

Universitatea Politehnica București

Școala Doctorală de Electronică, Telecomunicații și Tehnologia Informației din București (SD-ETTI-B) România



Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila" București Școala Doctorală a Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" Bucuresti



ACORD DE COTUTELĂ DOCTORALĂ NR. 232/09.01.2017 RESPECTIV NR. 6372/06.03.2017 Nr. Decizie 628 din 14.12.2020

TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT -

CERCETĂRI ÎN PATOLOGIA TIROIDIANĂ FOLOSIND TEHNICI NECONVENȚIONALE DE ÎNALTĂ REZOLUȚIE CU FASCICULE LASER

Doctorand: Med. Lucian-George EFTIMIE

COMISIA DE DOCTORAT							
Președinte	Prof. Dr. Ing. Bogdan	de la	Universitatea Politehnica București				
	IONESCU						
Conducător	Prof .Dr. Ing. Gheorghe	de la	Universitatea Politehnica București				
de doctorat	STANCIU						
Coordonator	Prof.Dr. Med. Maria	de la	Universitatea de Medicină și				
cotutelă	SAJIN		Farmacie "Carol Davila" București				
Referent	Prof. Dr. Ing. Gheorghe	de la	Universitatea Politehnica București				
	BREZEANU						
Referent	Prof. Dr. Med. Mariana	de la	Universitatea de Medicină și				
	COSTACHE		Farmacie "Carol Davila" București				

COMISIA DE DOCTORAT

BUCUREŞTI 2020

Mulţumiri

Elaborarea acestei teze de doctorat ar fi fost imposibilă fără colaborarea unor specialiști cu calități profesionale și umane de excepție, colegi, prieteni, oameni deosebiți care, printr-un înalt grad profesional și dăruire, au contribuit la formarea mea ca cercetător, insuflându—mi curajul de a merge mai departe și cărora doresc să le mulțumesc pe această cale pentru ajutorul, sprijinul, îndrumarea și răbdarea de care au dat dovadă pe parcursul anilor de studii doctorale.

Doresc să adresez toate mulţumirile, în primul rând, domnului Prof. Univ. Dr. George A. Stanciu pentru sugestiile motivatoare, discuţiile avute şi criticile constructive şi pentru că m-a acceptat la doctorat şi mi-a îndrumat paşii, cu multă minuţiozitate şi tact, în realizarea tezei de doctorat şi doamnei Prof. Univ. Dr. Maria Sajin pentru sprijinul, ajutorul, îndrumarea, sfaturile şi ideile oferite cu generozitate, încrederea şi răbdarea acordate pe întreaga perioadă de cercetare, contribuind astfel la formarea mea personală și profesională și, nu în ultimul rând, pentru noblețea sufletească care o caracterizează.

Adresez mulţumiri totodată îndrumătorilor mei științifici doamnei Prof. Univ. Dr. Mariana Costache și domnului Dr. Ing. Ștefan Stanciu pentru timpul prețios acordat, pentru sfaturile științifice valoroase, cât și pentru discuțiile fructuoase referitoare la subiectele abordate în teza de doctorat.

Aleasă considerație și mulțumiri, de asemenea, colegului meu din cadrul Centrului de Microscopie Microanaliză și Procesarea Informației: Dr. Ing. Radu Hristu. Îi adresez întreaga mea recunoștință pentru sprijinul permanent acordat, înțelegerea de care a dat dovadă, încrederea totală, sfaturile și îndrumările constante pe tot parcursul studiilor de cercetare efectuate, care au dus la elaborarea tezei de doctorat.

Un deosebit respect și mulțumiri adresez domnului Col. Dr. Marius Dumitrescu, Seful Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Universitar de Urgență Militar Central "Carol Davila", care, ori de câte ori a fost nevoie, mi-a oferit sfaturile cele mai bune, dar și ajutor necondiționat. Mai mult decât atât, prin încrederea și încurajarea care mi-au fost oferite am reușit să cresc atât pe plan profesional, cât mai ales ca om. Prețuirea și mulțumirea pe care i-o port nu pot fi măsurate în câteva cuvinte.

