



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/10/2022** BOPI nr. **10/2022**

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

(73) Titular:
• **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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 2013/011001; EP 3364341 A1

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



RO 134410 B1

1 Invenția se referă la o metodă de clasificare a probelor de biopsie de țesut cu scop
2 medical de diagnostic și de cercetare biomedicală. Metoda poate fi utilizată pentru diagnos-
3 ticul rapid și stadializarea biopsiilor de țesut de diverse origini (de exemplu țesut cerebral,
4 țesut digestiv, țesut mamar), fiind un instrument conceput să vină în ajutorul clinicienilor
5 (chirurghi, anatomopatologi), deoarece stadializarea rapidă a tumorilor este de importanță
6 maximă în alegerea terapiei adecvate și optimizarea ratei de supraviețuire a pacientului.

7 În prezent pentru analiza în scop diagnostic a țesutului bioptic sunt cunoscute mai
8 multe metode care folosesc lame histologice (1). Metodele constau în vizualizarea la micro-
9 scopul în câmp luminos a probelor de țesut, secționare, fixate și colorate cu colorații
10 specifice. În cazul metodelor histopatologice clasice, proba de țesut fiind incoloră, pentru a
11 putea fi analizată trece printr-o etapă de colorare. În baza afinității selective a coloranților
12 folosiți (coloranți bazici tip: hematoxilină, albastru de toluidină, albastru de metilen sau
13 coloranți acizi tip: eozină, oranj G, fucsina acidă), anatomopatologul identifică structurile
14 tisulare, celulele și organitele celulare și poate să diagnosticheze proba ca fiind normală sau
15 canceroasă. O metodă histopatologică avansată este imunohistochimia, o metodă de
16 diagnostic ce combină tehnicile histologice cu cele imunologice și biochimice cu scopul
17 identificării componentelor celulare și tisulare cât mai specific posibil printr-o reacție antigen-
18 anticorp. Tehnicile imunohistochimice au crescut siguranța diagnosticului final anatomopato-
19 logic, mai ales în cazul tumorilor cu grad scăzut de diferențiere, a tumorilor rare, a tumorilor
20 cu malignitate incertă sau a formațiunilor tumorale pentru care colorațiile uzuale nu aduc
21 informații despre originea proliferării celulare. Larga răspândire a utilizării imunohistochimiei
22 a impus nevoia de standardizare a metodei pentru o mai bună reproductibilitate. Metodele
23 histopatologice reprezintă în prezent standardul de aur pentru diagnosticul în oncologie.
24 Aceste metode constau într-o succesiune de etape care necesită multe consumabile cu cost
25 ridicat (mai ales în cazul imunohistochimiei) și de asemenea un timp lung de procesare. Este
26 necesar un volum mare de muncă din partea personalului medical, care trebuie să scaneze
27 vizual întreaga lamă, gradul de subiectivitate în evaluarea acesteia variind în funcție de
28 experiența sau specializarea medicului. Acuratețea diagnosticului poate fi influențată de
29 câțiva factori printre care: calitatea probei biologice, artefactele de preparare care apar în
30 procesul de fixare/colorare/marcare și experiența medicului anatomopatolog. Având în
31 vedere dezavantajele prezentate anterior, cercetarea biomedicală este în căutarea unor
32 metode complementare care să aducă un plus de acuratețe în condiții de timp redus de
33 prelucrare a probei tisulare.

34 Clasa generală a metodelor din care face parte invenția este cea bazată pe metode
35 interferometrice. Acestea folosesc fasciculele difractate de probele studiate: celule și țesuturi
36 montate pe lame fără a fi supuse colorațiilor uzuale și printr-o metodă sau alta le suprapun
37 cu fascicule de referință. Există mai multe categorii de metode interferometrice: microscopie
38 holografică digitală (MHD) în configurație *off-line* (2) și *in-line* (3); microscopie cantitativă de
39 fază (4), microscopie Hilbert de fază (5), microscopie de fază de difracție (6), interferometrie
40 cu întârziere de fază (7), microscopie de interferență prin iluminare cu fascicul structurat
41 SLIM (8), tomografie de difracție în lumină albă (WLDT) (9), microscopie Fourier de fază
42 (10), microscopie interferometrică în dispersie de fază (11).

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

RO 134410 B1

Sunt cunoscute câteva procedee bazate pe metode interferometrice care se adresează țesuturilor, dar care, în mod diferit față de invenția prezentată, se bazează pe difracție în lumina albă (WLDT) (15) sau pe configurația SLIM (16, 17). Față de aceste metode invenția prezentată 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 diferență de fază (WLDT).

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

Din probele recoltate din țesut se prepară lame histologice fixate, dar necolorate. Lamele necolorate sunt vizualizate în microscopie holografică digitală MHD și sunt înregistrate holograme. Din aceste holograme sunt reconstituite printr-un proces digital imagini cantitative de fază iMHD, din care sunt extrași parametrii holografici specifici, numiți biomarkeri de fază BMF. Imaginile reconstituite sunt clasificate ulterior pe baza BMF, în concordanță cu criteriile anatomopatologice. Metoda MHD este adecvată pentru probe transparente pentru că este o metodă care se bazează pe înregistrarea diferențelor de indice de refracție din diferitele zone ale lamei histologice care are o grosime constantă.

Problema tehnică se referă la clasificarea în scop diagnostic a probelor de biopsie de țesut printr-o metodă cu grad ridicat de obiectivitate folosind o probă biologică preparată printr-o metodă simplificată într-un timp redus, cu consum redus de chimicale.

Metoda de diagnosticare a pieselor de biopsie de țesut, conform invenției, constă în următoarea succesiune: etapa de preparare a lame cu secțiuni de material bioptic, etapa de analiză de imagini de fază iMHD ale acestora, etapa de calculare pentru fiecare imagine a unui set de parametri de fază BMF și etapa de decizie.

