

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**TEZĂ
DE
DOCTORAT**

***METODE ȘI MODELE
COMPUTAȚIONALE ÎN
ANATOMIA PATOLOGICĂ***

REZUMAT

***Conducător de Doctorat:
Profesor Universitar Dr. Iancu Emil PLEȘEA***

***Student - Doctorand:
Mircea Sebastian Șerbănescu***

2015

CUPRINS

Cuprins

Introducere

Stadiul cunoașterii

Capitolul I Tehnici de preprocesare de imagine

Capitolul II Tehnici de reducere a zgomotului din imagini

Capitolul III Tehnici de segmentare de imagine

Capitolul IV Tehnici de extragere de caracteristici din imagini

Capitolul V Tehnici de clasificare a imaginilor

Contribuția personală

Capitolul VI Metode și modele computaționale în macroscopie. Model: morfometrie aortică

Capitolul VII Metode și modele computaționale în citopatologie. Model: morfometria lichidului pleural

Capitolul VIII Metode și modele computaționale în histopatologie. Model: morfometrie miocardică

Capitolul IX Metode și modele computaționale în histopatologie. Model: morfometrie stromală hepatică

Capitolul X Metode și modele computaționale în histopatologie. Model: cancerul hepatic - primitiv sau secundar?

Capitolul XI Metode și modele computaționale în histopatologie. Model: nou parametru în morfometria stromală prostatică

Capitolul XII Normalizarea colorației imaginilor histologice pentru diagnosticul automat

Concluzii

Bibliografie

Lista publicațiilor

CUVINTE CHEIE

anatomie patologică digitală, lama digitală, algoritm computațional, analiză de imagine, cuantificare de imagine, normalizarea imaginilor, diagnostic automat

REZUMAT

Printre cele mai noi câmpuri în medicină se numără și anatomia patologică digitală care, ca entitate distinctă, a început să fie menționată în publicații cu recenzie încrucișată (jurnale) abia în anul 2000, cu toate că începuturile datează din anii 1990. Într-o carte dedicată anatomiei patologice digitale (Digital Pathology; Sucaet Yves, Waelput Wim - SpringerBriefs in Computer Science) se arată că în 2014 existau 188 de articole relevante despre acest subiect, dintre care 164 (87%) au fost publicate după anul 2009. Deși creșterea numărului de articole este impresionantă, este doar vârful unui iceberg, fiind vorba de o entitate ce este reprezentată de mai multe concepte, fiecare din ele reprezentând un nou domeniu de cercetare. La fel cum la medicină nu se mai studiază decât câteva materii care conțin cuvântul medicină la fel și în cazul anatomiei patologice digitale cercetătorii sunt interesați de definirea și cercetarea componentelor ei, mai degrabă decât a entității în sine.

Văzută simplu, **anatomia patologică digitală** reprezintă conversia unei imagini optice de lamă histologică clasică (din sticlă) într-o imagine digitală care poate fi încărcată pe un computer.

Anatomia patologică digitală este un mediu informațional bazat pe imagini, dezvoltat cu ajutorul computerului, ce permite gestionarea informațiilor generate de o lamă virtuală. Anatomia patologică digitală este posibilă doar prin utilizarea microscopiei digitale, care implică convertirea unei lame histologice (de sticlă), într-o lamă digitală care poate fi afișată, manipulată și analizată cu ajutorul computerului.

Apariția lamelor digitale deschide mai multe direcții de utilizare și automat, de cercetare:

1. Obținerea, stocarea și managementul lamelor virtuale.
2. Telepatologia.
3. Asistarea și automatizarea diagnosticului care permite obiectivarea și transformarea acestuia din calitativ în cantitativ.

Obținerea, stocarea și managementul lamelor virtuale a reprezentat primul pas în promovarea scannerelor de lame și a noii metode diagnostice. Majoritatea marilor producători de aparatură medicală destinată anatomiei patologice oferă astăzi scannere de lame (Olympus, Leica, Hamamatsu, 3D Histech) precum și softwareul necesar managementului lor.

Telepatologia este practicarea anatomiei patologice la distanță.

Telepatologia folosește tehnologia telecomunicațiilor ca să faciliteze transmiterea de imagini anatomo-patologice între locații situate la distanță în scop diagnostic, educațional sau de cercetare. Tot marii producători de echipamente medicale dețin monopolul acestei zone, dar au apărut și firme software sau combinate anatomo-patologice-software care oferă soluții de telepatologie cum ar fi HistogenX sau Pathomation.