Sincere mulţumiri doamnei Dr. Dana Terzea, doamnei Dr. Florina Vasilescu, doamnei Cpt. Dr Alexandra Calu, doamnei Dr. Miruna Burcin, doamnei Dr. Biofiz. Alina Constantin, doamnei Dr. Biofiz. Tatiana Tozar, domnului Dr. Daniel Uscatu, domnului Dr. Mircea Şerbănescu, domnului Col. Dr. Marius Curea și domnului Col. Lector Univ. Dr. Remus Glogojeanu, pentru punerea necondiționată la dispoziție a cunoștințelor acestora și pentru sprijinul oferit de fiecare dată când am avut nevoie și nu în ultimul rând alese mulţumiri celorlalți colegi din cadrul Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Universitar de Urgență Militar Central "Carol Davila".

Mulţumesc din suflet doamnei Nicoleta Brănişteanu și domnului Cornel Andronache, de la secretariatul școlii doctorale, pentru înțelegere și recomandările utile care mi-au permis să trec cu bine peste regulile impuse în realizarea și finalizarea unei teze de doctorat.

Mulţumirile cele mai calde şi profunde se îndreaptă către persoana care m-a sprijinit și a fost alături de mine ori de câte ori a fost nevoie. Mai mult decât atât, sfaturile și exemplele despre cum să lupți pentru a-ți îndeplini obiectivul sau visul, nu au încetat să mă uimească și să mă inspire. Această persoană minunată este Daria, soția mea, prietena mea cea mai bună și mama copiilor noștri. O prețuire nespusă o am pentru părinții mei, care întotdeauna m-au încurajat și m-au sprijinit cu tot ce le-a stat în putință să îmi urmez și să-mi realizez visele. Au fost lângă mine ori de câte ori am avut nevoie, oferindu-mi atât sprijin material, cât mai ales moral, întotdeauna subliniind importanța unei bune educații. Nu pot în cuvinte să mulţumesc pentru cât au făcut pentru mine, de-a lungul vieții mele de până acum.

În sfârșit, dar nu în ultimul rând doresc să-i mulțumesc Bunului Dumnezeu.

Cuprinsul tezei de doctorat

Mulțumiri	.ii
Lista tabelelor	'ii
Lista figurilor	ix
Lista abrevierilor	٢V
1. Introducere	.1
1.1. Prezentarea domeniului tezei de doctorat	.6
1.2. Scopul tezei de doctorat	.6
1.3. Conținutul tezei de doctorat	.8
2. Starea actuală privind cercetările asupra patologiei tiroidiene1	13
2.1. Noțiuni de anatomie, embriologie și histologie ale glandei tiroide1	13
2.1.1. Embriologia glandei tiroide1	13
2.1.2. Anatomia glandei tiroide1	4
2.1.3. Histologia glandei tiroide1	5
2.1.4. Funcția glandei tiroide1	17
2.2. Aspecte histopatologice ale glandei tiroide1	8
2.2.1. Tumori tiroidiene benigne	21
2.2.2. Tumori tiroidiene cu potențial malign incert	23
2.2.3. Tumori tiroidiene maligne	24
2.3. Metode de explorare a glandei tiroide	31
2.3.1. Anamneza si examenul clinic	31
2.3.2. Ecografia tiroidiană	31
2.3.3. Elastografia	32
2.3.4. Tomografia computerizată	32
2.3.5. Imagistica prin Rezonanță Magnetică	33
2.3.6. Scintigrafia tiroidiană	33
2.3.7. Puncția aspirativă cu ac fin sub ghidaj ultrasonografic	33
2.3.8. Examinarea histopatologică	35
3. Materiale și metode utilizate pentru studiul patologiei nodulilor tiroidieni .3	37
3.1. Materialul și metoda folosite pentru diagnosticul histopatologic al nodulilor	
tiroidieni pe colorația uzuală Hematoxilină & Eozină în Serviciul de Anatomie	
Patologică	37
3.1.1. Orientarea macroscopică / modelarea / punerea în lucru a pieselor	37
3.1.2. Prelucrarea țesuturilor	15
3.1.3. Procedura de colorare a secțiunilor efectuate4	17
3.1.4. Examinarea la microscop și elaborarea diagnosticului histopatologic4	18

