

## RAPORTARE STIINTIFICA

### Rezumatul etapei

Etapa a doua a proiectului a avut ca obiective principale dezvoltarea si validarea sistemului experimental de imagistica cantitativa de faza dezvoltat in laborator, colectarea si analiza probelor de tesut furnizate de partenerul din proiect.

In cadrul etapei a fost dezvoltat sistemul experimental propus in proiect, care a fost ulterior validat prin efectuarea de experimente, masuratori si analiza comparativa a datelor obtinute prin metoda propusa si dezvoltata in laborator si metodele utilizate in mod curent de medicina anatomopatologi. Rezultatele obtinute reprezinta o prima validare a sistemului experimental, obtinandu-se rezultate reproductibile. In urma masuratorilor efectuate si a unei comunicari continue cu membrii P1 au fost propuse imbunatatiri ale sistemului ce au dus la o mai buna achizitie de date urmata de o analiza si procesare rapida a rezultatelor obtinute. Astfel au fost aduse imbunatatiri codului Matlab utilizat pentru procesarea imaginilor ceea ce a condus la o mai buna rezolutie a imaginilor obtinute, camera utilizata initial a fost inlocuita cu un model ce prezinta o sensibilitate mai ridicata ceea ce a asigurat un raport semnal/zgomot mai bun, iar caracteristicile sistemului 4f de lentile (f- distanta focala) au fost alese pentru a asigura o magnificare optima, date fiind dimensiunea pixelului camerei si rezolutia retelei de difractie. De asemenea a fost adaptat un software ce permite automatizarea achizitiei de date prin utilizarea de *General-Purpose computation on Graphics Processing Units (GPGPU)* de la NVIDIA si procesare CUDA (*Compute Unified Device Architecture*) furnizand in timp real imagini cantitative de faza, eliminand astfel necesitatea utilizarii codului Matlab dezvoltat initial in cadrul proiectului. Toate aceste imbunatatiri au contribuit la cresterea calitatii imaginilor obtinute cu ajutorul sistemului dezvoltat in laborator.

Masuratorile efectuate cu ajutorul acestui sistem pe diferite probe (celule, tesuturi) cu proprietati/caracteristici diferite au demonstrat capabilitatea acestuia de a produce rezultate/imagini ale unor probe subtiri transparente in lumina alba transmisa. Astfel au fost analizate probe celulare ce nu prezinta absorbtie in conditii normale de analiza microscopica, fiind astfel transparente. Aceste componente au putut fi vizualizate si inregistrate cu ajutorul sistemului imagistic cantitativ de faza dezvoltat in cadrul proiectului. Aceste tipuri de masuratori au reprezentat o prima validare a sistemului. Au fost analizate probe de tesut cu diferite grosimi si compozitie, putandu-se obtine informatii suplimentare cu privire la componentele probelor.

A fost dezvoltat un sistem de selectare a ROI (region of interest) in vederea colectarii unui volum mare de date cu anumite caracteristici (glande, stroma, lumen) ce va putea fi folosit ulterior pentru dezvoltarea unui algoritm de „invatare” automata. Software-ul ce va utiliza acest algoritm si baza de date aferenta va putea asista medicul anatomopatolog in evaluarea probelor de tesut si furnizarea unui diagnostic corect in special in cazurile in care metodele standard nu pot oferi informatii suficiente pentru o diagnoza exacta.

Pe baza rezultatelor obtinute, putem afirma ca sistemul de imagistica cantitativa de faza dezvoltat in cadrul proiectului poate fi utilizat cu succes in evaluarea probelor de tesut in paralel cu metodele standard utilizate in prezent, putand oferi informatii suplimentare cu privire la componentele tesuturilor analizate. Sistemul propus/dezvoltat scoate in evidenta elemente ce nu pot fi observate cu metodele clasice si poate releva structura unor conglomerate ce nu pot fi separate prin metodele clasice standard. Astfel, obiectivele propuse in cadrul proiectului pentru aceasta etapa au fost indeplinite si au fost obtinute rezultatele estimate.

## Raport stiintific si tehnic in extenso

Etapa a doua a proiectului „Sistem de imagistica cantitativa de faza pentru diagnosticarea tesuturilor” (Acronim: PrEDICT) denumita *Dezvoltarea si validarea sistemului experimental de imagistica cantitativa de faza, colectarea si analizarea TMA* are ca obiectiv principal dezvoltarea unui sistem de imagistica cantitativa de faza ce poate fi folosit pentru a obtine imagini cu un contrast imbunatatit ale unor probe transparente.

Activitatile desfasurate in aceasta etapa sunt distribuite intre Partenerii (CO, P1) din proiect si includ:

CO: - dezvoltarea si asamblarea sistemului experimental. Selectarea probelor de interes (tesut sanatos/ pseudotumoral /tumoral) pentru a fi analizate; - efectuarea de masuratori experimentale folosind sistemul QPI (quantitative phase imaging – imagistica cantitativa de faza) dezvoltat in laborator. Inregistrarea de imagini TMA (tissue micro-array) si selectarea zonelor de interes. Compararea rezultatelor obtinute cu imaginile H&E;

-recomandari cu privire la un sistem de automatizare pentru inregistrarea unor volume mari de date in vederea dezvoltarii unui algoritm de procesare de imagini care vor putea furniza informatii utile din punct de vedere clinic privind diagnosticarea tesuturilor masurate;

P1: - colectarea si prepararea probelor de tesut; - livrarea probelor catre CO in vederea masuratorilor QPI; - masurarea in paralel a probelor de tesut prin metode standard anatomopatologice si cu sistemul experimental dezvoltat de CO; - concluzii privind utilizarea metodelor si dispozitivului QPI dezvoltat.

### **1. Dezvoltarea si asamblarea sistemului experimental. Selectarea probelor de interes (tesut sanatos/ pseudotumoral /tumoral) pentru a fi analizate**

Proiectarea si achizitia componentelor necesare modelului experimental propus in cadrul proiectului au fost desfasurate in cadrul primei etape a proiectului si sunt descrise in raportul de faza aferent acesteia. In urma implementarii primei versiuni a sistemului experimental, au fost propuse imbunatatiri ale acestuia (cresterea luminozitatii imaginii interferometrice vizualizate in planul imagine al camerei CMOS prin cresterea sensibilitatii camerei CMOS combinat cu cresterea intensitatii luminii transmise prin filtrul spatial; deplasarea micrometrica a retelei / camerei CMOS pentru pozitionarea precisa in planul imagine al microscopului, respective lentilei 2) ce au avut ca rezultat o mai buna achizitie de date urmata de o analiza si procesare mai rapida a imaginilor obtinute. Aceste imbunatatiri au inclus dezvoltarea si revizuirea unui cod Matlab dedicat procesarii imaginilor obtinute, selectarea caracteristicilor optime ale componentelor sistemului interferometric in functie de rezolutia retelei de difractie si dimensiunea pixelului camerei utilizate.

Montajul experimental dezvoltat in cadrul proiectului este prezentat in Figura 1. Sistemul este compus din microscopul inversat disponibil comercial (Zeiss AxioObserver 7) ce are adaugat la unul dintre porturile de iesire un sistem interferometric bazat pe interferometrul Mach-Zehnder „off-axis common-path”. Astfel, in planul imagine al portului de iesire al microscopului am plasat o retea de difractie (ce poate fi de asemenea inlocuita cu un SLM– modulator spatial de lumina) [1] cu un numar bine definit de trasaturi pe mm. In urma trecerii luminii prin retea, sufera difractii,

obtinandu-se mai multe ordine de difractie (copii ale imaginii incidente obtinute la unghiuri diferite datorita periodicitatii retelei) - (Figura 1c). Oridinele de difractie obtinute sunt focalizate cu o lentila (L1) in planul Fourier al acesteia unde este plasat un filtru spatial ce permite trecerea ordinelor 0 si 1 ( Purtator de semnal – amplitudine si faza) de difractie in acelasi timp efectuand si o filtrare in frecventa (low pass filtering) a ordinului 0. Filtrarea spatiala este obtinuta cu ajutorul unui filtru spatial (Figura 1b) sau a unui modulator spatial de lumina (SLM) conectat la un proiector (Figura 1d), controlat de calculator, pe care este proiectata o masca binara (transmisie maxima – alb si minima - negru) cum este prezentata in Figura 1b. Lentila L2 suprapune cele doua ordine in planul ei focal unde este plasata o camera ce inregistreaza imaginea de interferenta obtinuta prin suprapunerea celor doua ordine. In Figurile 1e) si f) sunt prezentate imagini a doua variante de montaj in care s-au utilizat ca filtru spatial o masca, respectiv un SLM. In acest caz, SLM-ul consta dintr-o celula de cristale lichide conectata la proiector care este plasata intre doi polarizori liniari avand directiile de polarizare orientate orthogonal, unul fata de altul, astfel incat sa reduca la minim transmisia luminii cand celula este inchisa. Prin proiectarea mastii binare, SLM-ul schimba polarizarea lumnii in zonele marcate cu alb ale mastii (Figura 1b), respectiv permite transmisia luminii, actionand ca un filtru pentru aceasta. In acest mod de operare a SLM-lui, controlabil de calculator, se poate ajusta atat dimensiunea fantelor de trecere (pinhole) ale ordinelor 0 si 1 de difractie, cat si distanta dintre ele. Acestea ajustari au fost necesare in etapa de aliniere si optimizare ale montajului, cand orice repositionarea a unui element optic conduce la redimensionarea mastii binare. Insa utilizarea polarizorilor are dezavantajul ca se reduce cu aproape 50% intensitatea luminii provenite de la microscop. Astfel, pentru o imagine cu un contrast suficient de bun al probei (specimenului) analizat a fost necesara achizitia unei camera CMOS cu o sensibilitate mult imbunatatita, respectiv camera Andor Zyla 4.2, cu o eficienta cuantica de 82%, mult mai mare decat cele existente in dotarea CO, de maxim 67%.