De departe cel mai vast domeniu al anatomiei patologice digitale este cel ce se ocupă cu asistarea și automatizarea diagnosticului. Dacă în cazul celorlate două direcții formalizarea conceptelor a fost realizată, în prezent încercându-se implementări cât mai bune a acestora, în materie de asistare și automatizare a diagnosticului totul este în desfășurare. Baza largă a direcției de dezvoltare este dată de mai mulți factori printre care, "dar fără a se limita": tehnicile de colorare care sunt greu de standardizat, diversitatea aspectelor imaginilor analizate și nu în ultimul rând personalul implicat - medici fără cunoștințe tehnice în domeniul informaticii și informaticieni fără cunoștințe medicale - rezultând o colaborare greoaie.

În această teză mi-am propus să trasez posibilele direcții de asistare și automatizare în anatomia patologică digitală și să prezint implementarea, rezultatele și concluziile mai multor proiecte, bazate pe metode software, dar și hardware, pentru diagnosticare cantitativă și îmbunătățire de tehnică în anatomia patologică, pe care le-am finalizat în decursul a 4 ani de pregătire doctorală.

În prima parte a lucrării am trecut în revistă principalele tehnici digitale prin care calculatorul poate simula diagnosticul uman. Astfel făcând o analiză a modului uman de procesare al imaginilor am împărțit stadiul cunoașterii în 5 capitole, după cum urmează: **Capitolul I** Tehnici de preprocesare de imagine, **Capitolul II** Tehnici de reducere a zgomotului din imagini, **Capitolul III** Tehnici de segmentare de imagine [Serbanescu, 2012], **Capitolul IV** Tehnici de extragere de caracteristici din imagini și **Capitolul V** Tehnici de detecție [Serbanescu 2013a], [Serbanescu 2013b] și clasificare [Serbanescu, 2011], [Belciug et. All, 2013a], [Belciug et. All, 2013b] a imaginilor.

Partea a doua, contribuția personală, este împărțită în 7 capitole, reprezentând studii independente unde am aplicat mai multe metode și modele computaționale pentru a cuantifica diverși parametrii morfometrici sau pentru a îmbunătăți calitatea

imaginilor histopatologice. Studiile fiind complet diferite atât ca material cât și ca metodă vor fi prezentate separat, astfel spre deosebire de lucrările clasice fiecare capitol va avea subcapitole proprii pentru introducere, material și metodă, rezultate și discuții, precum și pentru concluzii. În **capitolul VI** am cuantificat diametrele aortei în diverse localizări la persoane decedate din cauze cardiace și non-cardiace [Mirea et. All, 2014], [Ancuta et. All, 2013]. Datele rezultate au fost folosite pentru antrenarea unei rețele neuronale capabile să indice cauza (cardiacă/non-cardiacă) decesului în funcție de măsurătorile efectuate [Serbanescu et. All, 2014]. În **Capitolul VII** am cuantificat populațiile celulare din frotiuri de lichid pleural din pleurezia TBC. În **Capitolul VIII** am cuantificat gradul de fibroză cardiacă la pacienții programați pentru transplant cardiac. În **Capitolul IX**, folosind colorația tricromică Masson, am cuantificat gradul de fibroză hepatică în afecțiunile hepatice de cauze virale. În **capitolul X** am cuantificat patternul de creștere în cancerul hepatic, datele obținute au fost folosite pentru antrenarea unei rețele neuronale capabile să indice dacă procesul neoplazic este primitiv sau metastatic [Gheonea et. All 2013]. În **capitolul XI** am cuantificat patternul de creștere în cancerul prostatic folosind un algoritm propriu de calculare a dimensiunii fractale [Serbanescu et. All, 2015c], [Serbanescu et. All, 2015d], [Serbanescu, 2015] făcând aprecieri și asupra asocierii stromale și vasculare cu patternurile de creștere [Stoiculescu et. All, 2012], [Plesea et. All, 2013], [Plesea et. All, 2015a], [Plesea et. All, 2015b], [Plesea et. All, 2015c]. În **capitolul XII** am dezvoltat o metodă de normalizare a colorațiilor histologice pentru obținerea de imagini standard, pretabile diagnosticului automat [Serbanescu et. All, 2015a], [Serbanescu et. All, 2015b].