Conform invenției, în etapa de preparare lame cu secțiuni de material bioptic, probele, (de exemplu țesut tumoral cerebral, țesut tumoral de mucoasă colonică sau țesut tumoral mamar), sunt preparate fără substanțe de colorare, astfel devenind obiecte de fază, transparente, din fragmente de țesut deja existente incluse în blocuri de parafină, recoltate anterior de către chirurghi din motive medicale și constă în următoarele etape:

- probele sunt fragmente de țesut în parafină și sunt tăiate în secțiuni cu grosimi dorite și uniforme, maximum 10 μm ;
- secțiunile sunt lipite și uscate pe lame de microscop;
- parafina este eliminată prin dizolvare în xilen;
- secțiunea este spălată cu apă și deshidratată prin utilizarea unor concentrații crescătoare de etanol (70°, 80°, 90° alcool absolut);
- secțiunea este montată în mediu de montare bazat pe xilen și acoperită cu o lamelă de microscop;
- fiecare lamă este etichetată independent, pentru identificare ulterioară.

Conform invenției, în etapa de analiză imagini de fază iMHD, imaginile sunt înregistrate pe lamele cu secțiuni de material bioptic necolorat, cel puțin 50 de imagini pentru fiecare lamă, fără scanare și care în computer devin matrici cu valori de diferență de fază $\Delta\phi_k$ care reprezintă informații despre conținutul biologic al secțiunii analizate, imaginile sunt analizate din punct de vedere al continuității lor, în sensul că se detectează zone goale sau cu artefacte, realizând analiza statistică a valorilor prin parcurgerea următoarelor etape:

- matricele cu valori de diferență de fază $\Delta\phi_k$ devin serii de date prin realizarea a două coloane, una cu toate valorile ordonate crescător și alta cu frecvențele lor de apariție;
- se grupează pe intervale de grupare conform criteriului Sturges;
- se calculează media ponderată, mediana, intervalul median;
- se calculează modul și intervalul modal;

RO 134410 B1

- 1 - se departajează quartilele;
- se identifică valorile outliers;
- 3 - se revine la matricea de valori de fază asociată imaginii și se identifică zone formate din cel puțin 3 x 3 pixeli pe care sunt valori outliers;
- 5 - se îndepărtează din matrice aceste și acestea nu vor fi luate în considerare la calculul pentru valorile parametrilor de fază BMF.
- 7 Conform invenției, etapa de calculare a unui set de parametri de fază BMF, reprezintă calcularea unui set complet și suficient, asociat fiecărei imagini și care se calculează automat pe toate imaginile prin următoarele etape:
- 9 - se calculează valoarea medie a valorilor de diferență de fază pe o imagine;
- 11 - se calculează varianta pe aceeași imagine, folosind valoarea medie anterioară;
- se calculează momentele de ordin trei și patru, skewness și kurtosis pe aceeași imagine;
- 13 - se calculează energia și entropia pe aceeași imagine;
- 15 - se repetă calculul pe imaginea următoare și apoi pe toate imaginile;
- fiecărei imagini i se atribuie un set de valori ale parametrilor de fază BMF, formând o pereche, set parametri - imagine de fază; fiecare imagine fiind etichetată la rândul ei după lăma pe care a fost înregistrată, plus o extensie.
- 17 Conform invenției, etapa de decizie are rolul funcțional de a stoca imaginile de fază și cu setul de parametri de fază BMF asociați, a clasifica imaginile, a afișa rezultatul, clasificarea realizându-se printr-o metodă de învățare automată bazată pe o unitate software și realizată prin următoarele etape:
- 19 - se generează câte o listă cu valori pentru fiecare parametru de fază calculat;
- se creează și se stochează într-o formă digitală un număr de peste $N = 2000$ perechi (set parametri de fază BMF cu imaginea de fază iMHD asociată);
- 25 - se aleg aleatoriu 70% dintre perechi formându-se prima variantă a lotului de antrenare, restul perechilor formând lotul de testare;
- 27 - fiecare pereche din lotul de antrenare este clasificată ca aparținând uneia dintre clasele: țesut sănătos, țesut tumoral de grad 1,... țesut tumoral de grad n, denumite în continuare "clase de interes", prin cunoașterea etichetării fragmentului de țesut bioptic de pe lăma din care provine imaginea;
- 29 - unitatea software reține valorile setului de parametri clasificați conform punctului pentru toate perechile din lotul de antrenare;
- 33 - unitatea software împarte lista cu valori corespunzătoare fiecărui parametru de fază în două intervale corespunzătoare claselor de interes; în acest mod, fiecare pereche din lotul de antrenare va aparține uneia dintre clase;
- 37 - unitatea software creează și stochează intervalele pentru fiecare parametru de fază așa cum reiese din prima variantă a lotului de antrenare;
- 39 - îndeplinirea simultană a tuturor condițiilor din intervalele listei pentru o clasă de interes constituie condiție de clasificare pentru o altă pereche imagine -set parametri din lotul de testare;
- 41 - pentru perechile din lotul de testare, unitatea software verifică dacă sunt îndeplinite simultan condițiile de apartenență a fiecărei valori de parametru de fază în intervalele corespunzătoare claselor de interes;
- 43 - dacă pentru o pereche (set parametri - imagine de fază) din lotul de testare, sunt îndeplinite simultan condițiile de apartenență de la punctul anterior, atunci ea este clasificată într- una din clasele de interes;
- 45
- 47