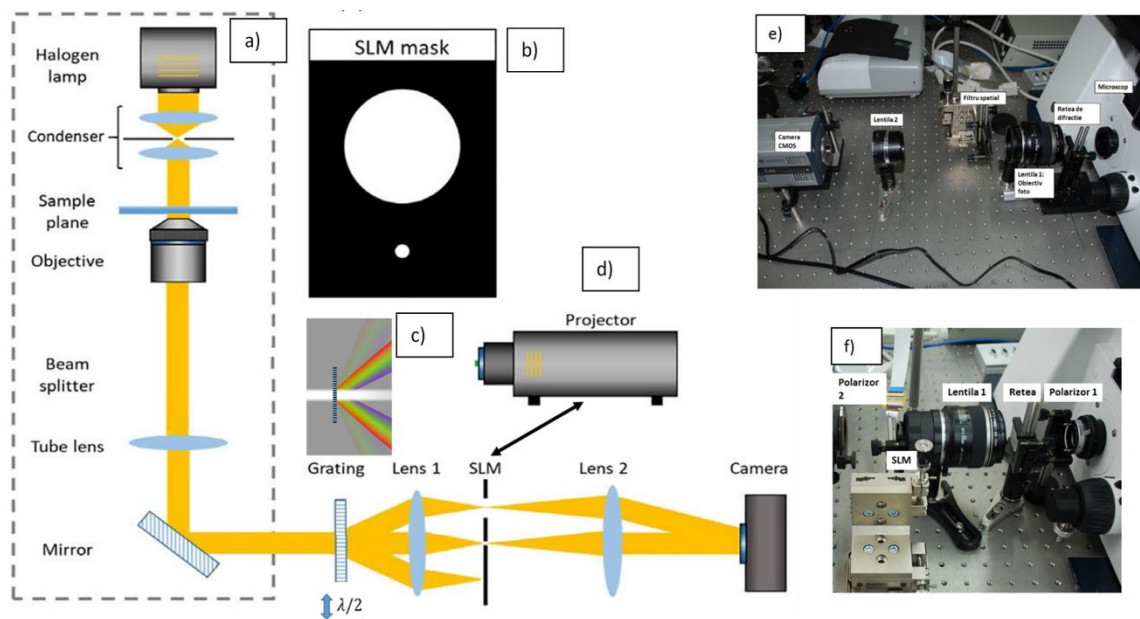


Figura 1. Prezentare schematica si imagini ale sistemului de imagistica cantitativa de faza dezvoltat in laborator (PED236).

De asemenea, odata stabilite dimensiunile filtrului spatial, prin calibrarea fantelor SLM-ului in functie de dimensiunile maximelor de interferenta in planul focal al Lentilei 1, se poate realiza masti de filtrare care sa inlocuiasca SLM, unde avantajul il reprezinta cresterea intensitatii imaginii analizate.

In vederea asigurarii caracteristicilor optime ale componentelor sistemului experimental au fost utilizate urmatoarele ecuatii adaptate dupa [2]:

Ecuatie	Descriere
$\Delta\rho = \frac{1,22\lambda}{NA_{obj}}$	Rezolutie (raza ordin de difractie)
$\Lambda \leq \frac{\lambda M_{obj}}{3NA_{obj}}$	Perioada maxima a retelei de difractie (ordine separate)
$ M_{4f}  \geq 2a \left[ \frac{1}{\Lambda} + \frac{1}{\lambda} \frac{NA_{obj}}{M_{obj}} \right]$	Magnificare maxima a sistemului 4f (sampling)
$M_{4f} = \frac{-f_2}{f_1}, M = M_{obj}M_{4f}$	Magnificare
$FOV = [m, n] \frac{a}{M_{obj} M_{4f} }$	Camp de vizualizare (field of view) in planul imagine
$\Delta x = \frac{f_1\lambda}{\Lambda}$	Spatiere in planul Fourier (design filtru spatial)
$NA_{L_1} \geq \frac{\lambda}{\Lambda} + \frac{NA_{obj}}{M_{obj}}$	Apertura numerica minima pentru lentila L1
$D \leq \frac{2,44\lambda f_2}{\gamma d}$	Diametru maxim pinhole
$NA_{L_2} \geq \frac{\lambda}{ M_{4f} \Lambda} + \frac{1,22\lambda}{D}$	Apertura numerica minima pentru L2
$\eta = \frac{1,22\lambda M_{obj} M_{4f} }{NA_{obj}d} = \frac{\Delta\rho}{FOV_{diagonal}}$	Raport de cuplare (raport DC la AC)

Asigurand o esantionare adecvata, harta cantitativa de faza se poate obtine cu ajutorul unei transformate Hilbert. Sistemul interferometric utilizat asigura un drum optic comun pentru fascicolul de referinta si semnal, fiind astfel foarte stabil, neinfluentat de vibratii si ofera randament ridicat datorita caracterului sau single-shot. Mai mult decat atat, folosind un LED ca sursa de lumina alba ce are coerenta temporala scazuta, acest sistem reduce la minimum zgomotul ce poate afecta sensibilitatea sistemului de imagistica de faza.

## Procesarea datelor

Inainte de examinarea unei noi probe este necesara inregistrarea unei imagini de calibrare dintr-o zona de fundal (background) din proba. Imaginea de calibrare este utilizata pentru a extrage informatia de fundal din proba si astfel sa generam o imagine cu un contrast ridicat. La fiecare inlocuire a tipului de proba, este necesara inregistrarea unei noi imagini de fundal.

Figura 2 prezinta procedura de reconstructie a fazei obtinuta cu sistemul wDPM (white light diffraction phase microscopy – microscopie in lumina alba cu faza difractata). Asupra interferogramei inregistrate de camera CCD (Figura 2a) se aplica o transformata Fourier ce genereaza spectrul de putere al imaginii, obtinandu-se ordinele de difractie (Figura 2b), se selecteaza unul dintre ordinele de difractie (cercul rosu in Figura 2b), se deplaseaza aceasta selectie catre centrul imaginii (cerc punctat din Figura 2b), si se aplica transformata Fourier inversa asupra semnalului pentru a-l aduce inapoi in domeniul spatial, obtinandu-se astfel o harta a diferentei de faza pe proba. Pentru procesarea imaginilor de interferenta inregistrate de camera CCD a fost dezvoltat un cod Matlab ce parcurge procedura prezentata in Figura 2.

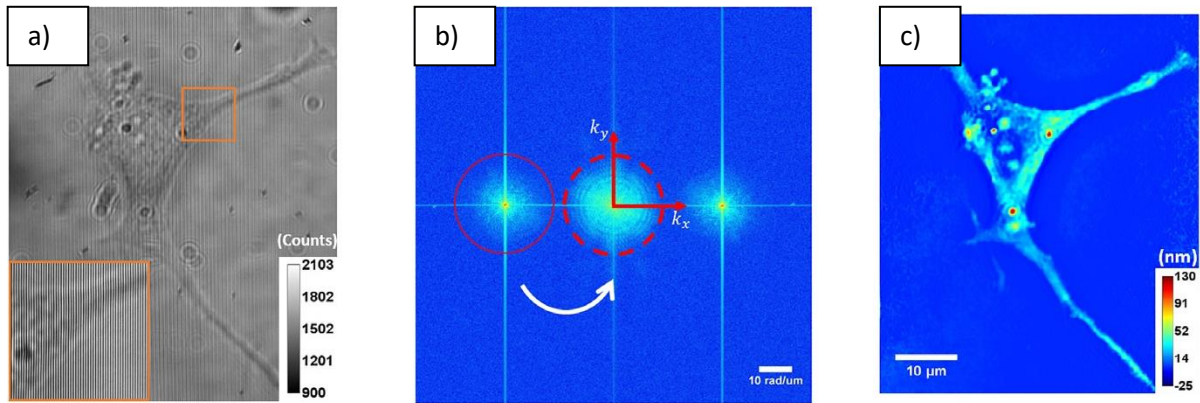


Figura 2. Procedura de reconstrucție a fazei. a) Imaginea brută obținută în urma interferenței dintre primul ordin de difracție și ordinul de difracție 0. Zona marită prezintă franjele de interferență. b) Transformata Fourier a imaginii brute; unul dintre lobi laterali este izolat și apoi mutat în centrul imaginii. c) O hartă OPL (optical pathlength) este reconstruită după aplicarea transformatei Fourier inverse și scăderea fundalului (unități în nanometri) [3].

Au fost implementate două variante ale sistemului experimental în cadrul proiectului PED236. Astfel, în cazul înlocuirii rețelei de difracție cu un SLM, se poate obține o îmbunătățire a rezoluției imaginii de fază obținute. Figura 3 prezintă o comparație între imaginile obținute cu wDPM și PSwDPM (phase shifting diffraction phase microscopy with white light) [1] ce demonstrează calitatea îmbunătățită a imaginilor obținute cu PSwDPM.

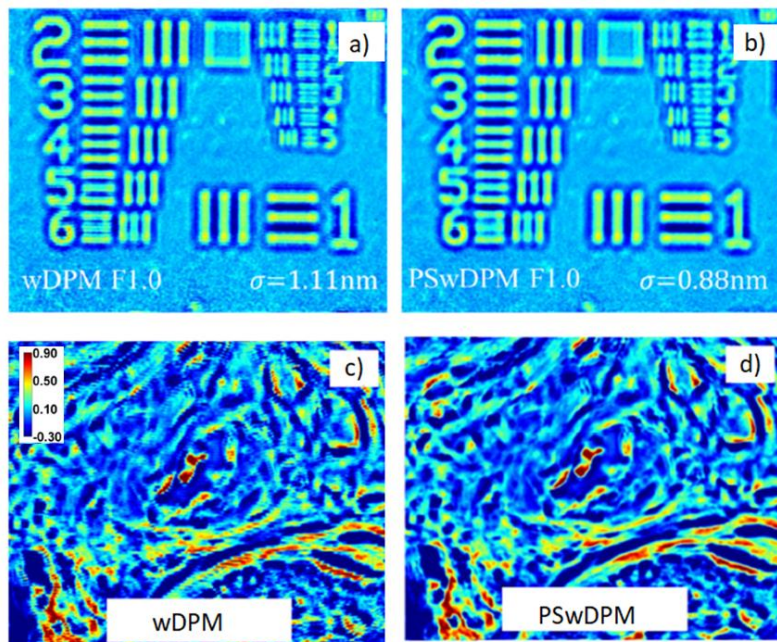


Figura 3. Comparatie între două metode de imagistica cantitativa de fază bazate pe interferometrul (off-axis common path) Mach-Zehnder. a), b) harti de înălțime ale unei ținte de rezoluție USAF, c), d) harti de fază ale unei probe de țesut obținute cu cele două metode [1].

PSwDPM combină schimbarea de fază (phase shift) și interferențria common path pentru a îmbunătăți hărțile de fază obținute cu wDPM. Acest rezultat este obținut cu prețul scăderii vitezei de achiziție de date deoarece este necesară înregistrarea a două interferograme cu fază diferită ( $\lambda/2$ ), această metodă fiind utilă în aplicații ce necesită rezoluție și câmp vizual cât mai ridicate.



În urma experimentelor desfășurate dedicate evaluării diferitor tipuri de probe biologice, au fost identificate ca fiind utile îmbunătățiri ale procedurii de achiziție și procesare de date, modificări aduse atât montajului experimental cât și programului de analiză de date. Aceste modificări au dus la scurtarea timpului necesar achiziției și au mărit rezoluția imaginilor obținute.

Figura 4 prezintă o comparație între o imagine de țesut (secțiunea transversală cu grosimea de 4 μm a unui vas de sânge dintr-un țesut ocular) procesată cu o variantă inițială a softului și rezultatul procesării după îmbunătățirea acestuia. Se poate observa o mai bună rezoluție și o detaliere a componentelor probei. În cazul imaginii procesate cu varianta inițială a software-ului, din cauza rezoluției scăzute, evaluarea hărții de fază obținute este foarte dificilă. În urma îmbunătățirilor aduse, s-a obținut o hartă de fază cu rezoluție mărită ce poate fi evaluată cu ușurință.

