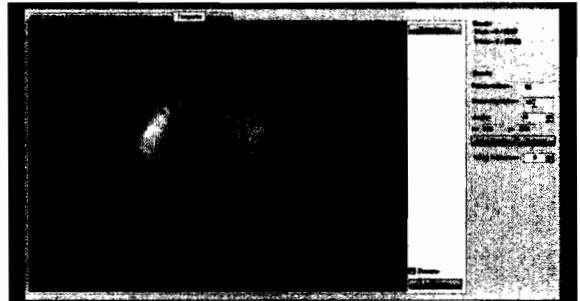


Vif.5.8

10

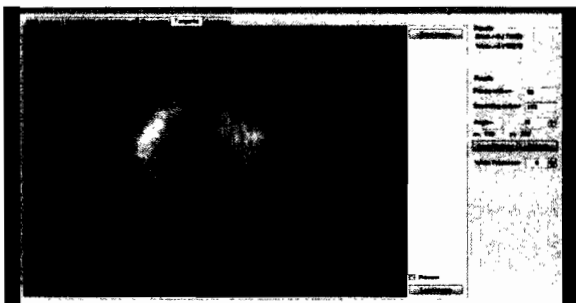


Vif.5.9

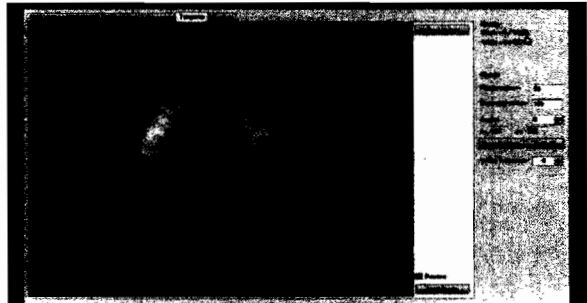


Vif.5.10

15



Vif.5.11

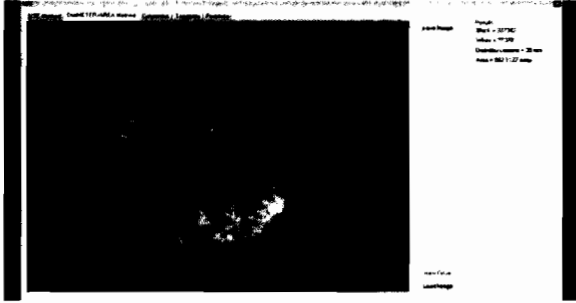


Vif.5.12

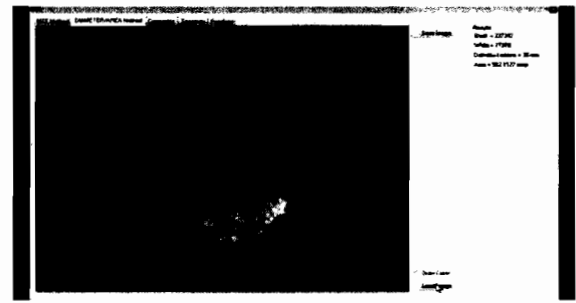
cy

de

Fig.6.