În contextul unei medicine bazată pe dovezi și a unei nevoi mereu crescândă de diagnostice de mare precizie, prezenta lucrare, constituită din 7 studii independente, arată cum algoritmii computaționali pot fi folosiți pe de-o parte pentru asistarea și cuantificarea numerică a diagnosticului, iar pe de altă parte pentru îmbunătățirea imaginilor digitale necesare unui diagnostic corect.

În **primul studiu** folosind imagini macroscopice, calibrate cu o riglă marcată, am cuantificat dimensiunea exactă a diametrului arterei aorte la 4 niveluri (inel, crosă, descendentă toracică și descendentă abdominală) stabilind astfel două profile de variație a diametrelor, unul pentru pacienții cu deces de cauză cardiovasculară, iar altul pentru cei cu deces de cauză non-cardiovasculară. Mai mult datele au fost

folosite pentru antrenarea unei rețele neuronale capabilă să prezică cauza decesului. Rezultatele de clasificare corectă de aproximativ 80% și posibilitatea evaluării in-vivo, prin ecografie, a diametrelor oferă un mare potențial practic metodei de a prezice decesul de cauză vasculară/non-vasculară al pacienților.

În **cel de-al doilea studiu**, am cuantificat populații de celule izolate, din frotiuri de lichid pleural provenite de la pacienți cu pleurezie TBC. Ignorând alte tipuri de celule posibil prezente pe aceste frotiuri, celulele au fost cuantificate cu precizie și împărțite în 4 clase: limfocite, hematii, polimorfonucleare și mezoteliale. Rezultatele cuantificării au fost folosite pentru trasare profilelor tipurilor de frotiuri cu prezentarea exactă (numerică) a variației tipurilor de celularitate.

În **cel de-al treilea studiu**, folosind preparate histologice clasice, colorate cu hematoxilină-eozină am cuantificat aria de fibroză intramusculară și diametrul mediu al fibrei musculare cardiace la pacienți cu afecțiuni ce au necesitat transplant cardiac. Am putut astfel trasa profilul histologic al cordului ce necesită transplant cardiac și am observat că procesul de fibroză afectează diferit diversii pereți componenți ai cordului.

În **cel de-al patrulea studiu**, folosind preparate histologice clasice, colorate cu colorația specială tricromică Masson am cuantificat cantitatea de fibre de colagen la pacienți cu fibroză hepatică de cauză virală. Am observat corelații puternice între aprecierea noastră cantitativă și aprecierea prin scorul Metavir, confirmând astfel calitatea lui. Profilul clinic arată diferențe minime date de sex și diferențe mari în funcție de vârstă în ceea ce privește gradul de fibroză. Morfologic apariția de punți de fibroză și accentuarea gradului de fibroză se însoțește de creșterea ariilor totale a spațiilor porte, însă există o creștere minimă a cantității de fibroză portală, dovedind că la nivel portal există un echilibru între raportul cantității de fibre de colagen și aria spațiului port, indiferent de gradul de fibroză.

În **cel de-al cincilea studiu**, folosind preparate histologice clasice, colorate atât cu hematoxilină cât și imunohistochimic cu CD34/CD31 pentru colorarea vaselor am cuantificat patternul de creștere în cancerul hepatic primitiv și metastatic. Calculând dimensiunea fractală a dispoziției nucleilor și vaselor de sânge, atât în țesut hepatic normal, cât și în țesut hepatic neoplazic (primitiv sau metastatic) am antrenat o rețea neuronală capabilă să indice tipul de neoplazie malignă: primară sau metastatică. Rezultatele excelente ale rețelei ne-au făcut să apreciem că modelul propus poate fi

folosit cu succes în telemedicină, pregătire medicală, sau în eficientizarea timpului diagnostic pentru cancerul hepatic.

În **cel de-al șaselea studiu**, am propus un nou algoritm de cuantificare a dimensiunii fractale. Algoritmul se bazează pe aprecierea raportului dintre volumul curent și amplitudinea maximă și are avantajul aplicării directe pe imagini în tonuri de gri, sărind astfel peste un pas foarte de greu de ajustat – binarizarea – pas necesar algoritmului clasic de de apreciere a dimensiunii fractale de tip box-counting. Algoritmul a fost testat pe o baza de date publică cu texturi precum și pe o un set de date clasificat cu patternuri Gleason de cancer de prostată, în ambele seturi de date demonstrându-și superioritatea discriminatorie față de algoritmul standard.