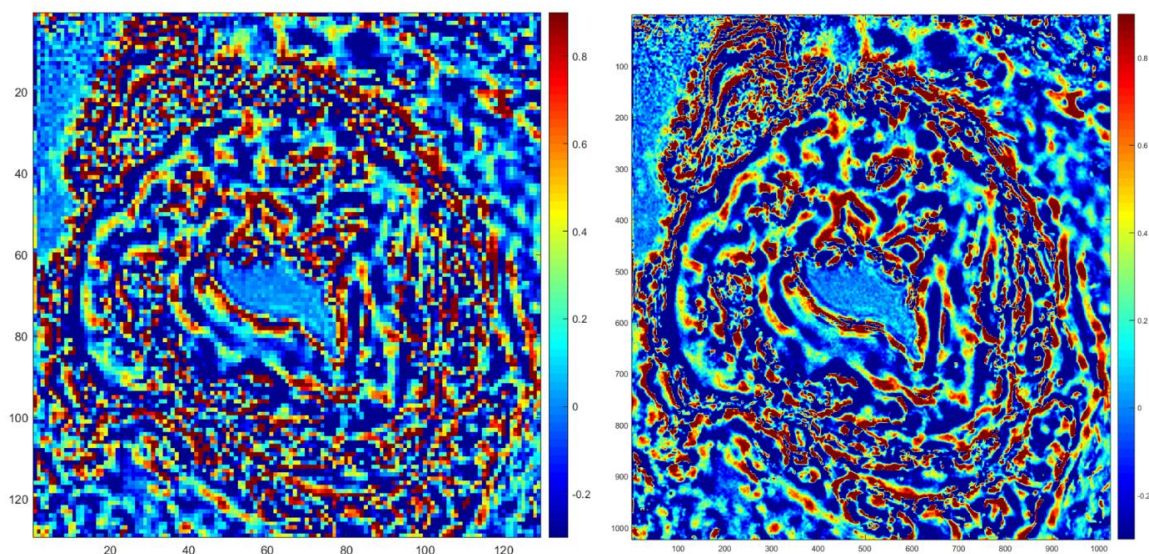


Figura 4. Prezentare comparativă a imaginilor obținute cu cele două variante de software utilizate pentru procesarea și analiza de imagini obținute cu sistemul de imagistică cantitativă de fază.

În vederea validării sistemului experimental dezvoltat în laborator au fost selectate o serie de tipuri de probe biologice ce vor fi analizate cu sistemul experimental „PED 236”. Astfel au fost selectate probe celulare fixate (OLN-93, HT-29, Hep-G2) și probe de țesut benign/tumoral furnizate de partenerul din proiect.

## **2. Efectuarea de măsurători experimentale folosind sistemul QPI dezvoltat în laborator. Înregistrarea de imagini TMA (tissue micro-array) și selectarea zonelor de interes. Compararea rezultatelor obținute cu imaginile H&E**

Sistemul experimental dezvoltat în cadrul proiectului are acop asistarea medicului anatomopatolog în diagnosticarea probelor de țesut cu o precizie ridicată și într-un interval de timp mai mic decât până acum. Astfel, în Figura 5 este prezentată secvența de activități ce este utilizată pentru analiza unor probe țesut: urmare a recomandării medicului specialist, are loc prelevarea unei biopsii din zona suspectată ca ar putea fi canceroasă. Această probă este fixată în parafină, este sectionată cu o grosime de câțiva micrometri, este colorată (e.g. Hematoxylin și eosin H&E) și apoi este evaluată la microscop de către medicul anatomopatolog.

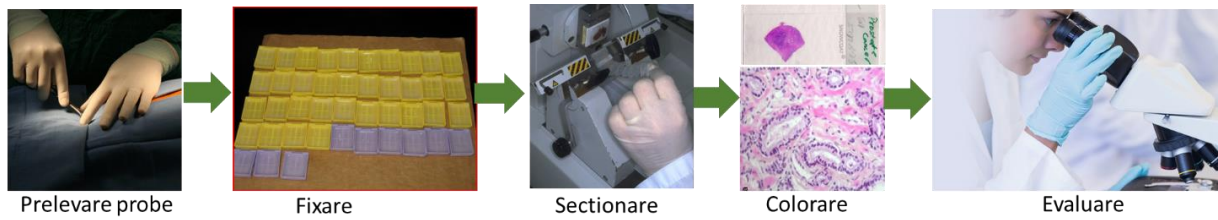


Figura 5. Procedura de pregatire si analiza a probelor de tesut.

Procedura standard de evaluare a unor tesuturi in vederea diagnosticarii cancerului consta in investigarea manuala a unor biopsii colorate in prealabil; astfel, o metoda ce ar putea oferi informatii cantitative cu privire la probele analizate este necesara deoarece ar putea ajuta la diagnosticarea cu o precizie mai mare a bolii. Imagistica cantitativa de faza poate oferi informatiile necesare unei asemenea analize si poate ajuta la scurtarea timpul necesar evaluarii deoarece nu mai este necesara colorarea probelor de tesut. Prin imagistica cantitativa de faza se obtin harti ale variatiei indicelui de refractie al probei (e.g. histopatologice) ce pot furniza informatii despre structura la scara moleculara a tesutului analizat relevand astfel zonele tumorale (e.g. evidentiind calcifieri in cadrul tesuturilor). Metode similare sunt studiate si in [4], [5] unde se constata o dependenta a variatiei indicelui de refractie cu tipul de tesut analizat (benign/malign), in timp ce in [6] se discuta despre utilizarea relatiei de dispersie statistica pentru obtinerea variatiei indicelui de refractie in probe biologice.

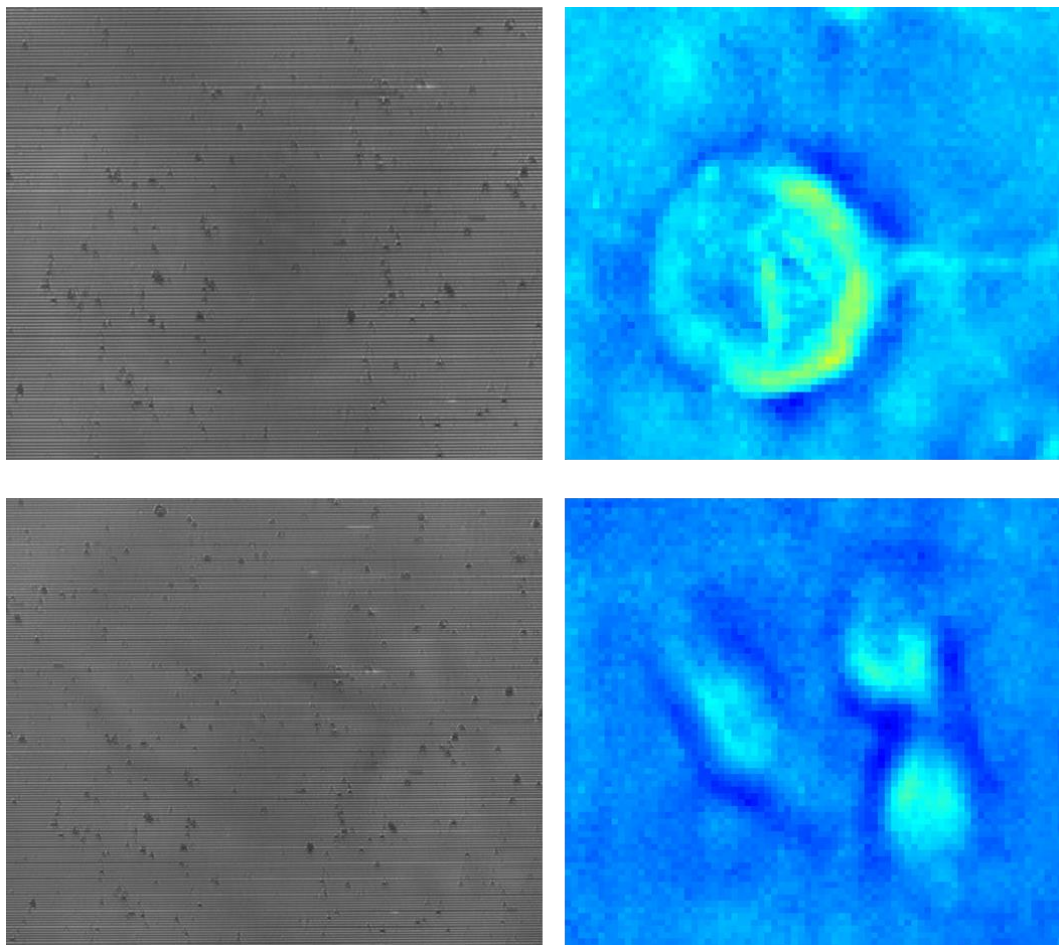


Figura 6. Presentare comparativa intre imaginile obtinute cu microscopia cu lumina alba in transmisie si imaginile obtinute cu sistemul experimental PED236.



Metoda cantitativa de faza dezvoltata in cadrul proiectului va permite eliminarea etapei de colorare a probei permitand o evaluare mult mai rapida a acesteia. De asemenea datorita contrastului imbunatatit si a performantei ridicate se pot evidientia detalii ce nu sunt vizibile in cazul vizualizarii in lumina transmisa.

Au fost analizate atat in lumina transmisa – brightfield (BF), in contrast de faza (PH) si cu ajutorul sistemului experimental PED236 (wDPM), diferite probe celulare. Figura 6 prezinta o comparatie intre BF si wDPM. Astfel, in cazul unor probe transparente din punct de vedere optic, microscopia in transmisie nu poate releva/scoate in evidenta structura si astfel nu pot fi vizualizate. Sistemul dezvoltat in cadrul proiectului PED, datorita caracteristicilor sale, permite vizualizarea acestor probe (phase objects) transparente.

Figura 7 prezinta rezultate obtinute pe celule de tip HT-29: celule de colon, ce sunt studiate datorita capacitatii lor de a diferentia si astfel pot sa simuleze tesutul de colon *in vitro*, o caracteristica care a făcut HT-29 util pentru cercetarea celulelor epiteliale. Aceste tipuri de celule au o predilectie de a forma conglomerate. Datorita acestui fapt, se pot vizualiza si in lumina transmisa, insa cu un contrast scazut.