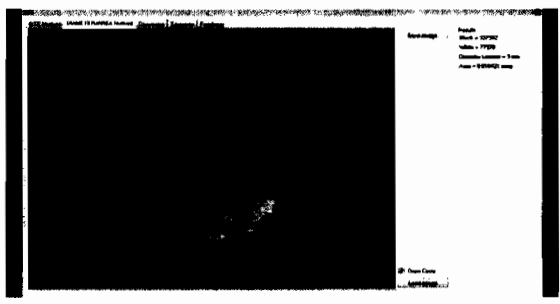


Vif.6.1

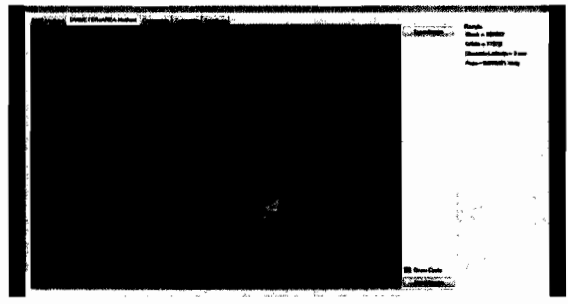


Vif.6.2

5

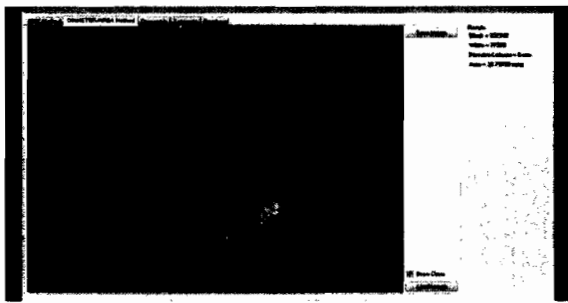


Vif.6.3

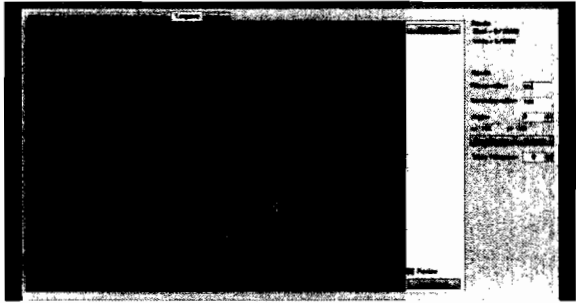


Vif.6.4

10

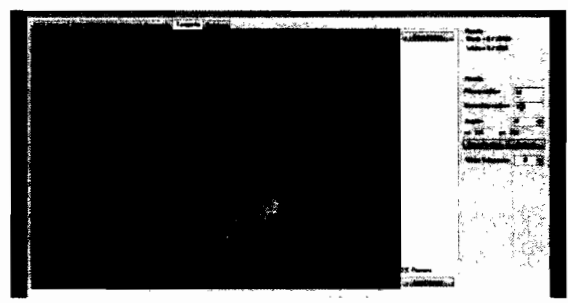


Vif.6.5

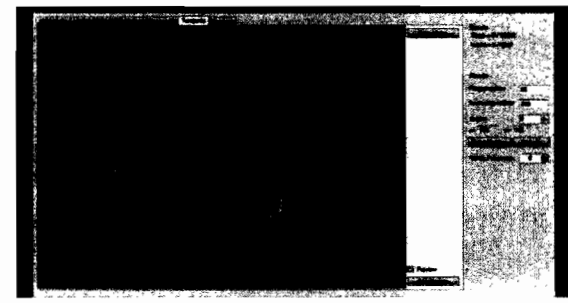


Vif.6.6

15



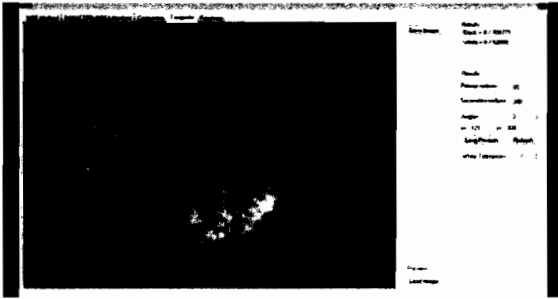
Vif.6.7



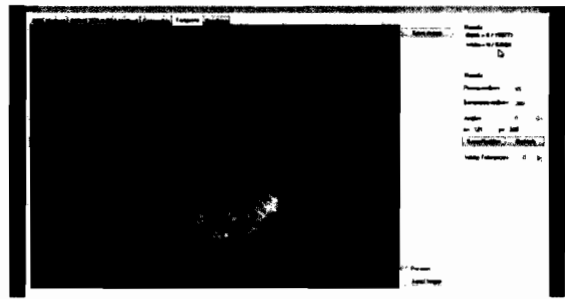
Vif.6.8

Handwritten signature

Handwritten signature



Vif.6.9