3.2. Materialul și metoda folosite pentru cazurile selecționate în scop de	
cercetare, reprezentate de noduli tumorali tiroidieni diagnosticați în Serviciul	
de Anatomie Patologică	49
4. Rezultate experimentale	51
4.1. Cercetări realizate prin utilizarea microscopiei optice clasice	51
4.1.1. Descrierea principiului microscopiei optice clasice	51
4.1.2. Tehnica folosită pentru marcarea imunohistochimică	57
4.1.3. Diagnosticul histopatologic completat cu examenul imunohistochimi	с
al nodulilor tiroidieni	61
4.2. Cercetări realizate prin utilizarea microscopiei confocale cu baleiaj laser	
(CLSM – Confocal Laser Scanning Microscopy)	.112
4.2.1. Descrierea tehnicii	.112
4.2.2. Aplicații în biologie și medicină	.117
4.2.3. Rezultate obținute	.118
4.3. Cercetări realizate prin utilizarea microscopiei cu baleiaj laser bazată pe	
fluorescența generată de excitația cu doi fotoni (TPEF - Two Photon Excited	
Fluorescence)	.122
4.3.1. Principiul excitației cu doi fotoni	.122
4.3.2. Descrierea tehnicii	.125
4.3.3. Compararea metodelor de microscopie convențională, confocală și	
de excitație cu doi fotoni	.128
4.3.4. Aplicații în biologie și medicină	.129
4.3.5. Rezultate obținute	.129
4.4. Cercetări realizate prin utilizarea microscopiei cu baleiaj laser bazată pe	
generarea armonicii a doua (SHG - Second Harmonic Generation)	.132
4.4.1. Principiul generării armonicii a doua	.132
4.4.2. Descrierea tehnicii	.135
4.4.3. Compararea metodelor de excitare cu doi fotoni și cea de generare a	
armonicii a doua	.136
4.4.4. Aplicații în biologie și medicină	.136
4.4.5. Rezultate obținute	.138
5. Concluzii	.183
5.1. Rezultate obținute	.183
5.2. Contribuții originale	.190
5.3. Lista contribuțiilor originale	.195
5.4. Perspective de dezvoltare ulterioară	.196
Bibliografie	.247

Capitolul 1 - Introducere

Organizația Mondială a Sănătății anunță cancerul printre cauzele principale de morbiditate și mortalitate, fiind a doua cauză de deces din lume după bolile cardio-vasculare. Cancerul tiroidian reprezintă 92% din totalul neoplaziilor endocrine. Mortalitatea prin cancer poate fi redusă dacă sunt detectate și tratate timpuriu cazurile. [1]

Diagnosticul clinic și imagistic de malignitate este confirmat sau infirmat în departamentele de patologie, histopatologia și citopatologia fiind principalele instrumente utilizate în diagnosticul cancerului. Diagnosticul histopatologic al nodulilor tiroidieni pe secțiuni la parafină din țesutul tiroidian suspect reprezintă standardul de aur în diferențierea leziunilor benigne de cele maligne.

Din cauza incidenței în creștere sau a supradiagnosticării carcinoamelor tiroidiene atât pe plan mondial, cât și în România, scopul principal al acestei teze este reprezentat de găsirea unei potențiale noi metode ajutătoare, complementare examenului microscopic optic tradițional în a diagnostica cu precizie și rapiditate nodulii maligni tiroidieni, doar prin studierea capsulei acestora.[2]

1.1 Prezentarea domeniului tezei de doctorat

O metodă complementară în scop diagnostic, care ar putea fi folosită în patologia neoplasmelor tiroidiene încapsulate este folosirea tehnicilor neconvenționale de înaltă rezoluție cu fascicule laser.