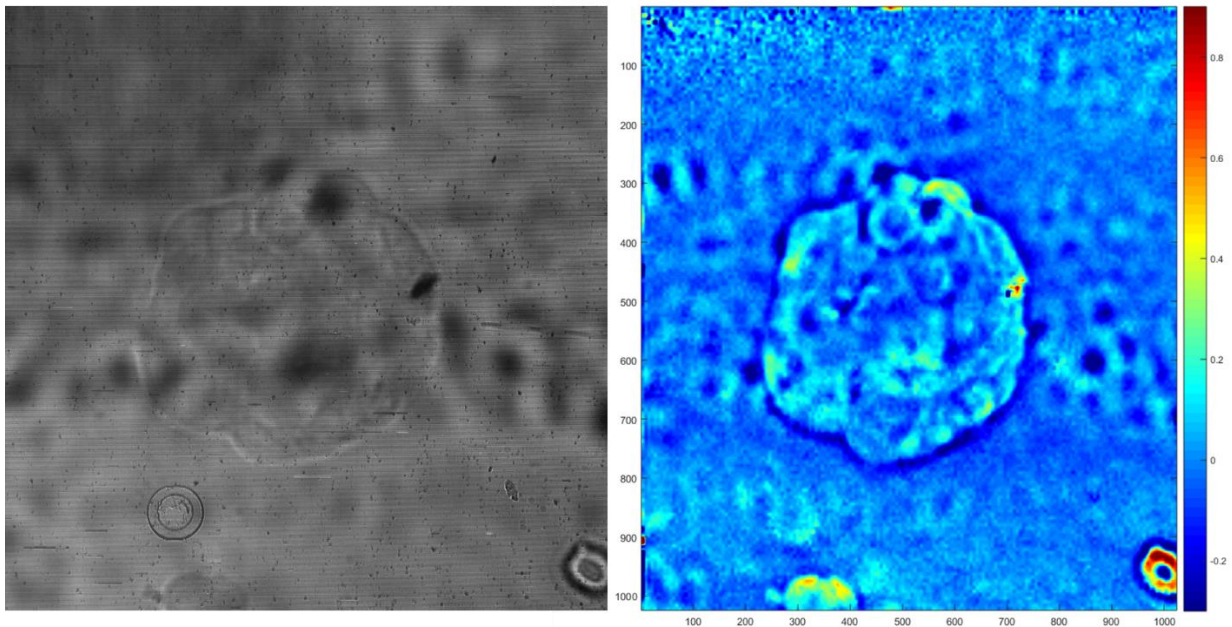


Figura 7. Celule de tip HT-29 vizualizate in BF si wDPM



Figura 8. Celule de tip OLN-93 vizualizate in BF, PH, si wDPM



Figura 8 prezinta imaginile obtinute pe o cultura celulara OLN-93 in BF, PH si wDPM. OLN-93 sunt oligodendrocite obtinute din celule primare. Au diferite morfologii care pot varia de la bilopare pana la forme multipolare, fie cu un corp celular mai mare si prelungiri mai mari sau mai mici. In timp ce imaginea in BF nu poate releva o structura bine definita, rezultatul in PH o poate scoate in evidenta insa este insotit de artefacte de imagine/vizualizare, un halo ce afecteaza imaginea. wDPM releva o structura bine definita fara artefacte de vizualizare si cu o harta de faza ce prezinta variatia de drum optic a luminii ce trece prin proba.

In cazul probelor mai groase, sau cu o densitate mai mare (Figura 9), se pot observa detalii ale formei celulelor si in BF. Cu toate acestea, imaginile PH sunt afectate de efectul de halo neputand fi diferite/evidentiate detalii cu privire la structura celulara. In cazul wDPM, harta de faza ne releva diferenta de densitate/drum optic prin proba specifica fiecarei celule si astfel se poate vizualiza cu o mai mare precizie componenta probei studiate. Odata cu cresterea grosimei probei (proba de tesut), efectul de halo generat de imagistica cu contrast de faza (PH) devine mai intensa afectand si mai mult vizualizarea detaliilor specifice probelor masurate.

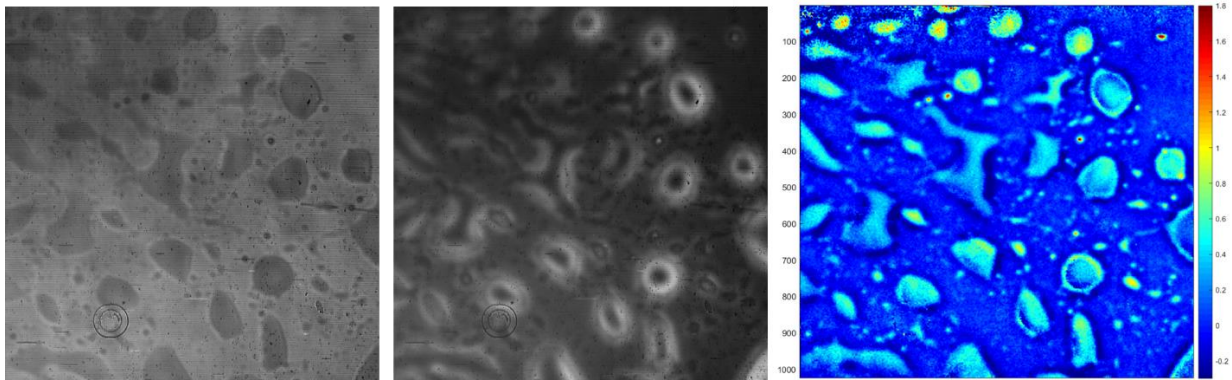


Figura 9. Celule de tip Hep-G2 (*human hepato cellular carcinoma*) vizualizate in BF, PH si wDPM

Pentru validarea dispozitivului experimental dezvoltat in laborator este necesar un volum foarte mare de date. Astfel au fost selectate spre analiza diferite tipuri de probe de tesut preparat prin diferite metode si avand caracteristici diferite. Au fost analizate probe de tip TMA ce cuprind un numar mare de probe de tesut. Figura 10 prezinta o astfel de proba acompaniata de comentariile medicului anatomopatolog.

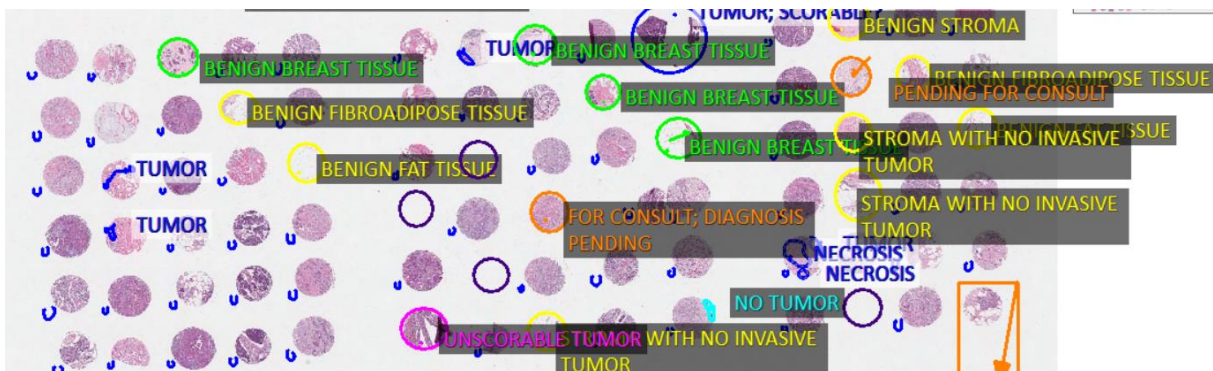


Figura 10. Selectie proba tip TMA insotita de comentariile medicului anatomopatolog.

Astfel au fost supuse spre analiza de imagistica cantitativa de faza (QPI), mai multe tipuri de probe de tesut atat preparate proaspat cat si din TMA. Rezultatele obtinute dovedesc eficacitatea metodei implementate in proiect de a inregistra imagini ale unor probe de tesut, in unele cazuri putand oferi detalii ce nu sunt vizibile prin metodele obisnuite.

Figura 11 prezinta imaginile obtinute prin BF si wDPM pentru o proba de tesut ocular. Se poate observa faptul ca wDPM evidentiaza structura tesutului si chiar anumite detalii ce nu sunt vizibile prin BF. De asemenea metoda utilizata pentru procesarea imaginilor elimina orice detaliu ce nu face parte din proba analizata (e.g. defecte ale elementelor optice).

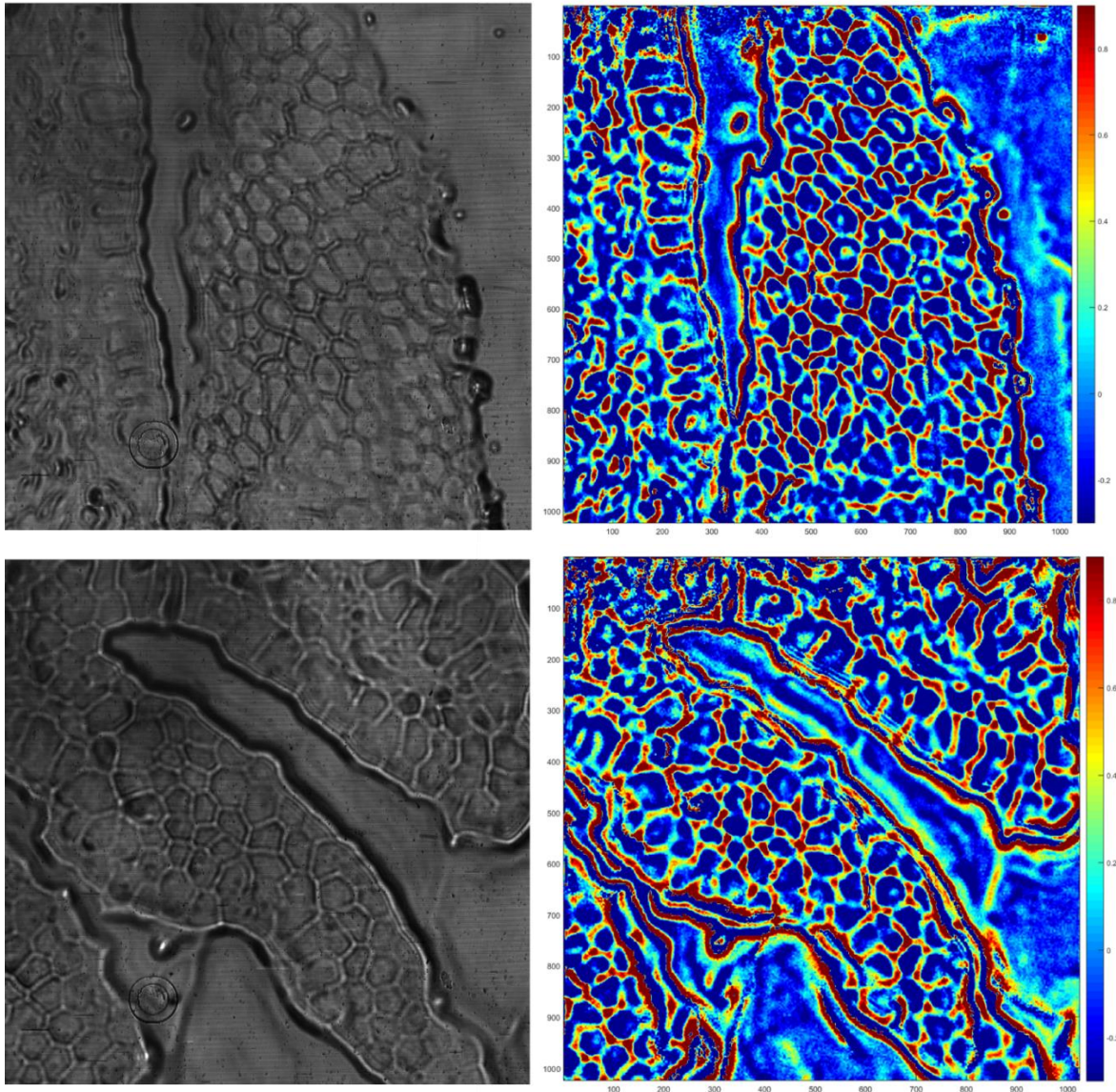


Figura 11. Probe de tesut inregistrate cu BF si wDPM.

