



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2019 00591**

(22) Data de depozit: **24/09/2019**

(41) Data publicării cererii:  
**28/08/2020** BOPI nr. **8/2020**

(71) Solicitant:  
• **CĂLIN VIOLETA LIUBA, ȘOS.OLTENIȚEI, NR.142, BL.4, SC.4, AP.138, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MIHĂILESCU MONA, ALE.SOMEȘUL RECE, NR.21, BL.8, SC.3, ET.1, AP.40, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MOISESCU GEORGETA MIHAELA, STR.ORȘOVA, NR.10, BL.F4, SC.1, AP.15, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **SAVOPOL TUDOR, STR. BOZIENI NR. 2, BL. 833, SC. B, AP. 72, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **CĂLIN VIOLETA LIUBA, ȘOS.OLTENIȚEI, NR.142, BL.4, SC.4, AP.138, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MIHĂILESCU MONA, ALE.SOMEȘUL RECE, NR.21, BL.8, SC.3, ET.1, AP.40, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MOISESCU GEORGETA MIHAELA, STR.ORȘOVA, NR.10, BL.F4, SC.1, AP.15, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **SAVOPOL TUDOR, STR. BOZIENI NR. 2, BL. 833, SC. B, AP. 72, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE CLASIFICARE A GRADULUI DE MALIGNITATE A PROBELOR DE BIOPSIE DE ȚESUT PRIN MICROSCOPIE HOLOGRAFICĂ DIGITALĂ**

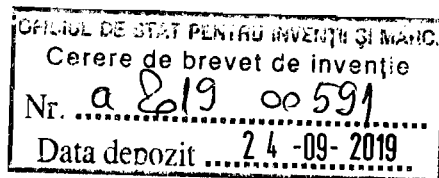
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de clasificare a gradului de malignitate a probelor de biopsie de țesut prin microscopie holografică digitală. Procedeu constă în achiziționarea unor imagini de microscopie holografică digitală de pe lame histologice necolorate, conținând probe bioptice, reconstruirea unor imagini de fază, și calcularea unor parametri specifici de fază BMF, bazați pe distribuția valorilor de întârziere de fază

în imaginea reconstruită, și clasificarea probelor în funcție de gradul de malignitate, prin compararea valorilor parametrilor de fază BMF cu niște valori de referință.

Revendicări: 3  
Figuri: 4





## **PROCEDEU DE CLASIFICARE A GRADULUI DE MALIGNITATE A PROBELOR DE BIOPSIE DE TESUT PRIN MICROSCOPIE HOLOGRAFICA DIGITALA**

Inventia se refera la un procedeu de clasificare a probelor de biopsie de tesut cu scop medical de diagnostic si de cercetare biomedicala. Este destinat medicinei umane (in domeniile: oncologie si anatomopatologie) si cercetarii biomedicale (in domeniile: studii preclinice si de dezvoltare tehnologica).

In prezent pentru analiza in scop diagnostic a tesutului bioptic sunt cunoscute mai multe metode anatomopatologice ce folosesc lame histologice (1). Metodele constau in vizualizarea la microscopul in camp luminos a probelor de tesut, sectionate, fixate si colorate cu coloratii specifice. In cazul metodelor histopatologice clasice, proba de tesut fiind incoloră, pentru a putea fi analizata trece printr-o etapă de colorare. In baza afinitatii selective a colorantilor folositi (coloranți bazici tip: hematoxilina, albastru de toluidina, albastru de metilen sau coloranți acizi tip: eozina, oranj G, fucsina acidă), anatomopatologul identifica structurile tisulare, celulele si organele celulare si poate sa diagnosticheze proba ca fiind normala sau canceroasa. O metoda histopatologica avansata este imunohistochimia, o metodă de diagnostic ce combina tehnicile histologice cu cele imunologice și biochimice cu scopul identificării componentelor celulare și tisulare cât mai specific posibil printr-o reacție antigen-anticorp. Tehnicile imunohistochimice au crescut siguranta diagnosticului final anatomopatologic, mai ales în cazul tumorilor cu grad scăzut de diferențiere, a tumorilor rare, a tumorilor cu malignitate incertă sau a formațiunilor tumorale pentru care colorațiile uzuale nu aduc informații despre originea proliferării celulare. Larga răspândire a utilizării imunohistochimiei a impus nevoia de standardizare a metodei pentru o mai bună reproductibilitate.