În **ultimul studiu**, am propus un algoritm de normalizare a colorației pentru imaginile digitale cu preparate histologice. Normalizarea propusă, necesară oricărei aprecieri cantitative asupra tinctorialității imaginii, se bazează pe o soluție proteică solidă, de concentrație constantă, adăugată lângă fiecare preparat histologic și care parcurge toți pași pe care îi parcurge și preparatul biologic până la obținerea imaginii digitale. Imaginea digitală este astfel corectată în funcție de acest preparat, obținându-se o nouă imagine, colorată standard. Metoda a fost testată atât numeric cât și perceptual și a demonstrat rezultate superioare unei normalizări pur digitale.

În final după ce am demonstrat avantajele folosirii diverselor metode și modele computaționale pentru asistarea diagnosticului anatomopatologic în macroscopie, citopatologie, histopatologie și pentru îmbunătățirea tehnicii de vizualizare/măsurare precizem că acesta este doar începutul, iar cu timpul din ce în ce mai mulți algoritmi vor fi implicați în diagnostic și, de ce nu, prin prisma corelațiilor anatomo-clince, în prevenție.

BIBLIOGRAFIE PROPRIE

1. **Serbanescu Mircea-Sebastian**. Linear neural network-based decision model in breast cancer detection and recurrence. Journal of Knowledge, Communications and Computing Technologies, 2011, 3(2):1-8.
2. Stoiculescu A, Plesea IE, Pop OT, Alexandru DO, Man M, **Serbanescu M**, Plesea RM. Correlations between intratumoral interstitial fibrillary network

- and tumoral architecture in prostatic adenocarcinoma. Rom J Morphol Embryol, 2012, 53(4):941–950.
3. Ancuta Anca, Mirea Oana , **Serbanescu MS**, Zdrancota Catalina, Uscatu D, Alexandru D, Plesea RM, Plesea IE. Left ventricle remodeling in subjects deceased due to a cardiovascular event: an autopsy study. Current Health Sciences Journal, 2013, S13(1):5-10.
 4. Belciug Smaranda, Gorunescu Florin, **Serbanescu Mircea Sebastian**. Improving MLP classification accuracy for breast cancer detection through evolutionary computation, partially connectivity and feature selection. Egyptian Computer Science Journal, 2013a, 37(5):1-15.
 5. Belciug Smaranda, **Serbanescu Mircea-Sebastian**, Gorunescu Florin, Badea Radu. Evolutionary-based Intelligent Decision Model to Optimize the Liver Fibrosis Stadialization. Annals of the University of Craiova, Mathematics and Computer Science Series, 2013b, 40(2):237–248.
 6. Plesea IE, Stoiculescu A, **Serbanescu M**, Alexandru DO, Man M, Pop OT, Plesea RM. Correlations between intratumoral vascular network and tumoral architecture in prostatic adenocarcinoma, Rom J Morphol Embryol, 2013, 54(2):299–308.
 7. **Serbanescu MS**. Simple Texture Descriptors for Classification of Mitotic Cells Figures of Histopathological Images from Breast. Buletinul Stiintific al Universitatii Politehnica din Timisoara, 2013b, 58(72), 50-54.
 8. **Serbanescu Mircea-Sebastian**. Semi Automated Mitosis Detection in Histopathological Images of Breast. Annals. Computer Science Series - Tibiscus University of Timisoara, 2013a, 11(1):66-70.
 9. Gheonea DI, Streba CT, Vere CC , **Serbanescu M**, Pirici D, Comanescu M, Streba LA, Ciurea ME, Mogoanta S, . Rogoveanu I. Diagnosis system for hepatocellular carcinoma based on fractal dimension of morphometric elements integrated in an artificial neural network, Biomed Res Int, 2014, Article ID 239706, p. 1-10.
 10. Mirea Oana Cristina, Ancuta Anca Adriana, **Serbanescu Mircea Sebastian**, Postolache Paraschiva, Uscatu Constantin Daniel, Marin Catalina, Plesea Iancu Emil, Chiutu Luminita Cristina. Analysis of aortic size in subjects died