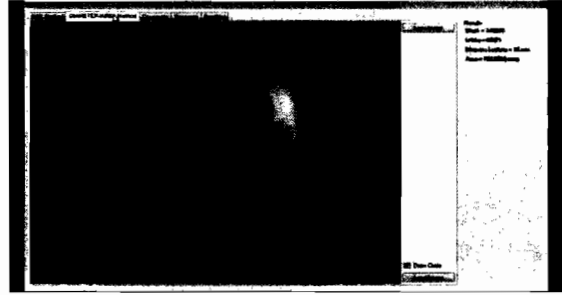
Vif.6.10

5

Fig.7

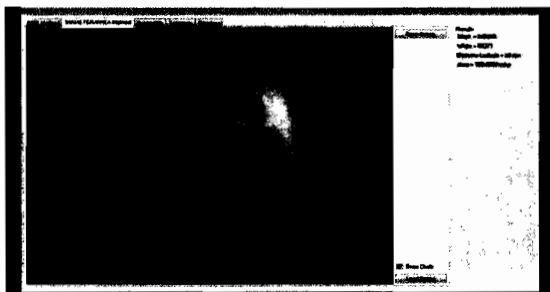


Vif.7.1

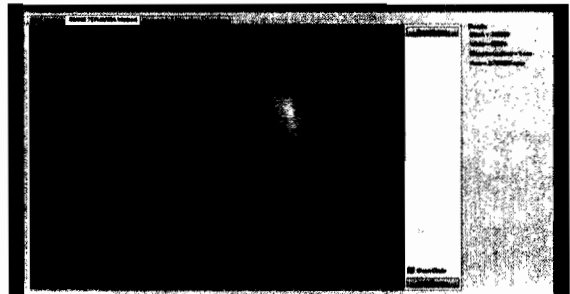


Vif.7.2

10

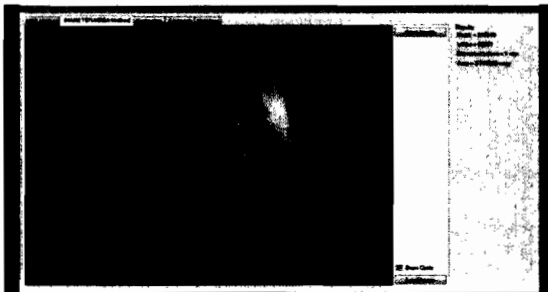


Vif.7.3

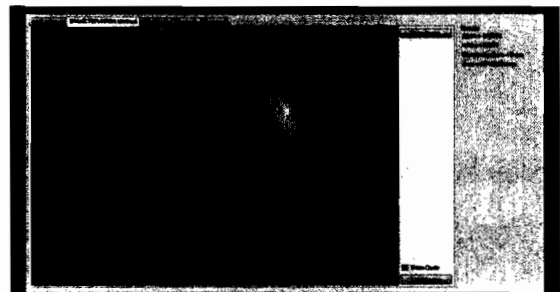


Vif.7.4

15



Vif.7.5



Vif.7.6



Vif.7.7



Vif.7.8

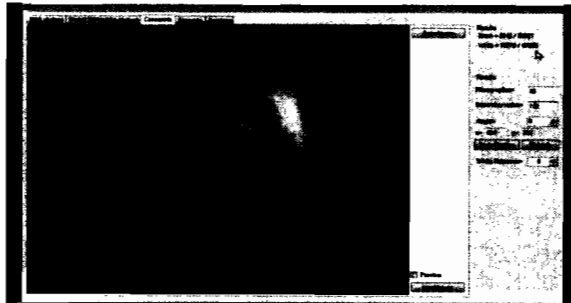


Vif.7.9



Vif.7.10

5



Vif.7.11

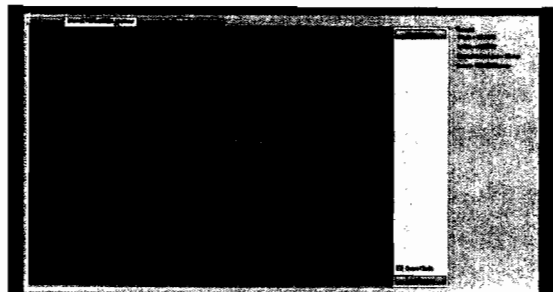
10

Fig.8

15



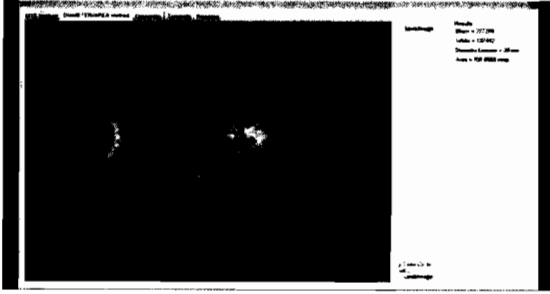
Vif.8.1