RO 134410 B1

- dacă pentru o pereche: set parametri - imagine de fază, din lotul de testare nu sunt îndeplinite simultan condițiile de apartenență atunci pentru aceasta se reiau etapele;	1
- o pereche pentru care a fost nevoie de reluarea etapelor intră în lotul de antrenare, creându-se varianta a doua a lotului de antrenare;	3
- intervalele pentru listele de parametri de fază BMF se pot modifica pe măsură ce în lotul de antrenare intră mai multe perechi pentru care a fost nevoie de reluarea etapelor;	5
- imaginilor noi provenite de la probe noi li se calculează BMF creându-se perechea nouă BMF-iMHD. după care se procedează ca lotul de testare și se aplică pașii de mai sus;	7
- o imagine nouă provenită de la o proba nouă, poate fi clasificată direct în una din clasele de interes dacă îndeplinește simultan condițiile de apartenență;	9
- dacă pentru o imagine nouă nu sunt îndeplinite simultan condițiile de intervale de la punctul anterior, atunci ea intră în lotul de antrenare pentru care se reiau etapele.	11
Invenția prezintă următoarele avantaje:	13
- 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 încorporare în parafină este opțională);	15
- costurile reduse ale metodei (prin eliminarea consumabilelor necesare colorării lamelor);	17
- acuratețea crescută prin eliminarea artefactelor;	19
- obiectivizarea deciziei prin oferirea unor parametri cantitativi obiectivi care caracterizează porțiunile de țesut;	21
- metoda poate fi automatizată în vederea realizării unui diagnostic asistat de computer.	23
Se dă în continuare un exemplu de realizare a metodei pentru țesut cerebral și colonic obținut prin rezecție chirurgicală sau biopsie, în legătură cu fig. 1...5 care reprezintă:	25
- fig. 1, prezintă o lama histologică preparată conform standardelor în vigoare, prin colorarea probei de țesut (a) și o lamă histologică necolorată, preparată conform metodei propuse spre brevetare (b);	27
- fig. 2, prezintă holograma (a) și reconstrucția iMHD (b) pentru biopsie de țesut de gliom;	29
- fig. 3, prezintă holograma (a) și reconstrucția iMHD (b) pentru biopsie de țesut de mucoasa colonică;	31
- fig. 4, prezintă schematic invenția - clasificarea probelor de țesut tumoral pe baza parametrilor de fază extrași din imagini holografice;	33
- fig. 5, prezintă schematic arborele decizional exemplificat pentru probe de țesut cerebral.	35
În MHD agentul de contrast este reprezentat de diferența de fază proporțională cu indicele de refracție al probei, de aceea metoda poate fi folosită cu succes pentru vizualizarea specimenelor transparente, fără să fie nevoie de colorare sau marcarea specifică. Imaginile obținute prin acest tip de microscopie se numesc imagini de microscopie holografică digitală (iMHD) și reprezintă hărți de densitate ale țesutului sau celulelor vizualizate. S-a demonstrat că apariția anormalităților în celule și țesuturi influențează distribuția densității de proteine, acest fapt stând la baza unor biomarkeri de malignitate pentru celule (18) și țesuturi (19). Pentru a înțelege principiul de funcționare al MHD să ne reamintim principiul general de înregistrare a unei imagini de microscopie optică în câmp luminos: se captează lumina după ce a străbătut proba, imaginea vizualizându-se în ocularul microscopului sau înregistrându-se pe senzorul unei camere digitale. Informația conținută în frontul complex de	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 134410 B1

1 undă luminoasă este reprezentată de amplitudine, fază și stare de polarizare (20). Ceea ce
se înregistrează în microscopia optică este modificarea parametrului amplitudine, motiv
3 pentru care obiectele transparente (cum ar fi celulele sau țesuturile) se vizualizează cu un
contrast foarte slab. De aceea se procedează la colorarea probelor sau marcarea
5 fluorescentă. Vizualizarea obiectelor transparente este posibilă în condiții îmbunătățite dacă
se înregistrează în plus și modificări ale celui de-al doilea parametru al frontului de undă
7 luminos care străbate proba, și anume faza.

Legătura dintre parametrul fază și indicele de refracție este redată de ecuația 1:

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} DO = \frac{2\pi}{\lambda} (n - n_{\text{mediu}})h \quad (\text{ecuația 1})$$

9
11 La trecerea printr-o probă semitransparentă lumina, având lungimea de undă λ ,
13 suferă un proces de întârziere de fază (măsurat prin $\Delta\varphi$). $\Delta\varphi$ este proporțional cu drumul
optic străbătut de lumina (DO), deci cu înălțimea probei (h) multiplicată cu diferența dintre
15 indicele de refracție al probei (n) și cel al mediului (n_{mediu}) (20). Informația cantitativă despre
întârziere de fază ($\Delta\varphi$) este conținută în imaginea de interferență (holograma) care rezultă
17 prin compunerea unui fascicul obiect (care străbate proba) cu un fascicul referință (care nu
trece prin probă). Obținerea hologramelor este posibilă în montaje interferometrice de diferite
19 tipuri, unul dintre acestea fiind montajul de microscopie holografică digitală *off-axis* folosit în
prezenta metodă. Un exemplu de hologramă este prezentat în fig 2a. Holograma este apoi
21 procesată numeric în vederea obținerii parametrului $\Delta\varphi$ pentru fiecare pixel al imaginii
(procedura numită reconstrucție digitală (2)) rezultând iMHD, așa cum este prezentată în
23 fig. 2b.

Relevanța calculării parametrilor de fază constă în faptul că, așa cum a fost
25 demonstrat în diferite studii (8, 21, 22) există o legătură directă între întârzierea de fază și
densitatea de proteine a probei. Conform acestor studii, valoarea indicelui de refracție celular
27 crește liniar cu conținutul de proteine (proteinele au un indice de refracție situat în intervalul
1,50-1,58), conform ecuației 2:

$$n = n_o + \alpha C \quad (\text{ecuația 2})$$

29 unde n este indicele de refracție al celulei, n_o este indicele de refracție al apei, C este
31 concentrația (în g/mL) de proteine din soluție și α (mL/g) este așa numitul *increment de*
refracție, care arată cu cât crește indicele de refracție pentru fiecare procent de concentrație
33 de proteine. Pentru marea parte a moleculelor de interes biologic - proteine, acizi nucleici
etc, α a fost determinat de J. Barer prin metode interferometrice clasice că având valori între
35 0,18-0,21 mL/g. Progresia către malignitate a celulelor determină modificări în conținutul și
distribuția proteinelor, de aceea porțiunile de țesut malignizat din biopsii pot fi detectate prin
37 parametri specifici calculați din valorile de fază în imaginile de tip iMHD înregistrate pe proba
tisulară necolorată (23, 24).