Metodele uzuale de diagnostic anatomopatologic constau intr-o succesiune de etape care necesita multe consumabile cu cost ridicat (mai ales in cazul inumohistochimiei) si necesita un timp lung de procesare. Este necesar un volum mare de munca din partea personalului medical care trebuie sa scaneze vizual intreaga lama, gradul de subiectivitate in evaluarea lamei variind in functie de experienta sau specializarea acestora. Acuratetea diagnosticului poate fi influentata de cativa factori printre care: calitatea probei biologice, artefactele de preparare care apar in procesul de colorare si experienta medicului anatomopatolog. Metodele histopatologice reprezinta in prezent standardul de aur pentru diagnosticul in oncologie. Avand in vedere

dezavantajele prezentate anterior, cercetarea biomedicală este în căutarea unor metode complementare care să aducă un plus de acuratețe în condiții de timp redus de prelucrare a probei tisulare.

Clasa generală a metodelor din care face parte invenția noastră este cea bazată pe metode interferometrice. Acestea folosesc fasciculele difractate de probele studiate: celule și tesuturi montate pe lame fără a fi supuse colorațiilor uzuale și printr-un procedeu sau altul le suprapun cu fascicule de referință. Există mai multe categorii de metode interferometrice: microscopie holografică digitală (MHD) în configurație *off-line* (2) și *in-line* (3); microscopie cantitativă de fază (4), microscopie Hilbert de fază (5), microscopie de fază de difracție (6), interferometrie cu întârziere de fază (7), microscopie SLIM (8), tomografie de difracție în lumină albă (WLDT) (9), microscopie Fourier de fază (10), microscopie interferometrică în dispersie de fază (11).

Majoritatea brevetelor internaționale bazate pe astfel de metode sunt de dezvoltare tehnologică inclusiv pentru miniaturizare sau portabilitate (12), sau se adresează celulelor izolate în cultură (13) sau din sânge (14).

Sunt cunoscute câteva procedee bazate pe metode interferometrice care se adresează tesuturilor, dar care, în mod diferit față de invenția noastră, se bazează pe difracție în lumină albă (WLDT) (15) sau pe configurația SLIM (16, 17). Față de aceste metode invenția noastră aduce în plus avantajul achiziționării imaginilor de fază pentru reconstrucțiile 3D dintr-o singură expunere, fără necesitatea scanării probei (SLIM) sau combinarea mai multor imagini cu diferența de fază (WLD).

La nivel național nu am găsit patente depuse pentru caracterizarea biopsiilor necolorate de țesut prin metoda MHD în scop diagnostic și de cercetare.

Procedeu propus în invenția noastră are ca obiectiv: clasificarea în scop diagnostic a probelor de biopsie de țesut printr-o metodă cu grad ridicat de obiectivitate folosind o probă biologică preparată prin procedeu simplificat într-un timp redus, cu consum redus de chimicale.

O problemă pe care o rezolvă procedura propusă prin această invenție este reducerea timpului dintre colectarea probei și diagnostic prin folosirea unei metode de microscopie specială care înregistrează imagini ale lamelor histologice necolorate (protocolul de preparare a probelor este simplificat prin eliminarea etapelor de colorare).

O a doua problema pe care o rezolva procedura propusa este consumul redus de chimicale pentru prepararea probei de tesut, acesta reducându-se pentru ca lamele nu mai necesita colorare.

O a treia problema pe care o rezolva procedura propusa este legată de expunerea personalului medical la solventi si compusi nocivi, această expunere fiind redusa pentru că piesele de biopsie de țesut nu mai necesita colorare.

O a patra problema pe care o rezolva procedura propusa este legata de minimizarea erorii umane in interpretarea si clasificarea probelor biologice prin faptul ca procedura ofera parametri obiectivi de interpretare a leziunilor tisulare.