Vif.8.2

chy

AL

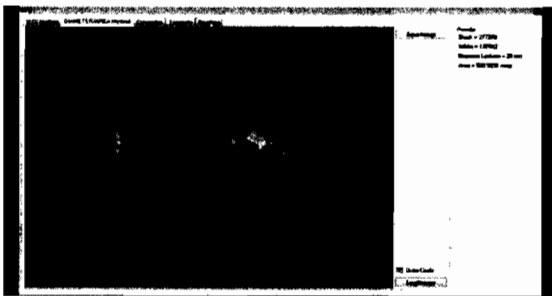


Vif.8.3



Vif.8.4

5

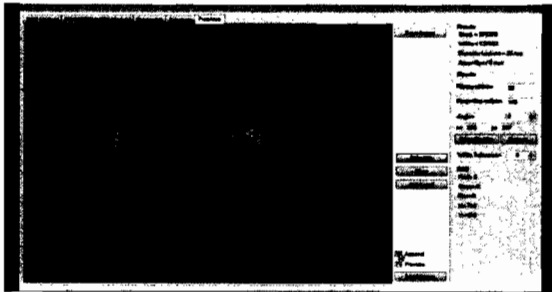


Vif.8.5

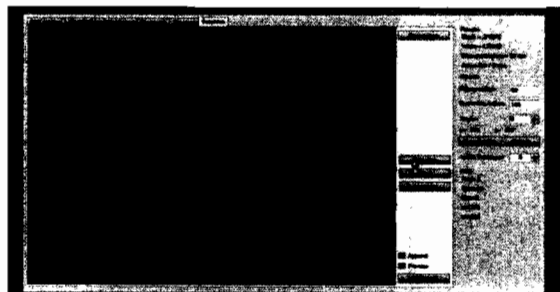


Vif.8.6

10



Vif.8.7

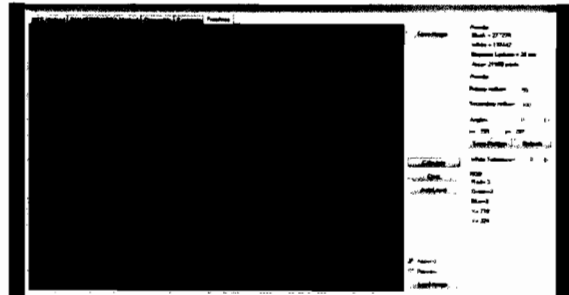


Vif.8.8

15



Vif.8.9

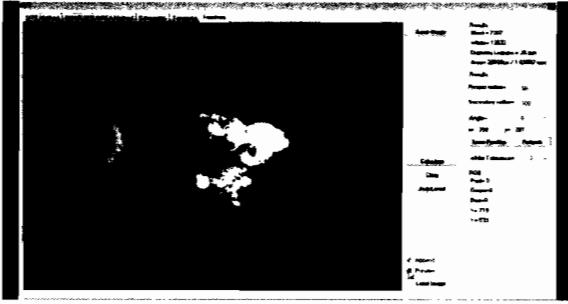


Vif.8.10

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

MR



Vif.8.11



Vif.8.12

5

Fig.9

.0

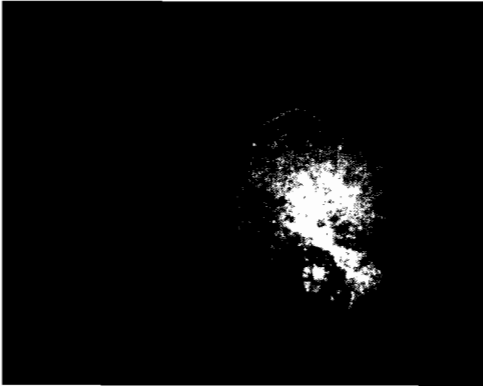


Fig.9A.



Fig.9B.

15



Fig.9C.