Au fost preparate probe de tesut la diferite grosimi pentru a evalua efectul acestei caracteristici asupra calitatii imaginilor obtinute. Figura 12 si Figura 13 prezinta doua probe de tesut preparate de grosimi de 3  $\mu\text{m}$  si respectiv 4  $\mu\text{m}$ , grosimi utilizate standard in cadrul analizelor de anatomopatologie. Se poate observa faptul ca in ambele cazuri au fost obtinute imagini wDPM cu contrast ridicat ce au relevat elemente din proba ce altfel nu sunt vizibile in cazul analizei BF.



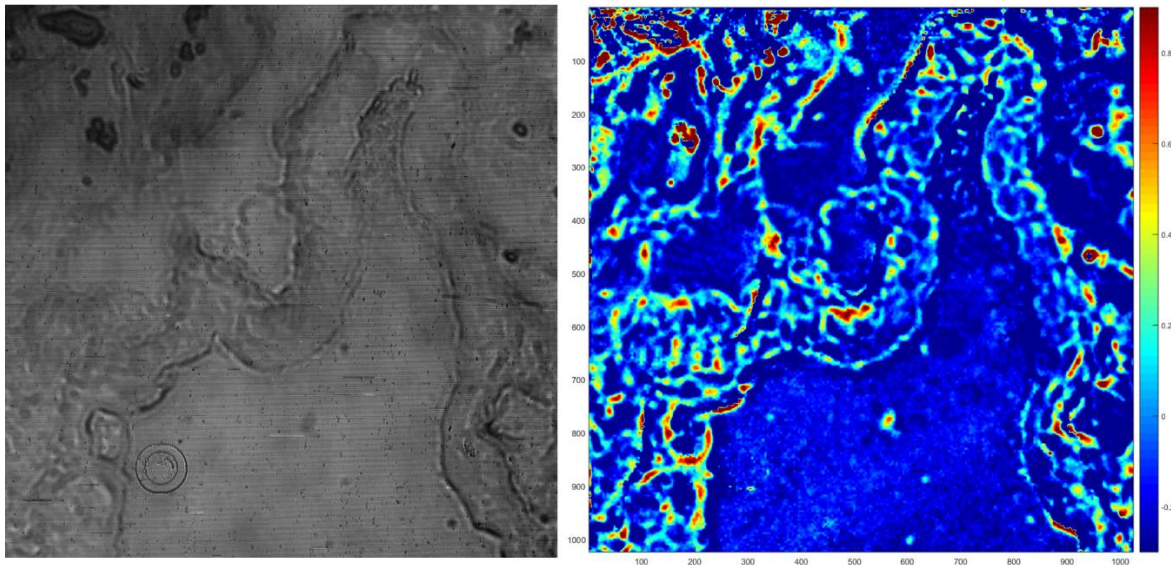
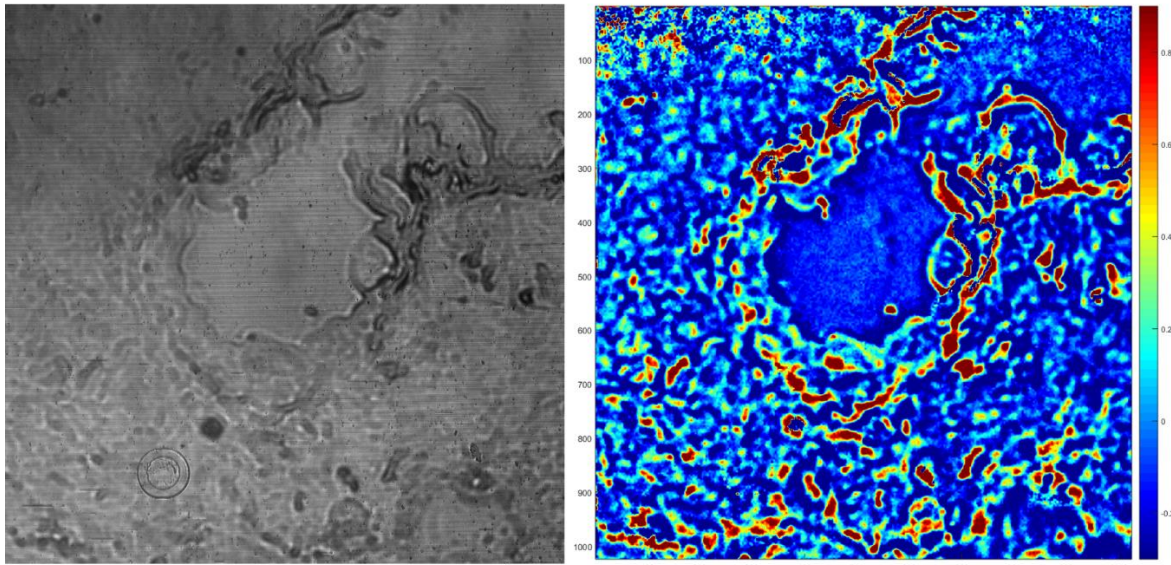


Figura 12. Proba de tesut ocular tumoral sectional la o grosime de 3  $\mu\text{m}$

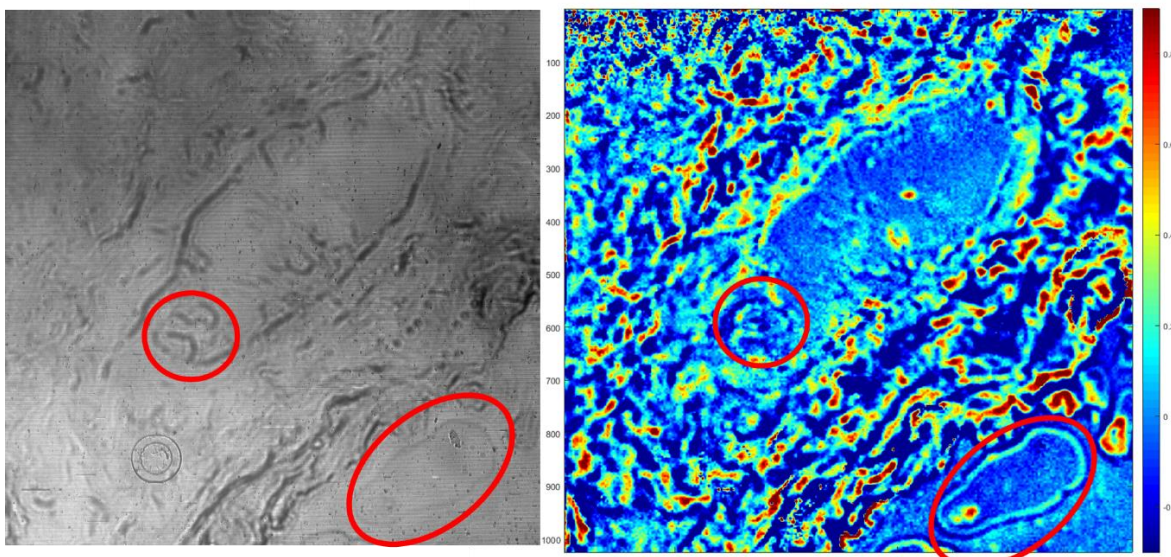


Figura 13. Proba de tesut ocular tumoral sectional la o grosime de 4  $\mu\text{m}$



De asemenea, in cazul zonelor cu o densitate mai mare, ce apar mai inchise la culoare in imaginile BF, metoda PED236 scoate in evidenta structura acestora oferind informatii suplimentare din punct de vedere anatomopatologic. Astfel in Figura 14 este prezentat un detaliu al unei zone inregistrate cu metoda de imagistica cantitativa de faza implementat in proiect. Se poate observa structura unei zone ce in cazul imaginii BF nu a putut fi evidentiata dar care poate fi observata in cazul wDPM.

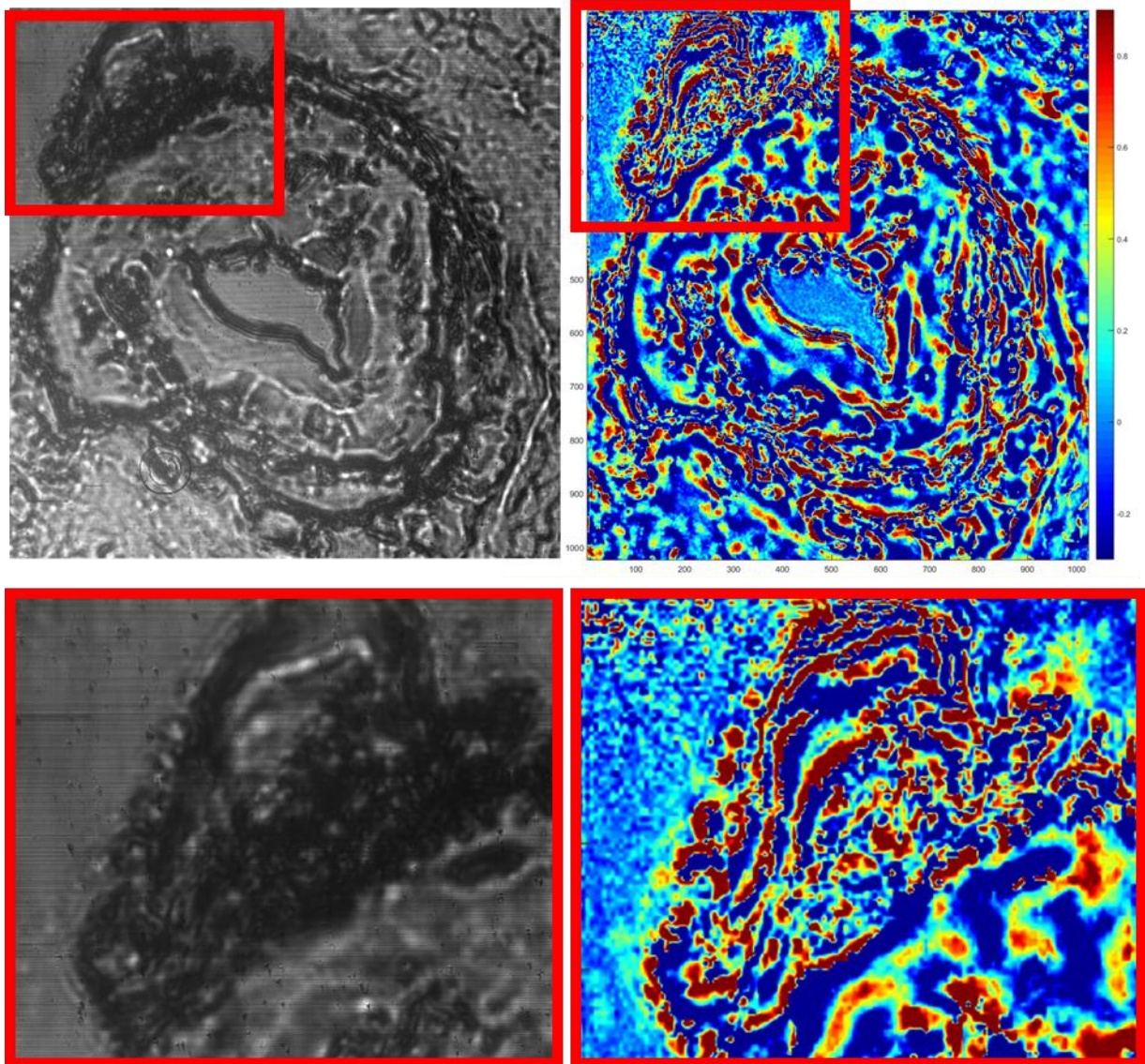


Figura 14. Detaliu proba de tesut ocular relevat prin metoda QPI dezvoltata in cadrul PED236