39 iMHD conține dimensiunile țesutului transparent în plan transversal și o valoare de
întârziere de fază în fiecare pixel, dependentă de înălțimea și de indicele de refracție al
41 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
43 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.

45 Un exemplu de realizare a metodei pentru țesut cerebral provenit din probe tumorale
GM (gliom de grad scăzut) și GMB (gliom de grad înalt sau glioblastom) este redat mai jos
47 și constă în următoarele etape de lucru:

RO 134410 B1

1. *Etapa de preparare a probelor necolorate de biopsie de țesut* constă în a) tăierea probelor (fragmente de țesut inclus în parafină) în secțiuni cu grosimi definite, maximum 10 μm; b) lipirea și uscarea secțiunilor pe lama microscopică; c) eliminarea parafinei prin dizolvare în xilen, d) spălarea secțiunii cu apă și deshidratarea acesteia prin utilizarea unor concentrații crescătoare de etanol (70°, 80°, 90° alcool absolut); e) montarea în mediu de montare bazat pe xilen și acoperirea cu o lamelă de microscop; f) etichetarea lamei cu un număr de ordine; ca urmare a parcurgerii acestor etape se va obține o lamă necolorată, așa cum e prezentată în (fig. 1b).

2. *Etapa de înregistrare și reconstrucție a imaginilor de microscopie holografică digitală iMHD obținute pe secțiunile histologice necolorate*

Se înregistrează holograme ale secțiunilor histologice (fig. 2a) folosind un dispozitiv interferometric în configurație Mach-Zender, off-axis. În acest scop lama histologică (preparată ca mai sus) se poziționează manual pe masa interferometrului în dreptul fasciculului obiect. Holograma se captează și se vizualizează prin intermediul unui soft dedicat pe display. După focalizarea manuală a imaginii, holograma este înregistrată. Simultan se realizează reconstrucția numerică cu obținerea unei iMHD (fig. 2b) printr-o procedură derivată din teoria scalară a difracției. În situația utilizării unui obiectiv de microscop cu magnificație 20x și apertură numerică 0,85, fiecare imagine corespunde unei zone de țesut de 235 x 235 micrometri. Dimensiunea în pixeli a imaginii digitale depinde de caracteristicile sensorului utilizat. Pentru o lamă se achiziționează cel puțin 50 de imagini etichetate cu numărul de ordine al lamei plus o extensie.

3. *Etapa de analiză a imaginii de fază iMHD pentru a identifica zonele de pe lama care conțin artefacte de preparare sau care nu conțin țesut*

Pentru acest scop am aplicat o metodă de analiză statistică în care matricile cu valori de diferență de fază $\Delta\varphi_k$ devin serii de date realizându-se două coloane, una cu toate valorile ordonate crescător și alta cu frecvențele lor de apariție. În continuare am derulat următorii pași: a) realizarea intervalelor de grupare conform criteriului Sturges; b) calculul mediei ponderate, medianei, intervalului median, modului și intervalului modal; c) departajarea cuartilelor; d) identificarea valorilor outliers; e) revenirea la matricea de valori de fază asociată imaginii și identificarea zonelor formate din cel puțin 3 x 3 pixeli pe care sunt valori outliers; f) îndepărtarea din matrice a acestor zone pentru a nu fi luate în considerare la calculul pentru valorile parametrilor de fază BMF.

4. *Etapa de calculare a parametrilor BMF din imaginile reconstituite iMHD*
Fiecare pixel k din imaginea iMHD conține o valoare a diferenței de fază $\Delta\varphi_k$, conform ecuației (1), astfel încât pentru toată imaginea vom avea o matrice de valori de diferențe de fază cu p elemente, unde este numărul total de pixeli ai imaginii. $P(\varphi_k)$ este probabilitatea de apariție a unei valori de fază în pixelul k. Utilizând un program de tip Matlab sau Python se calculează parametrii derivați din valorile diferențelor de fază, precum cei prezentați în ecuațiile următoare:

$$Media(\mu) = \frac{1}{P} \sum_{k=1}^p \Delta\varphi_k \quad (\text{ecuația 3})$$

$$Varianta = \frac{1}{P} \sum_{k=1}^p (\Delta\varphi_k - \mu)^2 \quad (\text{ecuația 4})$$

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

$$Skewness = \frac{\frac{1}{p} \sum_{k=1}^k (\Delta\varphi_k - \mu)^3}{\left[\sqrt{\frac{1}{p} \sum_{k=1}^k (\Delta\varphi_k - \mu)^2} \right]^3} \quad (\text{ecuația 6})$$

$$Energia = \frac{\lambda}{2\pi} \sum_{k=1}^p \Delta\varphi_k^2 \quad (\text{ecuația 7})$$

$$Entropia = - \sum_{i=1}^p P(\Delta\varphi_k) \log_2 P(\Delta\varphi_k) \quad (\text{ecuația 8})$$

Ca urmare a parcurgerii acestei etape se va obține un set de BMF care este atribuit fiecărei imagini iMHD.