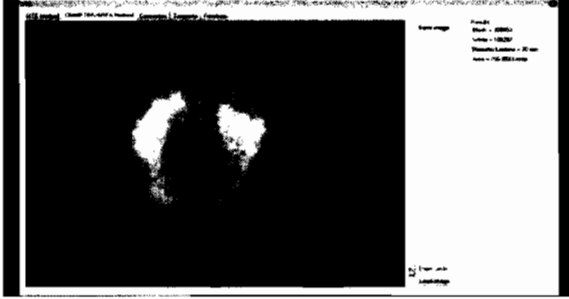
20

ccy

MR

Fig.10

5

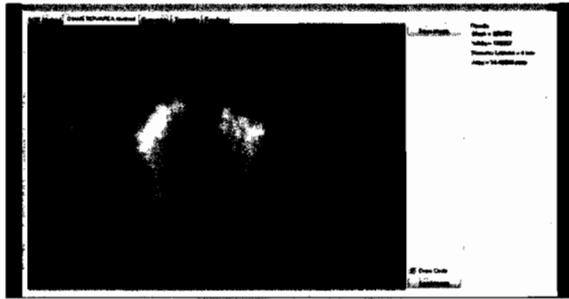


Vif.10.1

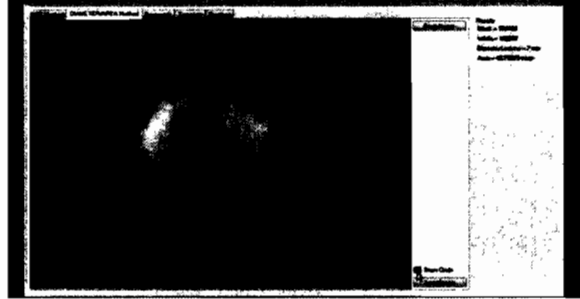


Vif.10.2

0

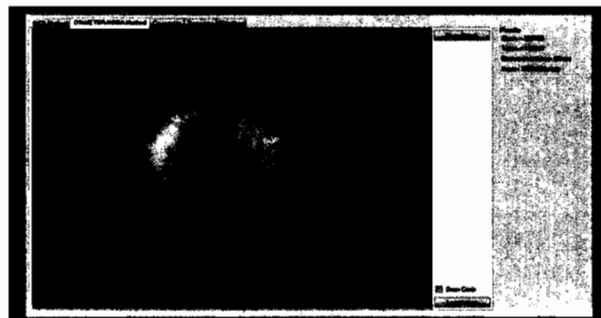


Vif.10.3



Vif.10.4

15



Vif.10.5

20

cy

50

D. H.

Fig.11



Fig.11A.

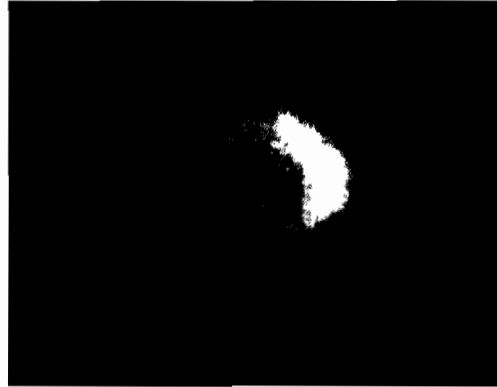


Fig.11B.

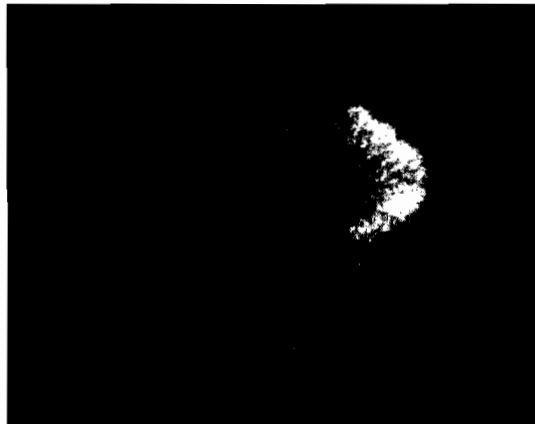


Fig.11C.

5

10

15

copy

Handwritten signature