Cu ajutorul metodelor QPI se pot obtine detalii ale probelor de tesut ce nu sunt vizibile prin metodele standard de imagistica. In Figura 15 este prezentata o comparatie intre imaginile obtinute pe proba colorata H&E si cele obtinute pe aceasi proba cu metoda QPI. Aceasta imagine a fost obtinuta prin scanarea probei de interes si inregistrarea unui numar mare de imagini ce au fost ulterior lipite pentru a genera acest rezultat. Se poate observa ca in cazul imaginii obtinute prin QPI detaliile glandelor din proba sunt mult mai evidente si mai usor de vizualizat decat in cazul H&E (Figura 15 c, d).



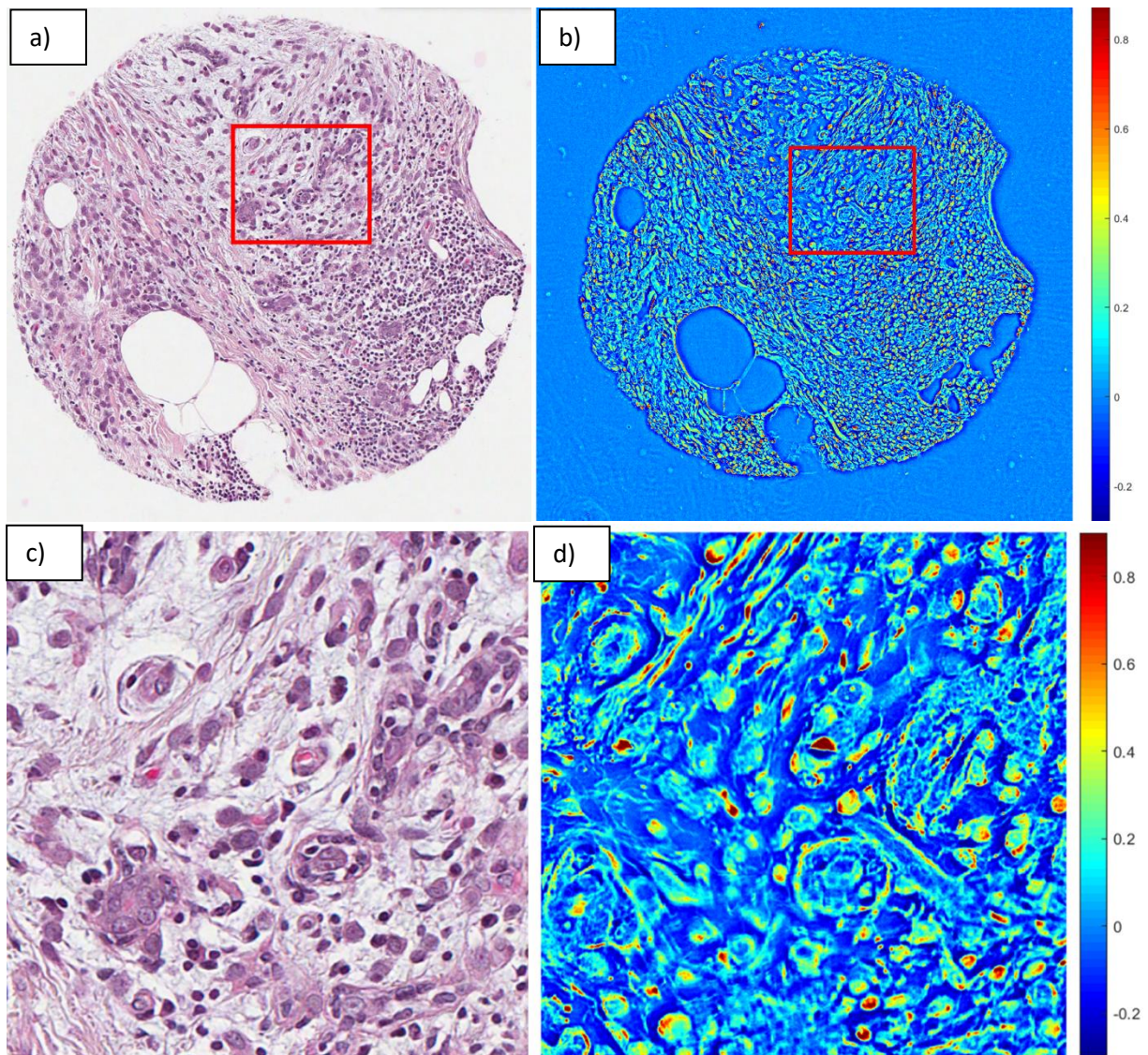


Figura 15. Comparatie imagini proba metoda H&E si metoda QPI

### 3. Recomandari cu privire la un sistem de automatizare pentru inregistrarea unor volume mari de date in vederea dezvoltarii unui algoritm de procesare de imagini care va putea furniza informatii utile privind diagnosticarea tesuturilor masurate;

Pentru a micsora si mai mult timpul necesar analizei de date si pentru a asigura o mai buna vizualizare a probei, a fost dezvoltat impreuna cu un grup de cercetare din SUA, un software ce asigura automatizarea procesarii datelor. Acest program foloseste capabilitatile de calcul paralelizat pe GPU oferit de procesarea CUDA si furnizeaza informatii cantitative de faza efectuand in mod automat toate activitatile ce erau desfasurate initial cu ajutorul codului Matlab dezvoltat. Figura 16 prezinta interfata acestui program, in timpul analizarii unor celule. Se observa faptul ca in BF celulele nu sunt vizibile, in timp ce in wDPM acestea pot fi vizualizate. De asemenea, software-ul ofera informatii cu privire la histograma imaginii, putand varia expunerea, sau intensitatea iluminarii. Pentru operarea acestui program, este necesara inregistrarea unei imagini de fundal, ce poate fi folosita pentru toate celelalte masuratori efectuate



pe acea proba. Harta de faza este generata automat si sunt efectuate calcule in timp real, putandu-se vizualiza direct imaginea, nemaifiind necesara o procesare de date ulterioara.

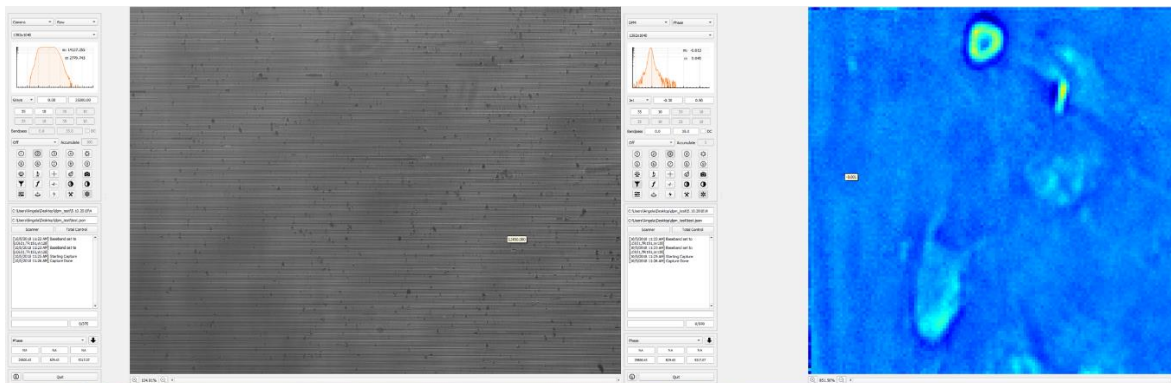


Figura 16. Interfata software-ului dedicat pentru automatizarea procesarii datelor

Scopul final este existenta unui software capabil sa efectueze analiza si diagnosticarea unor probe de tesut in mod independent de input-ul medicului specialist. Pentru aceasta este necesara achizitionarea unui volum mare de date ce vor fi ulterior introduse intr-o baza de date ce poate fi pusa la dispozitia unui algoritm de invatare automata ce va putea efectua segmentarea imaginilor, selectarea zonelor de interes (glande, stroma, lumen) si furnizarea unui diagnostic bazat pe caracteristicile zonelor de interes selectate. Pentru aceasta a fost pus la punct un model de colectare a datelor; cu software-ul Fiji/ImageJ [7] a fost initiata selectarea ROI (region of interest), date ce vor fi salvate si organizate intr-o baza de date. Figura 17 prezinta modul de selectare a acestor zone pentru o proba de tesut (a- glande, b- stroma).