5. Etapa de decizie bazată pe valorile parametrilor BMF pentru clasificarea biopsiei de țesut tumoral de gliom

Pentru luarea deciziei am utilizat o metodă de învățare automată bazată pe o unitate software și care cuprinde următorii pași: a) generarea unui număr de 6 liste, fiecare corespunzând unui parametru de fază BMF (ecuațiile 3-8) calculat pentru fiecare imagine; b) crearea și stocarea în formă digitală a unui număr de peste $N = 2000$ perechi (set parametri de fază BMF cu imaginea asociată iMHD); c) alegerea în mod aleatoriu a 70% dintre perechi formându-se prima variantă a lotului de antrenare, restul perechilor formând lotul de testare; d) fiecare pereche din lotul de antrenare este identificată ca aparținând uneia dintre cele două clase: GM și GMB prin cunoașterea etichetării și a diagnosticului anatomopatologic al fragmentului de țesut bioptic folosit pentru prepararea lamei din care provine imaginea; e) unitatea software reține valorile setului de parametri clasificați conform punctului d) pentru toate perechile din lotul de antrenare; f) unitatea software împarte fiecare listă cu valori în două intervale corespunzătoare celor două clase GM și GMB, în acest mod fiecare pereche din lotul de antrenare fiind alocată uneia dintre clasele GM și GMB; g) unitatea software creează și stochează intervalele pentru fiecare parametru de fază așa cum reiese din prima variantă a lotului de antrenare; h) îndeplinirea simultană a tuturor condițiilor din intervalele listei pentru o clasă GM sau GMB, constituie element de clasificare pentru o altă pereche imagine - set parametri din lotul de testare; i) pentru perechile din lotul de testare, unitatea software verifică dacă sunt îndeplinite simultan condițiile de apartenență a fiecărei valori de parametru de fază BMF în intervalele corespunzătoare uneia dintre cele două clase GM și GMB; j) dacă pentru o pereche (set parametri - imagine de fază), sunt îndeplinite simultan condițiile de la punctul i), atunci ea este clasificată în una din clasele GM sau GMB; k) dacă pentru o pereche: set parametri - imagine de fază, nu sunt îndeplinite simultan condițiile de la punctul i), atunci pentru aceasta pereche se reiau etapele începând de la punctul d); l) o

RO 134410 B1

pereche pentru care a fost nevoie de reluarea punctului d) intră în lotul de antrenare, creându-se varianta a doua a lotului de antrenare; m) intervalele pentru fiecare parametru se pot modifica pe măsură ce în lotul de antrenare intră mai multe perechi pentru care a fost nevoie de reluarea punctului d); n) imagini iMDH provenite de la lame noi intră direct în lotul de testare și se aplică pașii de mai sus; o) o imagine provenită de la o lamă nouă, poate fi clasificată direct în una din clasele GM sau GMB dacă îndeplinește simultan condițiile de intervale de la punctul i); p) dacă pentru o imagine nouă nu sunt îndeplinite simultan condițiile de intervale de la punctul i), atunci ea intră în lotul de antrenare pentru care se reiau etapele începând cu d), intervalele de clasificare fiind de fiecare dată modificate. Schema metodei de decizie este în fig. 5.

De exemplu, pentru situația particulară a unui țesut tumoral de gliom grad 2 GM și de gliom grad 4 GMB (conform clasificării OMS 2016), luarea deciziei de clasificare a probei în gradele 2 și 4 se bazează pe combinația parametrilor BMF din tabelul de mai jos.

Parametru	GM	GMB
Medie	0,94-1,28	1,17-2,90
Varianță	0,053-0,116	0,163-1,42
Kurtosis	3,33-7,88	2,26-7,06
Skewness	0,25-0,95	0,16-0,68
Energie (10^7)	5,36-7,98	6,34-16,4
Entropie	0,83-5,22	0,002-4,6

Aceste valori de referință au fost obținute prin studii experimentale pe loturi de gliom de diferite grade, pornind de la valorile parametrilor BMF pe probe de țesut de gliom de grad 2, și analizând tendințele de variație a parametrilor în cazul unor gliome de grad superior. Au fost selectați parametrii BMF care prezintă semnificație statistică.

Pentru încadrarea unei biopsii în categoria glioblastomului (reprezentând gliomul de grad 4) trebuie să fie satisfăcute simultan, următoarele condiții: toți parametrii de fază BMF să aibă valorile în intervalele corespunzătoare GMB.

Criteriile cantitative de luare a deciziei sunt dependente de tipul țesutului tumoral. Combinația de parametri BMF prezentând diferențe semnificative statistic în baza căreia se va lua decizia este specifică fiecărui tip de țesut.

Bibliografie

1. Elizabeth A., Montgomery MD LV., *Biopsy Interpretation of the Gastrointestinal Tract Mucosa*, 2012.
2. Mihăilescu M., Păun I.A., Vasile E., Popescu R.C., Baluta A.V., Rotam D.G. *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.