O a cincea problema pe care o rezolva procedura propusa este legata de minimizarea artefactelor de preparare a probelor biologice prin faptul ca procedur se bazeaza pe o proprietate intrinseca a tesutului (introducerea unei diferente de faza in lumina care o strabate).

Din probele recoltate din tesut se prepara lame histologice fixate, dar necolorate. Lamele necolorate sunt vizualizate in microscopie holografica digitala MHD. Metoda MHD este adecvata pentru probe transparente pentru ca este o procedura care se bazeaza pe inregistrarea diferentelor de indice de refractie din diferitele zone ale lamei histologice. Imaginile reconstituite sunt clasificate ulterior pe baza parametrilor extrasi din valorile de faza (numiti biomarkeri de faza BMF) in concordanta cu criteriile anatomopatologice.

Procedeul cuprinde:

1. **Metoda de preparare a probelor necolorate de biopsie de tesut** consta intr-un procedeu derivat din anatomopatologie cu obtinerea unui strat de tesut cu grosime uniforma (pana in 10 micrometri), fixat pe o lama de microscopie si necolorat.
2. **Metoda de inregistrare si reconstructie a imaginilor de microscopie holografica digitala (iMHD)** cuprinde doua etape de lucru: i) inregistrarea unei holograme in dispozitiv interferometric in configuratie Mach-Zender si ii) in reconstructia numerica a iMHD printr-o procedura derivata din teoria scalara a difractiei. Se obtine iMHD.
3. **Metoda de calculare a parametrilor de faza (BMF)** din imaginile reconstituite iMHD prin calculul unor indicatori statistici care descriu distributia fazei in pixelii iMHD.
4. **Metoda de decizie** este bazata pe valorile BMF si duce la clasificarea biopsiei de tesut ca „normala” sau „canceroasa de grad 1, 2, 3, ....”. Criteriile cantitative de luare

a deciziei sunt dependente de tipul tusutului tumoral si de valorile acestor parametri in cadrul tesului sanatos. Combinatia de parametri BMF prezentand diferente semnificative statistic in baza careia se va lua decizia este specifica fiecarui tip de tesut.

In MHD agentul de contrast este reprezentat de indicele de refractie al probei, de aceea metoda poate fi folosita cu succes pentru vizualizarea specimenelor transparente, fara sa fie nevoie de colorare sau marcare specifica. Imaginile obtinute prin acest tip de microscopie se numesc imagini de microscopie holografica digitala (iMHD) si reprezinta harti de densitate ale tesutului sau celulelor vizualizate. S-a demonstrat ca aparitia anormalitatilor in celule si tesuturi influenteaza distributia densitatii de proteine, acest fapt stand la baza unor biomarkeri de malignitate pentru celule (18) si tesuturi (19). Pentru a intelege principiul de functionare al MHD sa ne reamintim principiul general de inregistrare a unei imagini de microscopie optica in camp luminos: se capteaza lumina dupa ce a strabatut proba, imaginea vizualizandu-se in ocularul microscopului sau inregistrandu-se pe senzorul unei camere digitale. Informatia continuta in frontul complex de unda luminoasa este reprezentata de amplitudine, faza si stare de polarizare (20). Ceea ce se inregistreaza in microscopia optica este modificarea parametrului amplitudine, motiv pentru care obiectele transparente (cum ar fi celulele sau tesuturile) se vizualizeaza cu un contrast foarte slab. De aceea se procedeaza la colorarea probelor sau marcare fluorescenta. Vizualizarea obiectelor transparente este posibila in conditii imbunatatite daca se inregistreaza in plus si modificari ale celui de-al doilea parametru al frontului de unda luminos care strabate proba, si anume faza.

Legatura dintre parametrul faza si indicele de refractie este redata de ecuatia (1).