Orice experiment de acest tip se poate realiza doar printr-o colaborare interdisciplinară între o Universitate de științe biomedicale - Universitatea de Medicină și Farmacie București (un medic anatomopatolog care analizează probele biologice din punct de vedere medical și care își desfășoară activitatea într-un Departament de Patologie a unui spital - de exemplu Spitalul Universitar de Urgență Militar Central "Dr. Carol Davila", București) și o Universitate cu profil tehnic -Universitatea Politehnica din București (cu aparatura de înaltă performanță și cunoștințele cercetătorilor referitoare la metode alternative de microscopie cantitativă și procesare de imagini – de exemplu Centrul de Microscopie, Microanaliză și Procesarea Informației). Această colaborare corespunde astfel necesității unui diagnostic cât mai exact și rapid într-un caz medical dificil cu care se poate confrunta un medic anatomopatolog (ideea medicală), unde se va regăsi aportul important al tehnologiei, aparaturii de ultimă generație și pregătirii unui inginer cercetător (ideea metodelor imagistice noi, concepute până în prezent, pe structuri biologice sau nonbiologice) și a dus la rezultatele foarte bune ale studiilor de cercetare din această lucrare exclusiv pe probe biologice.

1.2 Scopul tezei de doctorat

Găsirea unei potențiale noi metode ajutătoare, complementare examenului microscopic optic tradițional în a diagnostica cu precizie și rapiditate nodulii maligni tiroidieni, care constă în studierea distribuției fibrelor de colagen din capsula fibroasă a nodulilor tiroidieni patologici prin intermediul microscopiei cu baleiaj laser.

Tema de cercetare abordează un subiect complex privind elaborarea unui diagnostic diferențial cât mai corect al nodulilor tiroidieni încapsulați (benigni și maligni), cunoscut fiind faptul că medicul anatomopatolog se confruntă uneori de lipsa vizualizării totale la microscopul optic, a capsulei ce delimitează nodulul tumoral de parenchimul tiroidian adiacent indemn.

Am gândit că ar fi necesară vizualizarea printr-o metodă microscopică a capsulei ce înconjoară nodulul tumoral tiroidian suspect, în totalitatea ei, pentru a descoperi o eventuală transformare malignă sau o modificare capsulară care nu poate fi decelabilă prin metodele clasice.

Astfel, am urmărit identificarea unui răspuns la întrebarea dacă s-ar putea diferenția nodulii maligni de cei benigni, vizualizând doar distribuția și modificările structurale ale colagenului din capsula acestora, utilizând tehnici optice de microscopie, în special microscopia de baleiaj laser.

1.3 Conținutul tezei de doctorat

În lucrarea de față mi-am propus să observ distribuția colagenului din structura capsulei care delimitează: adenoamele tiroidiene (adenomul follicular - FA) și carcinoamele tiroidiene (carcinomul tiroidian papilar - PTC) aparent încapsulate, utilizând tehnici optice de microscopie, în special microscopia de baleiaj laser.

Până în prezent nu s-au realizat astfel de cercetări asupra colagenului capsular al nodulilor tiroidieni patologici.

Am apelat la imagistica prin microscopia cu baleiaj laser, realizată cu aparatura din dotarea Centrului de Microscopie-Microanaliză și Procesarea Informației din cadrul Universității Politehnica din București și anume la: microscopia confocală cu baleiaj laser (confocal scanning laser microscopy- CLSM), microscopia bazată pe excitația cu doi fotoni (two photon excitation fluorescence-TPEF) și microscopia bazată pe generarea armonicii a doua (second harmonic generation- SHG) care s-a dovedit a fi cea mai utilă în acest sens.