RO 134410 B1

- 1 5. Ikeda T., Popescu G., Dasari R.R., Feld M.S., *Hilbert phase microscopy for*
investigating fast dynamics in transparent systems. Opt Lett. 2005;30(10):1165-7.
- 3 6. Popescu G., Ikeda T., Dasari R.R., Feld M.S., *Diffraction phase microscopy for*
quantifying cell structure and dynamics. Opt Lett. 2006; 31(6): 775-7.
- 5 7. Lai G., Yatagai T., *Generalized phase-shifting interferometry*. J. Opt. Soc. Am A.
1991; 8(5): 822-7.
- 7 8. Bista R.K., Uttam S., Wang P., Staton K., Choi S., Bakkenist C.J., et al.
Quantification of nanoscale nuclear refractive index changes during the cell cycle.
9 BIOMEDO, 2011; 16(7): 070503-3.
- 11 9. Kim T., Zhou R., Mir M., Babacan S.D., Carney P.S., Goddard L.L., et al. *White-*
light diffraction tomography of unlabelled live cells. Nat Photon. 2014;8(3):256-63.
- 13 10. Popescu G., Deflores L.P., Vaughan J.C., Badizadegan K., Iwai H., Dasari R.R.,
et al. *Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics*. Opt
Lett. 2004;29(21):2503-5.
- 15 11. Liu P.Y., Chin L.K., Ser W., Chen H.F., Hsieh C.M., Lee C.H., et al.. *Cell refractive*
index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. Lab Chip.
17 2016;16(4):634-44.
- 19 12. 吴学成岑可法邱坤赞陈玲红高翔吴凯赵亮, inventor Portable digital holographic
microscopy2016.
- 21 13. 김명수 inventor method for obtaining index of refractions of biological cells or
transparent liquid substances using digital holographic microscopy measurements2015.
- 23 14. Kamen NYE-ZSGAL, inventor Analyzing digital holographic microscopy data for
hematology applications2015.
- 25 15. Pham GPB, inventor; University of Illinois, assignee. *Diffraction Phase Microscopy*
with White Light, 2013.
- 27 16. Wang GP, inventor; University of Illinois, assignee. *Spatial light interference*
microscopy and fourier transform light scattering for cell and tissue characterization, 2008.
- 29 17. Wang G.P.D., inventor; University of Illinois, assignee. *Characteristic Parameters*
of Cells and Tissue from Quantitative Phase Imaging, 2013.
- 31 18. Calin V. L., Mihailescu M., Scarlat E.I., Baluta A.V., 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.
- 33 19. Wang Z., Tangella K., Balla A., Popescu G., *Tissue refractive index as marker of*
disease. BIOMEDO. 2011;16(11):116017-1160177.
- 35 20. Ioan-Iovit Popescu FSU. *Bazele Fizice ale Opticii*: Editura Universitaria Craiova;
1998.
- 37 21. Barcr R., *Interference Microscopy arid Mass Determination*. Nature.
1952;169(4296):366-7.
- 39 22. Barer R., *Refractometry and Interferometry of Living Cells*f*. Journal of the Optical
Society of America. 1957;47(6):545-56.
- 41 23. Girshovitz P., Shaked N.T., *Generalized cell morphological parameters based on*
interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization.
43 Biomedical Optics Express. 2012;3(8): 1757-73.
- 45 24. Kuhn J., Montfort F., Colomb T., Rappaz B., Moratal C., Pavilion N., et al.,
Submicrometer tomography of cells by multiple-wavelength digital holographic microscopy
in reflection. Opt Lett. 2009; 34(5): 653-5.

RO 134410 B1

Revendicări

1. Metodă de diagnosticare a pieselor de biopsie de țesut, **caracterizată prin aceea că**, constă din însumarea aditivă a următoarei succesiuni de etape: prepararea lamelor cu secțiuni de material bioptic, analiza de imagini de fază iMHD ale acestora, calcularea pentru fiecare imagine a unui set de parametri de fază BMF și decizia. 3 5
2. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, în etapa de preparare a lamelor cu secțiuni de material bioptic, de exemplu, țesut tumoral cerebral, țesut tumoral de mucoasă colonică sau țesut tumoral mamar, probele sunt preparate fără substanțe de colorare, devenind astfel obiecte de fază, transparente, din fragmente de țesut deja existente incluse în blocuri de parafină, recoltate anterior de către chirurghi din motive medicale și care constă în următoarele etape: 7 9 11
- probele sunt fragmente de țesut în parafină și sunt tăiate în secțiuni cu grosimi dorite și uniforme, maximum 10 μm ; 13
 - secțiunile sunt lipite și uscate pe lame de microscop; 15
 - parafina este eliminată prin dizolvare în xilen; 17
 - secțiunea este spălată cu apă și deshidratată prin utilizarea unor concentrații crescătoare de etanol (70°, 80°, 90° alcool absolut); 19
 - secțiunea este montată în mediu de montare bazat pe xilen și acoperită cu o lamelă de microscop; 21
 - fiecare lamă este etichetată independent, pentru identificare ulterioară. 21
3. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, în etapa de analiză imagini de fază iMHD, imaginile sunt înregistrate pe lamele cu secțiuni de material bioptic necolorat, cel puțin 50 de imagini pentru fiecare lamă, fără scanare și care în computer devin matrici cu valori de diferență de fază $\Delta\phi_k$ care reprezintă informații despre conținutul biologic al secțiunii analizate, imaginile sunt analizate din punct de vedere al continuității lor, în sensul că se detectează zone goale sau cu artefacte, realizând analiza statistică a valorilor prin parcurgerea următoarelor etape: 23 25 27
- matricele cu valori de diferență de fază $\Delta\phi_k$ devin serii de date prin realizarea a două coloane, una cu toate valorile ordonate crescător și alta cu frecvențele lor de apariție; 29
 - se grupează pe intervale de grupare conform criteriului Sturges; 31
 - se calculează media ponderată, mediana, intervalul median; 33
 - se calculează modul și intervalul modal; 33
 - se departajează cuartilele; 35
 - se identifică valorile outliers; 35
 - se revine la matricea de valori de fază asociată imaginii și se identifică zone formate din cel puțin 3 x 3 pixeli pe care sunt valori outliers; 37
 - se îndepărtează din matrice aceste zone pentru ca acestea să nu fie luate în considerare la calculul pentru valorile parametrilor de fază BMF. 39
4. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, în etapa de calculare a unui set de parametri de fază BMF se obține un set complet și suficient, asociat fiecărei imagini și se calculează automat pe toate imaginile prin următoarele etape: 41
- se calculează valoarea medie a valorilor de diferență de fază pe o imagine; 43
 - se calculează varianța pe aceeași imagine, folosind valoarea medie anterioară; 45
 - se calculează momentele de ordin trei și patru, skewness și kurtosis pe aceeași imagine; 45
 - se calculează energia și entropia pe aceeași imagine; 47
 - se repetă calculul pe imaginea următoare și apoi pe toate imaginile; 47

RO 134410 B1

1 - fiecărei imagini i se atribuie un set de valori ale parametrilor de fază BMF, formând
o pereche (set parametri - imagine de fază); fiecare imagine fiind etichetată la rândul ei după
3 lama pe care a fost înregistrată, plus o extensie.