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} DO = \frac{2\pi}{\lambda} (n_p - n) h_p \quad (1)$$

La trecerea printr-o probă semitransparentă lumina având lungimea de unda  $\lambda$ , suferă un proces de *intârziere de fază* ( $\Delta\varphi$ ).  $\Delta\varphi$  este proporțional cu drumul optic strabatut de lumina (DO), deci cu înălțimea probei ( $h_p$ ) multiplicată cu diferența dintre indicele de refracție al probei ( $n_p$ ) și cel al mediului ( $n$ ) (20). Inregistrarea parametrului intarziere de faza este posibila in montaje interferometrice de diferite tipuri, unul dintre acestea fiind montajul de microscopie holografica digitala *off-axis* folosit in prezentul procedeu. Este inregistrata intai o imagine de

interferența numită hologramă (inducă figura), apoi prin procesare numerică a acestei holograme se reconstruiește iMHD, așa cum este prezentată în figura (2b) (2).

Legătura dintre întârzierea de fază și densitatea de proteine a probei a fost pusă în evidență de studiile lui Barer, care a determinat încă din 1957 indicele de refracție al eritrocitelor și a stabilit legătura dintre indicele de refracție celular și conținutul de proteine. Conform acestui autor, valoarea indicelui de refracție celular crește liniar cu conținutul de proteine (proteinele au un indice de refracție situat în intervalul 1.50-1.58), conform ecuației (2) (21, 22):

$$n = n_0 + \alpha C \quad (2)$$

unde  $n$  este indicele de refracție al celulei,  $n_0$  este indicele de refracție al apei,  $C$  este concentrația (în g/mL) de proteine din soluție și  $\alpha$  (mL/g) este așa numitul *increment de refracție*, care arată cu cât crește indicele de refracție pentru fiecare procent de concentrație de proteine. Pentru marea parte a moleculelor de interes biologic – proteine, acizi nucleici etc,  $\alpha$  a fost determinat de J. Barer prin metode interferometrice clasice ca având valori între 0.18-0.21 mL/g.

iMDH conține dimensiunile testului transparent în plan transversal și o valoare de întârziere de fază în fiecare pixel, dependentă de înălțimea și de indicele de refracție al probei în acel pixel, conform ecuației (1). În cazul probelor de țesut fixate și tăiate la microtom, înălțimea probei este constantă și echivalentă cu grosimea de tăiere în microtom. iMHD este astfel o hartă a distribuției de indice de refracție și, având în vedere ecuația (2), este în același timp, o hartă a distribuției proteinelor în țesut.

Progresia către malignitate a celulelor determină modificări în conținutul și distribuția proteinelor, de aceea porțiunile de țesut malignizat din biopsii pot fi detectate prin parametri specifici calculați din valorile de fază în imaginile de tip iMHD înregistrate pe proba tisulară necolorată (23, 24).

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Reducerea semnificativă a timpului total de până la diagnostic, comparativ cu metodele standard anatomopatologice. Aceasta se realizează prin reducerea timpului de preparare a lamelor (etapa de colorare se elimină total, iar etapa de incorporare în parafină este opțională).
- Costurile reduse ale procedurii (prin eliminarea consumabilelor necesare colorării lamelor).
- Acuratetea crescută prin eliminarea artefactelor.

- Obiectivizarea deciziei prin oferirea unor parametri cantitativi care caracterizeaza portiunile de tesut.
- Procedura poate fi automatizata in vederea realizarii unui diagnostic asistat de computer.

Se da in continuare un exemplu de realizare a procedurii pentru tesut cerebral obtinut prin resectie chirurgicala sau biopsie de gliom, in leatura cu figurile care reprezinta:

*Fig 1 reprezinta o lama clasica (a), preparata prin colorarea probei de tesut si o lama necolorata, preparata conform procedurii propuse spre brevetare (b)*

*Fig 2 prezinta holograma (a) si reconstructie (b) pentru biopsie de tesut de gliom*

*Fig 3 prezinta holograma (a) si reconstructie (b) pentru biopsie de tesut de mucoasa colonica*

*Fig 4 prezinta lama necolorata cu marcarea a doua zone: normal ( $z_1-z_3$ ) si malign ( $z_4-z_6$ )*