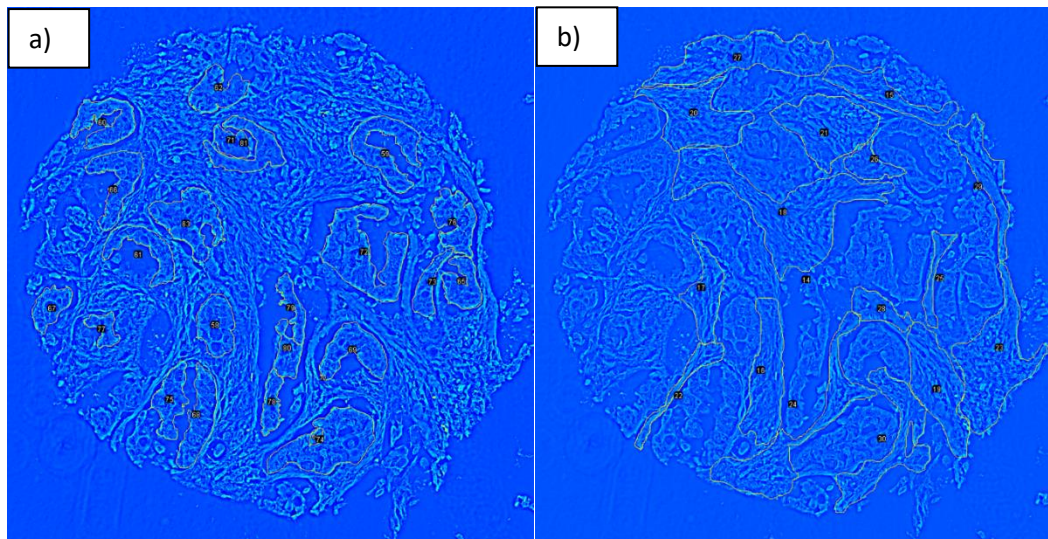


Figura 17. Selectarea zonelor de interes (ROI) pe o proba de tesut a- glande, b- stroma

#### 4. Colectarea si prepararea probelor de tesut

##### Introducere

In cadrul prezentei faze, ne-am propus sa punem la dispozitia CO mai multe seturi de mostre histopatologice de tesuturi animale si umane, provenind de la nivel ocular,



in scopul testarii sistemului microscopic dezvoltat de CO. In acelasi timp, odata cu probele furnizate, am elaborat si descrierea anatomopatologica a acestora. In cele ce urmeaza, se prezinta o sinteza a acestor activitati, incepand de la recoltarea tesuturilor umane si continuand cu pregatirea probelor si cu analiza anatomopatologica a tesuturilor.

## **Materiale si metode**

In aceasta sectiune vom prezenta modul de colectare a probei umane de analizat. Tesutul ocular de recoltat este o formatiune tumorala conjunctivala, proeminenta, la nivelul unghiului intern al globului ocular, de aproximativ 10/6 mm, pigmentata neuniform, bine vascularizata, mobila pe planurile subiacente, fara a fi insotita de inflamatie si nedureroasa (Figura 18, Figura 19).

## **Tehnica chirurgicala de recoltare a probei**

S-a folosit tehnica operatorie "no touch", pentru a evita potentiala insamantare a tesuturilor adiacente. OS: S-a efectuat anestezierea globului ocular, prin injectie parabolbara cu Xilina 4% si Clorhidrat de Ropivacaina Monohidrat (Naropin) 10 mg/ml. Se instileaza local solutie de antibiotic. Se marcheaza limitele formatiunii tumorale conjunctivale la aproximativ 5 mm de marginile vizibile clinic ale acesteia. Hemostaza la nivelul marcajului. Excizia formatiunii tumorale pe limitele marcate. Se instituie temporal superior un fir negru de sutura si nazal superior fir de sutura albastru, pentru marcarea zonelor de analiza (Figura 20). Proba este trimisa la examen histopatologic extemporaneu, si releva un nev displazic melanotic subepidermal, excizat cu margini de siguranta. Hemostaza. Sutura conjunctivala cu fir 8.0. Se instileaza antibiotic si midriatic local. Unguent cu antibiotic. Pansament monocular steril.

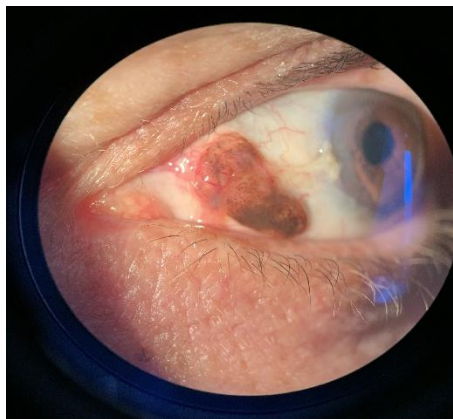


Figura 18 Formatiune tumorala oculara la nivelul conjunctivei bulbare unghi intern

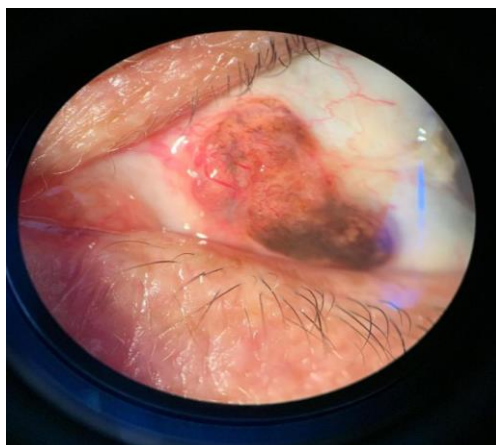


Fig. 19 Detaliu al formatiunii tumorale conjunctivale de recoltat

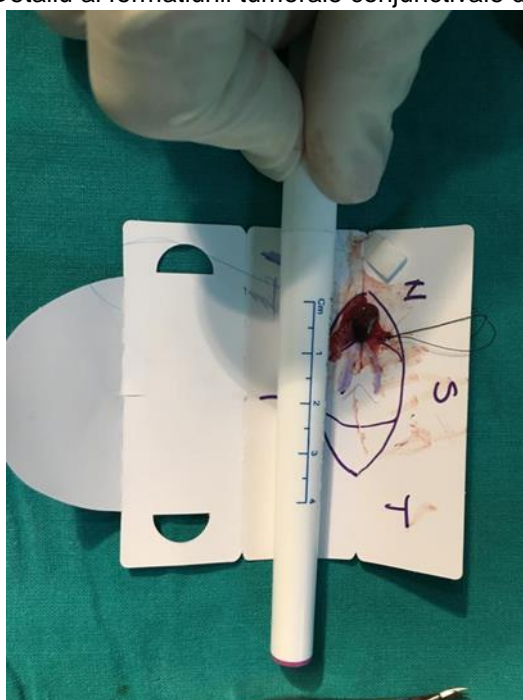


Figura 20 Tumora conjunctivala extrasa, cu firele de marcaj

Prelucrarea preparatului chirurgical impune transformarea acestuia dintr-un tesut sau fragment de organ intr-un preparat fin, subtire, translucid, care permite vizualizarea microscopica a detaliilor structurale.

Piesa operatorie receptionata de laboratorul de anatomie-patomogica este inregistrata, examinata din punct de vedere macroscopic si transformata in vederea stabilirii diagnosticului microscopic; aceasta trebuie adusa intr-un recipient cu capac, pe care trebuie inscriptionat numele pacientului si numarul de foaie de observatie. In vederea obtinerii diagnosticului ea poate suferi 2 metode de preparare : 1. : prepararea pentru examenul extemporaneu si 2. : prepararea pentru examenul histo-patologic.

#### 1. Prepararea pentru examenul extemporaneu.

Examenul extemporaneu este o metoda de diagnostic rapid, efectuata la cererea clinicianului, in timpul interventiei chirurgicale la un aparat special numit Criomicrotom. Piesa trimisa pentru examenul extemporaneu trebuie sa fie proaspata. Dupa receptionarea piesei aceasta este descrisa macroscopic si din ea se preleveaza un

fragment reprezentativ care va fi prelucrat ulterior; fragmentul prelevat este pus pe o placuta metalica, inghetat in criostat, sectionat (la o grosime de 5-6 microni), etalat pe lama si fixat . In acest moment este obtinut preparatul care este trimis spre examinare. Pentru diagnostic se continua cu colorarea lamei cu metoda Albastru de Toluidina si montarea acesteia (aplicarea unei lamele protectoare subtiri.

Coloratie Albastru de Toluidina - etape

- fixare in alcool absolut - 30 secunde
- spalare apa robinet
- colorare albastru de toluidina - 2 minute
- spalare apa robinet
- montare cu fructoza sau glucoza 33%

## 2. Prepararea pentru examenul histo-patologic

Probele operatorii destinate analizei histo-patologice sunt aduse intr-un recipient cu capac in care se afla o solutie de formol 10% care sa acopere in totalitate piesa care va fi examinata

Etapele prelucrării :

- fixarea : pastrarea piesei operatorii in formol aproximativ 24 ore, pentru a preveni alterarea si autoliza tesuturilor respective.
- procesarea tisulara : este reprezentata de deshidratare, clarificare si impregnare cu parafina, operatiuni care se fac automat in aparatul Donatello.
- includerea tesuturilor in blocurile de parafina.
- sectionarea tesuturilor la microtom (2-3 microni grosime)
- etalarea sectiunilor pe lama in vederea preparatului necolorat; lamele astfel obtinute vor fi examinate la CO.
- colorarea lamelor cu coloratia Hematoxilina-Eozina.
- monarea lamelor : aplicarea unei lamele protectoare.

Coloratia Hematoxilina Eozina - etape

- deparafinare in solutia ottix plus pentru o perioada de 10 minute
- depozitare in solutie ottix shaper timp de 10 minute
- spalare cu apa de robinet
- colorare cu Hematoxilina 10 minute
- spalare cu apa de robinet 5 minute
- colorare cu Eozina 1 minut
- deshidratare ottix shaper 1 minut
- clarificare ottix plus 1 minut.

Figura 21 prezinta o imagine a uneia dintre probele analizate de P1. Au fost analizate microscopic fragmente de glob ocular, coloratie uzuala hematoxilina eozina si coloratie van Gieson. S-au urmarit 3 parametri:

- Intensitatea procesului inflamator
- Componenta procesului inflamator
- Extensia procesului inflamator



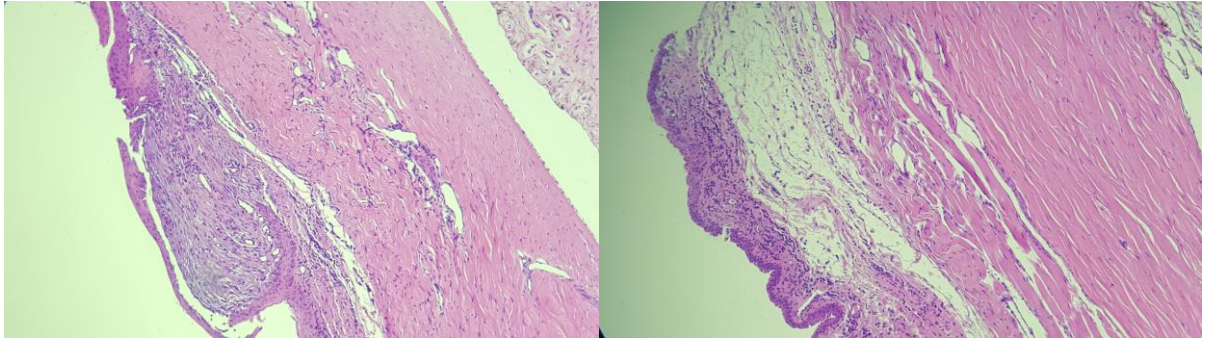


Figura 21. Ochi infiltrat inflamator in banda localizat subconjunctival si corneal: 600 elemente inflamatorii/mm<sup>2</sup>, constituit din: 20% PMN, 40% limfocite, 40% plasmocite. Spre zona de jonctiune cu cornea se observa minima fibroza, exprimata prin cresterea usoara a colagenului la acest nivel si a eozinofiliei acestuia. Edem proeminent si 2 arii de fibroza.