Motivație: deoarece capsula tiroidiană este constituită din colagen, iar imagisitica SHG poate fi utilizată doar în materiale care nu au un centru de simetrie, cum ar fi fibrele de colagen am considerat că microscopia cu baleiaj laser, și în special microscopia SHG ar putea diferenția nodulii maligni de cei benigni tiroidieni, prin punerea în evidență a distribuției și modificărilor structurale ale colagenului din capsula acestora.

Capitolul 2 – Starea actuală privind cercetările asupra patologiei tiroidiene

2.1. Noțiuni de embriologie, anatomie și histologie ale glandei tiroide

2.1.1. Embriologia glandei tiroide

Primordiul glandei tiroide apare în Săptămânile 3-4 de dezvoltare gestațională a embrionului, la baza faringelui primitiv, în foramen cecum. În următoarele săptămâni de gestație, coboară de la baza limbii la baza gâtului, trecând în fața osului hioid, își continuă dezvoltarea, cu expansiunea laterală și formarea lobilor tiroidieni în săptămâna 7 de gestație. În săptămâna 14 de gestație se pot observa foliculi tiroidieni maturi cu secreție coloidală în lumen. [3]

2.1.2. Anatomia glandei tiroide

Tiroida este o glanda endocrină, situată la baza feței anterioare a gâtului, cântărind 25 - 30 grame, având forma literei "H" (fluture), alcătuită din doi lobi, simetrici lateral, uniți printr-un istm. Este localizată superficial și este ușor accesibilă inspectării și palpării. [4]

2.1.3. Histologia glandei tiroide

Glanda tiroidă este acoperită de o capsulă fină scleroasă ce trimite spre interior septuri fibroase ce împarte parenchimul în lobuli (tiromere), parenchimul tiroidian fiind alcătuit în principal din două tipuri de celule: celulele parafoliculare C (secretă calcitonina) și celulele tiroidiene (alcătuiesc foliculii tiroidieni), iar unitatea structurală și funcțională a tiroidei este reprezentată de foliculul tiroidian. [4]

2.1.4. Funcția glandei tiroide

Tiroida este responsabilă de sinteza și secreția hormonilor tiroidieni - T3, T4, sintetizați de celulele foliculare sub control hipofizar (TSH) și hipotalamic (TRH). Aceștia reglează metabolismul, cresc sinteza proteică în toate țesuturile organismului, cresc consumul de oxygen și au un rol crucial în dezvoltarea organismului și maturarea normală a sistemului nervos central și periferic. Funcția secundară a tiroidei este reprezentată de sinteza calcitoninei de către celulele C, calcitonina fiind un hormon implicat în reglarea nivelului plasmatic al calciului.[4]

2.2. Aspecte histopatologice ale glandei tiroide

Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) - (Clasificarea OMS a tumorilor glandei tiroide, 2017) [5], tumorile tiroidiene se împart în trei categorii: tumori benigne (de exemplu adenomul folicular), tumori "borderline" ("de graniță", cu un comportament incert – de exemplu neoplasmul folicular tiroidian noninvaziv cu nuclei "papillary-like" (NIFTP)) și tumori maligne (de exemplu carcinomul papilar tiroidian). Deși majoritatea tumorilor benigne nu pot pune viața în pericol, multe tipuri de tumori benigne au potențialul de a deveni canceroase (maligne) printr-un proces cunoscut sub numele de progresie tumorală sau transformare malign [6].

2.3. Metode de explorare a glandei tiroide

Glanda tiroidă poate fi explorată printr-o serie de metode noninvasive (anamneza și examenul clinic, ecografia tiroidiană, elastografia, tomografia computerizată, imagistica prin Rezonanță Magnetică, scintigrafia tiroidiană), minim invasive (puncția aspirativă cu ac fin sub ghidaj ultrasonografic, urmată de examinarea citopatologică) sau prin examinarea histopatologică a probelor biologice rezecate intraoperator sau postoperator.

Capitolul 3 – Materiale și metode utilizate pentru studiul patologiei nodulilor tiroidieni

Metodele de investigare utilizate pe probele biologice reprezentate de noduli tiroidieni patologici au fost reprezentate de următoarele tehnici optice de microscopie: microscopia optică, CLSM, imagistica TPE și imagistica SH.