Procedeul poate fi utilizat pentru diagnosticul rapid si stadializarea a biopsiilor cerebrale in ajutorul clinicienilor (chirurgi, anatomopatologi), stadializarea rapida a tumorilor de tip gliom fiind de importanta maxima in alegerea terapiei adecvate si optimizarea ratei de supravietuire a pacientului. Etapele de lucru sunt descrise in continuare:

1. **Metoda de preparare a probelor necolorate de biopsie de tesut** consta in a) recoltarea probei prin resectie chirurgicale sau endoscopice; b) fixare in solutie tamponata de formaldehida; c) orientare si prelucrare macroscopica; d) optional: prelucrare in parafina sau inghetare; e) sectionarea blocurilor cu grosimi definite, maxim 10  $\mu\text{m}$ ; f) lipirea si uscarea sectiunilor pe lama; g) eliminarea parafinei (daca este cazul) prin dizolvare in xilen, spalare cu apa si deshidratare prin utilizarea unor concentratii crescatoare de etanol (70° 80° 90° alcool absolut); h) montarea in mediu de montare bazat pe xilen si acoperirea cu o lamela de microscop.

Ca urmare a parcurgerii acestor etape se va obtine o lama necolorata, asa cum e prezentata in figura (1b).

In continuare se inregistreaza holograme pe aceasta proba tisulara, metoda de lucru este prezentata mai jos.

2. **Metoda de inregistrare si reconstructie a imaginilor de microscopie holografica digitala iMHD**

In prima etapa de lucru se inregistreaza holograme (fig 2a). folosind un dispozitiv interferometric in configuratie Mach-Zender in configuratie off-axis Intr-o a doua etapa se realizeaza reconstructia numerica a hologramelor (fig 2b) cu obtinerea unei iMHD printr-o procedura

derivata din teoria scalara a difractiei. Se obtine o iMHD ca in figura (2b), avand 750x750 pixeli care corespund unei zone de 235x235 micrometri.

In continuare se calculeaza un set extins de parametri de faza BMF pentru fiecare iMHD, detaliile fiind prezentate in metoda de mai jos:

### 3. Metoda de calculare a parametrilor BMF din imaginile reconstituite

Fiecare pixel  $k$  din imaginea iMHD va contine o valoare a diferentei de faza  $\Delta\phi_k$ , conform ecuatiei (1), astfel incat pentru toata imaginea vom avea o matrice de valori de diferente de faza cu  $p$  elemente, unde  $p$  este numarul total de pixeli ai imaginii. Utilizand un program de tip Matlab sau Python se calculeaza mai multi parametri derivati din valorile diferentelor de faza, dintre care o parte sunt prezentati in ecuatiile urmatoare:

$$Media(\mu) = \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p \Delta\phi_k \quad (3)$$

$$Varianta(var) = \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p (\Delta\phi_k - \mu)^2 \quad (4)$$

$$Kurtosis(kurt) = \frac{p \sum_{k=1}^p (x_k - \mu)^4}{\left[ \sum_{k=1}^p (x_k - \mu)^2 \right]^2} \quad (5)$$

$$Skewness(ske) = \frac{\frac{1}{p} \sum_{k=1}^p (x_k - \mu)^3}{\left[ \sqrt{\frac{1}{p} \sum_{k=1}^p (x_k - \mu)^2} \right]^3} \quad (5)$$

$$Energia(eng) = \frac{\lambda}{2\pi} \sum_{k=1}^p \Delta\phi_k \quad (6)$$

$$Entropia(ent) = \sum_{k=1}^p \left[ p(\Delta\Phi_k) \times \log_2(p(\Delta\Phi_k)) \right] \quad (7)$$



Pot fi utilizati si parametrii *Mediana (med)*, calculat prin construirea histogramei valorilor de faza pentru fiecare imagine si selectarea valorii situate la mijlocul intervalului in care se situeaza valorile diferentelor de faza si *Mod (mod)*, calculat tot din histograma, prin selectarea valorii cu cea mai mare frecventa de aparitie.

Ca urmare a parcurgerii acestei etape se va obtine un set de BMF pentru fiecare imagine iMHD.