5 5. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, etapa de decizie are
rolul funcțional de a stoca imaginile de fază și cu setul de parametri de fază BMF asociați,
a clasifica imaginile, a afișa rezultatul, clasificarea se realizează printr-o metodă de învățare
7 automată bazată pe o unitate software și constă în:

9 - se generează câte o listă cu valori pentru fiecare parametru de fază calculat;

11 - se creează și se stochează într-o formă digitală un număr de peste $N = 2000$
perechi (set parametri de fază BMF cu imaginea de fază iMHD asociată);

13 - se aleg aleatoriu 70% dintre perechi formându-se prima variantă a lotului de
antrenare, restul perechilor formând lotul de testare;

15 - fiecare pereche din lotul de antrenare este clasificată ca aparținând uneia dintre
clasele: țesut sănătos, țesut tumoral de grad 1, ... țesut tumoral de grad n, denumite în
continuare "clase de interes", prin cunoașterea etichetării fragmentului de țesut bioptic de pe
17 lama din care provine imaginea;

19 - unitatea software reține valorile setului de parametri clasificați conform punctului
anterior pentru toate perechile din lotul de antrenare;

21 - unitatea software împarte lista cu valori corespunzătoare fiecărui parametru de fază
în două intervale corespunzătoare claselor de interes; în acest mod, fiecare pereche din lotul
de antrenare va aparține uneia dintre clase;

23 - unitatea software creează și stochează intervalele pentru fiecare parametru de fază
așa cum reiese din prima variantă a lotului de antrenare;

25 - îndeplinirea simultană a tuturor condițiilor din intervalele listei pentru o clasă de
interes constituie condiție de clasificare pentru o altă pereche imagine-set parametri din lotul
de testare;

27 - pentru perechile din lotul de testare, unitatea software verifică dacă sunt îndeplinite
simultan condițiile de apartenență a fiecărei valori de parametru de fază în intervalele
29 corespunzătoare claselor de interes;

31 - dacă pentru o pereche (set parametri - imagine de fază) din lotul de testare, sunt
îndeplinite simultan condițiile de apartenență), atunci ea este clasificată într-una din clasele
de interes;

33 - dacă pentru o pereche: set parametri - imagine de fază, din lotul de testare nu sunt
îndeplinite simultan condițiile de apartenență), atunci pentru aceasta se reiau etapele
35 începând cu clasificarea perechii în clase de interes);

37 - o pereche pentru care a fost nevoie de reluarea etapelor începând cu clasificarea
perechii în clase de interes) intră în lotul de antrenare, creându-se varianta a doua a lotului
de antrenare;

39 - intervalele pentru listele de parametri de fază BMF se pot modifica pe măsură ce
în lotul de antrenare intră mai multe perechi pentru care a fost nevoie de reluarea etapelor;

41 - imaginilor noi provenite de la probe noi li se calculează BMF creându-se perechea
nouă BMF-iMHD, după care se procesează ca lotul de testare și se aplică pașii de mai sus;

43 - o imagine nouă provenită de la o probă nouă, poate fi clasificată direct în una din
clasele de interes dacă îndeplinește simultan condițiile de apartenență de la punctul anterior;

45 - dacă pentru o imagine nouă nu sunt îndeplinite simultan condițiile de apartenență
de la punctul anterior, atunci ea intră în lotul de antrenare pentru care se reiau etapele.

(51) Int.Cl.

G01N 15/14 (2006.01);
G01N 33/574 (2006.01);
G03H 1/00 (2006.01);
G06T 7/00 (2006.01)



Fig. 1

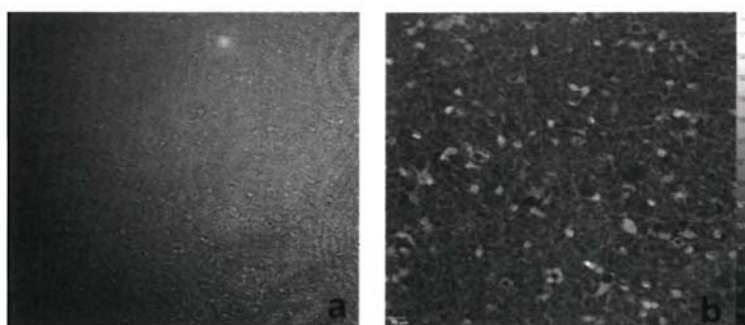


Fig. 2

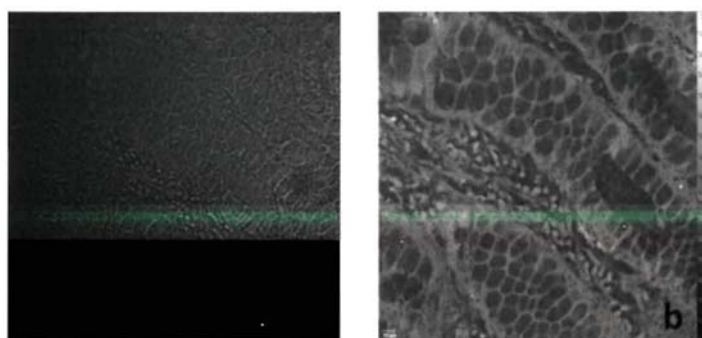


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 15/14 (2006.01);

G01N 33/574 (2006.01);

G03H 1/00 (2006.01);

G06T 7/00 (2006.01)