Microscopia optică reprezintă o tehnologie ce permite obținerea unor detalii de dimensiuni și formă, însă atunci când sunt necesare informații structurale ale specimenului analizat caracteristicile acestei tehnici sunt depășite. Principala limitare a microscopiei otice este legata de faptul ca aceasta da o imagine a unui volum al probei. Microscopia confocală de baleiaj și microscopia utilizând mai mulți fotoni aduc o îmbunătățire în limitele rezoluției atât spațială cât și axială.

CLSM este o tehnică de microscopie cu baleiaj care implică existența unei surse laser (sursă de lumină coerentă) în antiteză cu sursa de lumină necoerentă ca în cazul microscopiei optice Principiul CLSM este ilustrat în figura 4.57.



Fig. 4.57 Reprezentarea schematică a traseului parcurs de radiația de excitație (sursa laser) către specimen și traseul parcurs de radiația emisă de către specimen către fotomultiplicator prin unitatea de scanare a unui microscop confocal de baleiaj laser. [95]

Microscopia TPEF este o tehnică de imagistică bazata pe fluorescență care permite obținerea imaginii unui țesut până la aproximativ un milimetru în adâncime datorită absorbției reduse si a împrăștierii luminii de excitație mult mai reduse, datorită utilizării radiației cu lungimi de undă mari (infraroșu) și care a fost aplicată recent în studii preclinice [7].

Tehnicile de imagisica TPEF și SHG oferă capacități de secționare 3D intrinseci cu o rezoluție axială excelentă. Această proprietate permite secționarea optică a țesuturilor biologice având o fototoxicitate redusă în afara planului focal [8]. Există posibilitatea ca radiațiile produse prin TPEF și SHG să fie colectate înainte sau înapoi. Reprezentarea schematică a unui microscop bazat pe TPEF și SHG este ilustrată în figura 4.76.



Fig. 4.76. Reprezentare schematică a unui microscop cu baleiaj laser bazat pe generarea armonicii a doua, cu TREI canale simultane: unul de TPEF și două de SHG (unul generat înainte și unul generat înapoi).

Un microscop cu baleiaj laser sau un microscop confocal se poate ușor modifica pentru a realiza o imagistică bazată pe efecte optice neliniare.

Materialul (probele utilizate) pentru studiul patologiei nodulilor tiroidieni a fost recoltat de la pacienții diagnosticați histopatologic după intervenții chirurgicale (Spitalul Universitar de Urgență Militar Central "Dr. Carol Davila" București) pentru diferite afecțiuni din sfera patologiei tiroidiene.

S-a efectuat prelevarea de fragmente din toate leziunile identificate macroscopic la nivelul pieselor chirurgicale, pe cât posibil cu includerea în același fragment atât a țesutului cu aspect macroscopic patologic cât și normal și prelucrarea acestora conform protocolului standard al Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalul Universitar de Urgență Militar Central "Dr. Carol Davila" București, urmat de elaborarea diagnosticului histopatologic la microscopul optic.

Fragmentele de țesut selecționate în scop de cercetare au fost fixate în soluție apoasă, tamponată de formaldehidă 10%, încorporate în parafină, cu secțiuni din blocul de parafină - groase de 4-5 microni, care apoi au fost întinse pe lame. Două secțiuni de țesut au fost tăiate consecutiv din același bloc de parafină: una a fost colorată cu Hematoxilină & Eozină și cea de-a doua nu a fost colorată (păstrată pentru TPEF și SHG).