#### 4. Metoda de decizie bazata pe valorile parametrilor BMF pentru clasificarea biopsiei de tesut tumoral de gliom

Criteriile cantitative de luare a deciziei sunt dependente de tipul tesutului tumoral si de valorile acestor parametri in cadrul tesului sanatos. Combinatia de parametri BMF prezentand diferente semnificative statistic in baza careia se va lua decizia este specifica fiecarui tip de tesut.

Pentru incadrarea unei biopsii in categoria glioblastomului (reprezentand gliomul de grad 4) trebuie sa fie satisfacute simultan, urmatoarele conditii:

Varianta	$> 0,099 \text{ rad}^2$
Energia	$> 5,27 \times 10^{15} \text{ nm}^2$
Entropia	$< 1,637$
Kurtosis	$< 3,922$

Aceste valori de referinta au fost obtinute prin studii experimentale pe loturi de gliom de diferite grade, pornind de la valorile parametrilor BMF pe probe de tesut de gliom de grad 2, si analizand tendintele de variatie a parametrilor in cazul unor gliome de superior. Au fost selectati parametrii BMF care prezentau semnificatie statistica.

#### Bibliografie

1. Elizabeth A. Montgomery MD LV. Biopsy Interpretation of the Gastrointestinal Tract Mucosa 2012.
2. Mihailescu M, Paun IA, Vasile E, Popescu RC, Baluta AV, Rotaru DG. DIGITAL OFF-AXIS HOLOGRAPHIC MICROSCOPY: FROM CELLS VIZUALIZATION, TO PHASE SHIFT VALUES, ENDING WITH PHYSIOLOGICAL PARAMETERS EVOLUTION. Rom J Phys. 2016;61(5-6):1009-27.
3. Xu L, Peng X, Guo Z, Miao J, Asundi A. Imaging analysis of digital holography. Optics express. 2005;13(7):2444-52.

4. Lee K, Kim K, Jung J, Heo J, Cho S, Lee S, et al. Quantitative phase imaging techniques for the study of cell pathophysiology: from principles to applications. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2013;13(4):4170-91.
5. Ikeda T, Popescu G, Dasari RR, Feld MS. Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems. *Opt Lett*. 2005;30(10):1165-7.
6. Popescu G, Ikeda T, Dasari RR, Feld MS. Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics. *Opt Lett*. 2006;31(6):775-7.
7. Lai G, Yatagai T. Generalized phase-shifting interferometry. *J Opt Soc Am A*. 1991;8(5):822-7.
8. Bista RK, Uttam S, Wang P, Staton K, Choi S, Bakkenist CJ, et al. Quantification of nanoscale nuclear refractive index changes during the cell cycle. *BIOMEDO*. 2011;16(7):070503--3.
9. Kim T, Zhou R, Mir M, Babacan SD, Carney PS, Goddard LL, et al. White-light diffraction tomography of unlabelled live cells. *Nat Photon*. 2014;8(3):256-63.
10. Popescu G, Deflores LP, Vaughan JC, Badizadegan K, Iwai H, Dasari RR, et al. Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics. *Opt Lett*. 2004;29(21):2503-5.
11. Liu PY, Chin LK, Ser W, Chen HF, Hsieh CM, Lee CH, et al. Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. *Lab Chip*. 2016;16(4):634-44.
12. 吴学成岑可法邱坤赞陈玲红高翔吴凯赵亮, inventor Portable digital holographic microscopy 2016.
13. 김명수, inventor method for obtaining index of refractions of biological cells or transparent liquid substances using digital holographic microscopy measurements 2015.
14. Kamen NYE-ZSGAL, inventor Analyzing digital holographic microscopy data for hematology applications 2015.
15. Pham GPB, inventor; University of Illinois, assignee. Diffraction Phase Microscopy with White Light 2013.
16. Wang GP, inventor; University of Illinois, assignee. Spatial light interference microscopy and fourier transform light scattering for cell and tissue characterization 2008.