Intensitatea procesului inflamator a fost apreciata prin numararea celulelor inflamatorii/1mm<sup>2</sup> (microscop NikonE200); au fost analizate celulele inflamatorii de pe o suprafata de 3mm patrati , apoi s-a facut o medie aritmetica.

Componenta procesului inflamator a fost exprimata procentual in functie de numarul de limfocite, plasmocite si PMN (polimorfonucleara neutrofilice).

Extensia procesului inflamator a fost apreciata la nivelul a 5 zone : conjunctiva, sclera, muschi ciliar, process ciliar si muschi striat.

## **5. Concluzii privind aplicabilitatea acestui sistem in medicina si/sau in alte domenii**

Datele obtinute au aratat ca imagistica cantitativa de faza poate fi considerata o metoda utila pentru analiza tesuturilor, putand furniza informatii de interes pentru domeniul histopatologiei, informatii care in unele cazuri nu pot fi obtinute cu ajutorul metodelor standard utilizate. Astfel, s-a aratat faptul ca pe baza distributiei indicelui de refractie, cu ajutorul metodei QPI dezvoltate in cadrul proiectului se pot dezvalui structuri si componente ale tesuturilor subtiri, transparente, utilizate in analizele histopatologice. Mai departe este necesara continuarea colaborarii cu medici specialisti pentru compararea rezultatelor obtinute si pentru colectarea unui volum mare de date necesare dezvoltarii unui sistem automatizat de analiza de tesuturi in vederea diagnosticarii acestora. Un asemenea sistem va putea furniza informatii cantitative intr-un interval mult mai scurt de timp si va putea asista medicul specialist in diagnostic mai ales in cazurile greu de diferentiat.

## **6. Concluzii generale**

In cadrul acestei etape a fost dezvoltat si optimizat dispozitivul de analiza a probelor biologice constand in tesuturi fixate subtiri transparente. Optimizarea a fost efectuata pe baza rezultatelor obtinute si in urma interactiunii cu membrii echipei partenere formata din medici specialisti cu expertiza in oftalmologie si histopatologie. De asemenea, prin experiente repetate a avut loc validarea sistemului experimental de analiza, obtinandu-se rezultate reproductibile.

Au fost efectuate imbunatatiri ale sistemului experimental ce au constatat in calibrarea caracteristicilor componentelor sistemului in functie de performantele camerei CMOS, rezolutia retelei de difractie, cerintele si proprietatile probelor biologice

analizate. A fost dezvoltat împreună cu un grup de cercetare din SUA un software, bazat pe procesarea paralelizată CUDA, ce permite analiza automată în timp real a probelor biologice generând o hartă de fază (bazată pe variația indicelui de refracție din probă). Analiza imaginilor obținute a relevat importanța utilizării metodei QPI prin evidențierea unor detalii ce altfel nu ar fi putut fi vizualizate cu metode de microscopie cu lumină albă (BF) sau chiar și cele bazate pe contrast de fază (PH).

Din măsurătorile efectuate de CO asupra probelor furnizate de Clinica de Oftalmologie a S.U.U.B., a rezultat că metoda QPI permite punerea în evidență a unor detalii din structura tesuturilor oculare subțiri, față de situația în care este folosit un microscop optic obișnuit și proba nu este colorată. Acest fapt are potențial diagnostic, în sensul că ar putea fi evidențiate anumite caracteristici ale unui țesut, fără ca acesta să fie colorat prin tehnicile obișnuite anatomopatologice. Din punct de vedere medical, ar fi utilă compararea analizei efectuate pe țesut bioptic necolorat cu țesutul preparat prin tehnicile obișnuite, în vederea diseminării informației.

Pe baza datelor experimentale, putem afirma că dispozitivul experimental de analiză a țesuturilor poate fi utilizat cu succes pentru studierea probelor biologice transparente și ar putea reprezenta o soluție de viitor în analiză automatizată și diagnosticarea cancerului. Astfel, obiectivele proiectului pentru această etapă au fost îndeplinite și au fost obținute rezultatele estimate.

## 7. Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor s-a făcut în principal utilizând două instrumente: publicarea de articole și prezentarea realizărilor la conferințe naționale și internaționale.

### Articole:

- T. Tozar; I.R. Andrei; R. Costin; R.A. Pirvulescu; M.L. Pascu; *Case series about ex vivo identification of squamous cell carcinomas by laser induced autofluorescence and Fourier transformed infrared spectroscopy*, Lasers In Medical Science, 33, (4) 861-869, 2018
- I. R Andrei, M. Boni, A. Staicu, M.L. Pascu, *Lasing of optically pumped large droplets: instant and gradual blue shift*, Journal of the Optical Society of America B, Vol. 35, pp. 1950-1955, 2018.
- A. Smarandache, A. Staicu, A. Dinache, I. R. Andrei, R. A. Pirvulescu, M. L. Pascu, *Optical Irradiation of Cytostatics: Photoproducts Characterization and Tests on Rabbit Eye Pseudotumors*, accepted in Proc. Romanian Acad. A 2018
- I. R. Andrei, C. Onea, P.E. Sterian, I. Ionita, M. L. Pascu, *Control of slave chaotic dynamics by master current modulation in a chaotic coupled laser system*, Optoelectronics and Advanced Materials - Rapid Communications, in evaluare.
- V. Nastasa, M. E. Kandel, I. R. Andrei, M. L. Pascu, G. Popescu, *Quantitative phase imaging to evaluate the cytotoxic effect of laser irradiated Chlorpromazine on live cells*, in preparation

### Conferinte:

- Dinache, A; Andrei, IR; Tozar, T; Smarandache, A; Iordache, I; Boni, M; Staicu, A; Pascu, ML; *Laser assisted device for micro/nano-emulsion production*, European Colloid and Interface Society (ECIS) Conference, 2- 7 September 2018, Ljubljana, Slovenia
- Dinache, A; Andrei, IR; Boni, M; Tozar, T; Pascu, ML; *Laser foaming of medicine solutions*, European Colloid and Interface Society (ECIS) Conference, 2- 7 September 2018, Ljubljana, Slovenia;
- Boni, M; Andrei, IR; Staicu, A; Pascu, ML; *Lasing of optically pumped large droplets*, Annual Scientific Conference University of Bucharest, Faculty of Physics 2018 Meeting, 21-22 June 2018, Magurele, Romania;
- Simon, A; van Loon, J.J.W.A; Pascu, ML; "*Wetting of Laser Modified Medicine Droplets under Hypergravity Conditions*", Surface Wettability Effects on Phase Change Phenomena (SWEP) Workshop, 17-18 May 2018, Brighton, UK.
- Andrei, IR; Onea, C; Sterian, PE; Pascu, ML; *Experimental control of low-frequency fluctuations by current modulation in a laser diode chaotic coupled system*; Annual Scientific Conference University of Bucharest, Faculty of Physics 2018 Meeting, 21-22 June 2018, Magurele, Romania;
- T. Tozar, IR Andrei, R Costin, ML Pascu, *Picosecond laser in malignant tissue identification*, Laser Ignition Summer School 2018, Sibiu, Romania, 02-06.07.2018. (poster)
- M. Boni, *Laser liquid interactions with pendant beads*, Laser Ignition Summer School 2018, Sibiu, Romania, 02-06.07.2018. (poster)
- A. Simon; B. S. Calin; D. C. Tranca; M. Boni; I. R. Andrei; S. Simion; M. Bojan; I. S. Stroescu; M. L. Pascu; *Interaction of Laser Exposed Phenothiazine Droplets with Target Surfaces Approached in View of Microgravity Applications*, Joint International Student Conference on Photonics and Modern Laser Applications Conference 2018, ISCP-INDLAS 2018, 3-7 septembrie 2018, Alba Iulia,
- I. R. Andrei; C. Onea; P. E. Sterian; I. Ionita; M. L. Pascu; *Experimental Control of Slave Chaotic Dynamics by Master Current Modulation in a Chaotic Coupled Laser System*, Joint International Student Conference on Photonics and Modern Laser Applications Conference 2018, ISCP-INDLAS 2018, 3-7 septembrie 2018, Alba Iulia, Romania.
- I. R. Andrei; V. Nastasa; G. Popescu; M. L. Pascu; *White light diffraction phase microscope for tissue analysis*, Joint International Student Conference on Photonics and Modern Laser Applications Conference 2018, ISCP-INDLAS 2018, 3-7 septembrie 2018, Alba Iulia, Romania.
- A. Dinache; I.R. Andrei; T. Tozar; I. Iordache; A. Smarandache; M. Boni; A. Staicu; M.L. Pascu; *Laser Assisted Generation of Nano-Emulsions*, Joint International Student Conference on Photonics and Modern Laser Applications Conference 2018, ISCP-INDLAS 2018, 3-7 septembrie 2018, Alba Iulia, Romania.
- I. Urzica; A. Simon; V. Damian; M. Pascu; *Making Fingerprint Systems for Polymeric Materials by Laser Nano-Processing*, Joint International Student Conference on Photonics and Modern Laser Applications Conference 2018, ISCP-INDLAS 2018, 3-7 septembrie 2018, Alba Iulia, Romania.



- C. Onea, P.E. Sterian, I.R. Andrei, M.L. Pascu; *Mixing of High Frequency Oscillations Induced by a Selective External Reflector in Diode Laser Emission Dynamics*, The 6th international colloquium “Physics of Materials” (PM-6), 15-16 Nov. 2018, Bucharest, Romania

#### Referinte:

- [1] M. Shan, M. E. Kandel, H. Majeed, V. Nastasa, and G. Popescu, “White-light diffraction phase microscopy at doubled space-bandwidth product,” *Opt. Express*, vol. 24, no. 25, pp. 29033–29039, Dec. 2016.
- [2] B. Bhaduri *et al.*, “Diffraction phase microscopy: principles and applications in materials and life sciences,” *Adv. Opt. Photonics*, vol. 6, no. 1, pp. 57–119, Mar. 2014.
- [3] C. Hu *et al.*, “Optical excitation and detection of neuronal activity,” *J. Biophotonics*, p. e201800269, Oct. 2018.
- [4] Z. Wang, K. Tangella, A. Balla, and G. Popescu, “Tissue refractive index as marker of disease,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 11, p. 116017, Nov. 2011.
- [5] Z. Wang *et al.*, “Spatial light interference microscopy (SLIM),” *Opt. Express*, vol. 19, no. 2, pp. 1016–1026, Jan. 2011.
- [6] M. Shan, V. Nastasa, and G. Popescu, “Statistical dispersion relation for spatially broadband fields,” *Opt. Lett.*, vol. 41, no. 11, pp. 2490–2492, Jun. 2016.
- [7] J. Schindelin *et al.*, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jul. 2012.