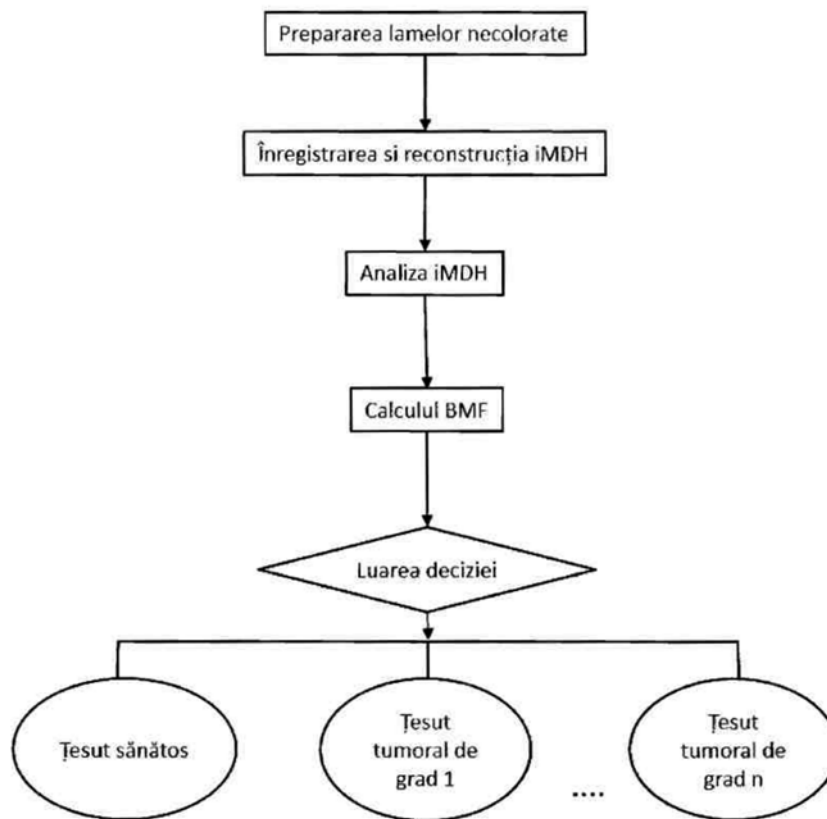


Fig. 4

(51) Int.Cl.

G01N 15/14 (2006.01);
G01N 33/574 (2006.01);
G03H 1/00 (2006.01);
G06T 7/00 (2006.01)

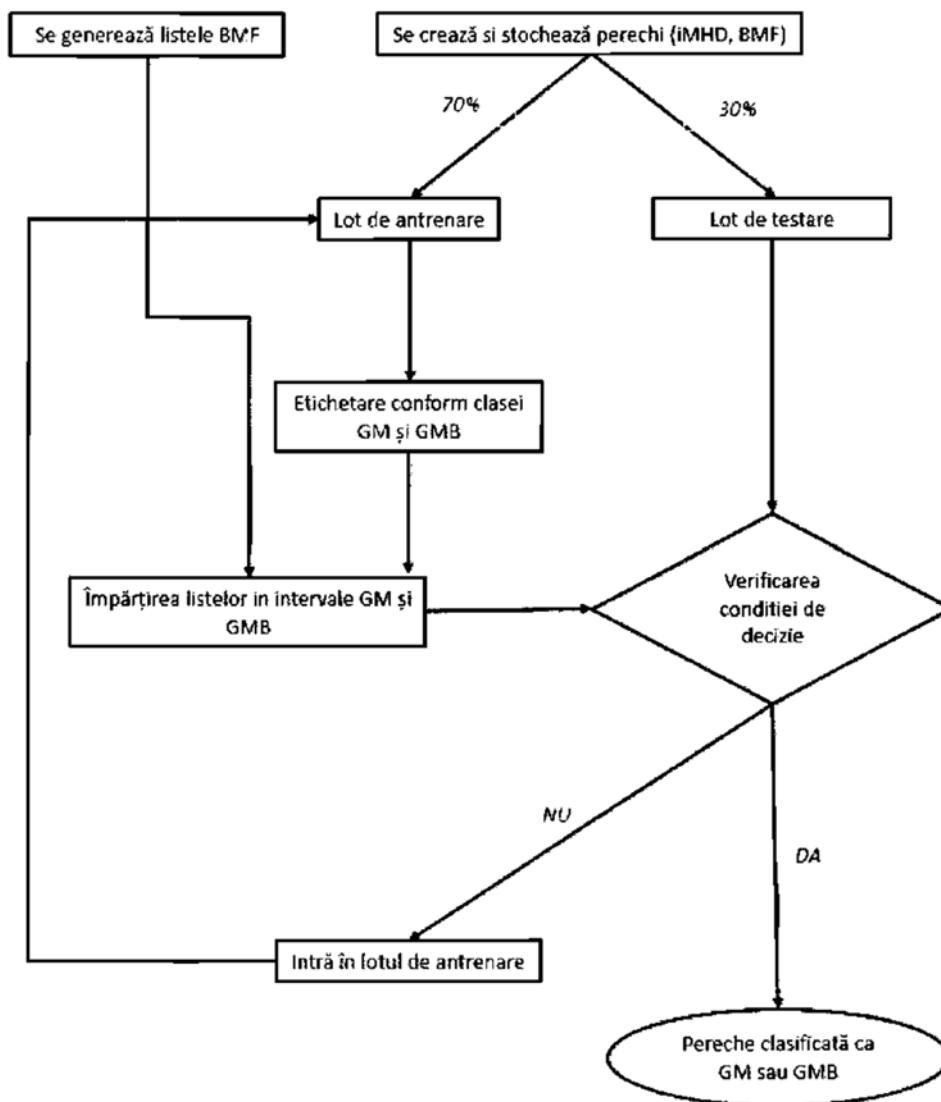


Fig. 5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 479/2022