17. Wang GPD, inventor; University of Illinois, assignee. Characteristic Parameters of Cells and Tissue from Quantitative Phase Imaging 2013.
18. Calin VL, Mihailescu M, Scarlat EI, Baluta AV, Calin D, Kovacs E, et al. Evaluation of the metastatic potential of malignant cells by image processing of digital holographic microscopy data. FEBS Open Bio. n/a-n/a.
19. Wang Z, Tangella K, Balla A, Popescu G. Tissue refractive index as marker of disease. BIOMEDO. 2011;16(11):116017-1160177.
20. Ioan-Iovit Popescu FSU. Bazele Fizice ale Opticii: Editura Universitaria Craiova; 1998.
21. Barer R. Interference Microscopy and Mass Determination. Nature. 1952;169(4296):366-7.
22. Barer R. Refractometry and Interferometry of Living Cells\*†. Journal of the Optical Society of America. 1957;47(6):545-56.
23. Girshovitz P, Shaked NT. Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization. Biomedical Optics Express. 2012;3(8):1757-73.
24. Kühn J, Montfort F, Colomb T, Rappaz B, Moratal C, Pavillon N, et al. Submicrometer tomography of cells by multiple-wavelength digital holographic microscopy in reflection. Opt Lett. 2009;34(5):653-5.

### Revendicari

1. Procedeu de diagnosticare a pieselor de biopsie de tesut caracterizat prin aceea ca:
  - a. foloseste lame histologice pe care sunt montate sectiuni de material bioptic necolorat
  - b. lamele pe care sunt montate sectiuni de material bioptic necolorat sunt introduse intr-un montaj de MHD
  - c. imaginile produse in MHD sunt folosite pentru calcularea unor parametri specifici de faza BMF bazati pe distributia valorilor de intarziere de faza in imaginea de faza reconstruita
  - d. piesele de biopsie de tesut sunt clasificate in functie de gradul de malignitate prin compararea valorilor parametrilor de faza BMF cu valori de referinta
2. Procedeu de diagnosticare, in acord cu revendicarea 1, a pieselor de biopsie de tesut de gliom
3. Procedeu de diagnosticare, in acord cu revendicarea 1, a pieselor de biopsie de tesut de mucoasa gastrica