- due to cardiovascular and non-cardiovascular events a necropsy study. Rom J Morphol Embryol, 2014, 55(S3):1105–1109.
11. Plesea RM, **Serbanescu MS**, Alexandru DO, Ciovetica V, Stoiculescu A, Pop OT, Simionescu Cristiana, Plesea IE. Correlations Between Intratumoral Interstitial Fibrillary Network and Vascular Network in Gleason Patterns of Prostate Adenocarcinoma. Current Health Sciences Journal, 2015, 41(4):345-354.
 12. **Serbanescu Mircea Sebastian**, Plesea Iancu Emil. A hardware approach for histological and histopathological digital image stain normalization. Rom J Morphol Embryol, 2015a, in press.
 13. **Serbanescu Mircea Sebastian**, Plesea Iancu Emil. R-VA a new fractal parameter for grayscale image characterization. Annals. Computer Science Series - Tibiscus University of Timisoara, 2015c, 13(1):9-14.
 14. **Serbanescu MS**. Clustering of Mitotic Cells Figures of Histopathological Images from Breast Cancer. Proceedings Conference of the Romanian Society of Medical Informatics - ROMEDINF, Timisoara, 2012, p. 1-5.
 15. Foarfa Camelia, Bala Serenada, Bazavan Mihaela, Zdrancota Catalina, Giurea Iuliana, **Serbanescu M**. Melanomul malign nazal si de sinus paranasal - prezentare de caz. Al XI-lea Simpozion National de Morfologie Microscopica cu Participare Internationala, Craiova 2013, p. 105.
 16. Streba Liliana, Mogoanta SS, Streba CT, **Serbanescu M**, Mogoanta L. Novel fractal analysis tool for the quantification of histology images of colorectal adenocarcinoma: a pilot study. Al XI-lea Simpozion National de Morfologie Microscopica cu Participare Internationala, Craiova, 2013a, p. 172-173.
 17. Streba Liliana, Mogoanta SS, Streba Letitia Aedla Maria, **Serbanescu M**, Mogoanta L. Application of fractal box counting algorithms for morfological measurements in colorectal adenocarcinoma: comparison of three methods. Al XI-lea Simpozion National de Morfologie Microscopica cu Participare Internationala, Craiova, 2013b, p. 174-175.
 18. **Serbanescu Mircea Sebastian**, Uscatu Constantin Daniel, Marin Catalina Floriana, Plesea Iancu Emil. Prediction of Cardiovascular Death by Cardiac

- and Aortic Morphometry a Preliminary Autopsy Study. 12th European Congress on Digital Pathology, Paris, 2014, p. 51.
19. **Serbanescu Mircea Sebastian**. A new parameter with fractal behavior that can be applied directly to grayscale images. APHS2015 - Actualitati si perspective in hard si soft, Editia a VIII-a, Tibiscu, Timisoara, 2015.
 20. **Serbanescu Mircea Sebastian**, Plesea Iancu Emil. Digital image perception among pathologists. Al XIII-lea Simpozion National de Morfologie Microscopica, cu participare internationala, Craiova, 2015b, p. 129.
 21. Plesea Razvan Mihail, **Serbanescu Mircea Sebastian**, Alexandru Dragos, Ciovea Viorel, Stoiculescu Adrian, Pop Oltin Tiberiu, Simionescu Cristiana, Plesea Iancu Emil, Correlations Between Intratumoral Interstitial Fibrillary Network and Vascular Network in Gleason Patterns of Prostate Adenocarcinoma, Al XIII-lea Simpozion National de Morfologie Microscopica, cu participare internationala, Craiova, 2015c, p. 116.
 22. **Serbanescu Mircea Sebastian**, Plesea Razvan Mihail, Ciovea Viorel, Plesea Iancu Emil. Gleason pattern evaluation based on fractal dimension of stromal intratumoral fibrillar network. 27th European Congress of Pathology, Belgrad, 2015d, 467(1):S235.
 23. Plesea Razvan Mihail, **Serbanescu Mircea Sebastian**, Ciovea Viorel, Plesea Iancu Emil. Stromal fibrillary component/vascular network relationship in different Srigley system patterns of prostate adenocarcinoma. 27th European Congress of Pathology, Belgrad, 2015a, 467(1):S270.