Figurile



Fig. 1

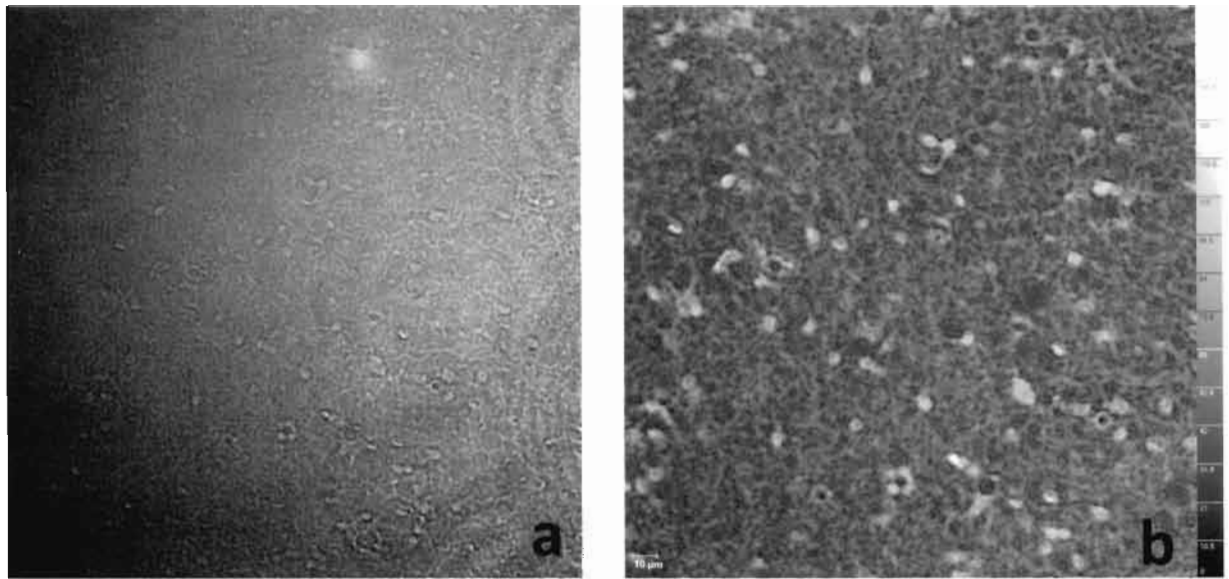


Fig. 2

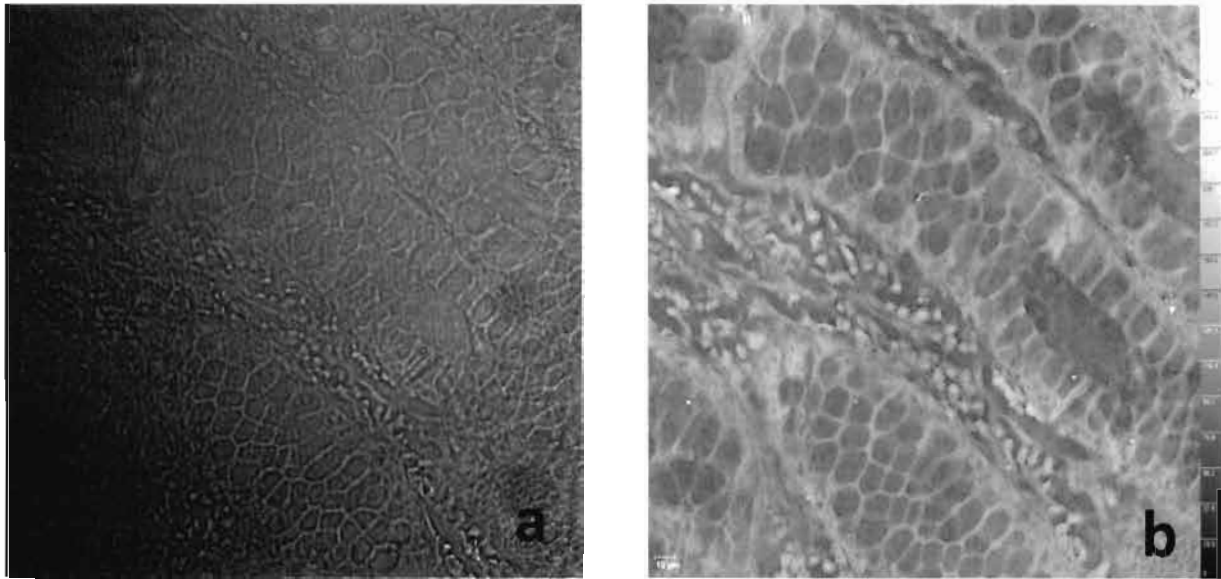


Fig. 3

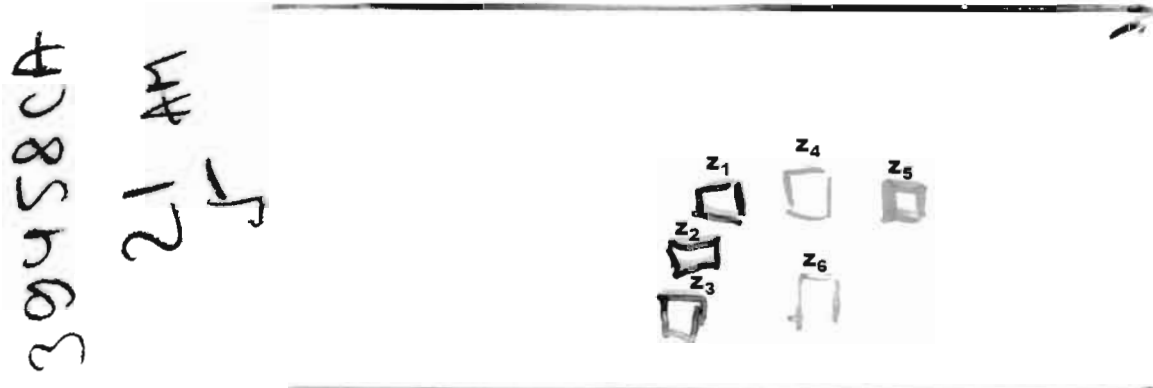


Fig. 4