Capitolul 4 – Rezultate experimentale Studii asupra patologiei nodulilor tiroidieni utilizând tehnici optice de microscopie

4.1. Cercetări realizate prin utilizarea microscopiei optice clasice

În cadrul acestui capitol sunt cercetate secțiunile tisulare tiroidiene investigate prin microscopia optică clasică, obligatoriu colorate cu colorația standard Hematoxilină & Eozină pentru a putea fi elaborat un diagnostic histopatologic de nodul malign - carcinom papilar tiroidian (PTC) (figura 4.5) sau nodul benign - adenom follicular (FA) (figura 4.6), iar pentru cazurile dificile au fost efectuate teste imunohistochimice de confirmare a diagnosticului, pentru a face un diagnostic diferențial cu alte tipuri histopatologice de proliferări tumorale și pentru precizarea histogenezei tumorale.



Fig. 4.5 Carcinom tiroidian papilar, varianta foliculară.– Colorație Hematoxilină & Eozină, mărire de: 25x, 50X, 100x și 200x.



Fig. 4.6 Nodul adenomatos – Colorație Hematoxilină & Eozină, mărire originală 25x, 50x, 100x și 200x

De asemenea, au fost abordate și cazuri dificile, care au necesitat teste imunohistochimice pentru confirmarea diagnosticului (gușă tiroidiană polinodulară anizofoliculară cu nodul adenomatos cu celule oxifile – figura 4.14, carcinom tiroidian papilar, varianta foliculară, cu celularitate de tip oxifil – figura 4.19) și pentru a face un diagnostic diferențial cu alte tipuri histopatologice de proliferări tumorale sau pentru decelarea unor tumori de coliziune carcinom tiroidian medular asociat cu un carcinom papilar tiroidian convențional – situate la nivelul unui singur lob tiroidian (figurile 4.29 și 4.33)



Fig. 4.14 Nodul adenomatos tiroidian, complet încapsulat, parenchim adiacent comprimat de proliferarea tumorală încapsulată intraparenchimatoasă – mărire originală 10x(vedere de ansamblu) – colorație Hematoxilină & Eozină (sus - stânga) și teste *imunohistochimice cu diferiți markeri specifici:* TTF1 (sus - dreapta), TGB (jos - stânga), Ki67 (jos - dreapta).



Fig. 4.19 Nodulul intraparenchimatos tiroidian suspect pentru un carcinom tiroidian papilar – varianta foliculară, cu celularitate de tip oxifil – mărire originală 10x (vedere de ansamblu) – colorație Hematoxilină-Eozină (sus - stânga) și teste imunohistochimice cu diferiți markeri specifici: CK19 (sus - dreapta), TGB (jos stânga), Ki67(jos - dreapta)



Fig. 4.29. Tumora de coliziune – Colorație Hematoxilină-Eozină - mărire originală 10x



Fig. 4.33 Carcinom tiroidian medular – mărire originală 10x, 25x, 50x și 100x -Celule tumorale și epiteliul folicular conservat au arătat pozitivitate puternică pentru markerul imunohistochimic TTF1.

4.2. Cercetări realizate prin utilizarea microscopiei confocale cu baleiaj laser (CLSM – Confocal Laser Scanning Microscopy)

În acest caz imaginile au fost achiziționate pe probe marcate (colorate) și fluorescența provine de la Eozină. Astfel că semnalul de la probă are o specificitate scăzută, provenind de la structuri marcate cu Eozină (de exemplu colagenul, dar și alte structuri – figurile 4.59 și 4.58)





Fig. 4.59 Imagini de microscopie confocală în modul fluorescență (stânga) și reflexie (dreapta) achiziționată pe capsula unui nodul malign (PTC). Din analiza imaginii de reflexie se observă că este greu de interpretat.



Fig. 4.58. Imagine în microscopie confocală în modul fluorescență în care sunt vizibile atât capsula glandei tiroide (săgeată albă), cât și capsula unui nodul malign (săgeata albastră) – stânga, în comparație cu aceeși regiune investigată cu ajutorul microscopiei optice -dreapta.

Am considerat că nu este specific acest mod de vizualizare a capsule și nu pare să fie util pentru investigații.

4.3. Cercetări realizate prin utilizarea microscopiei cu baleiaj laser bazată pe fluorescența generată de excitația cu doi fotoni (TPEF – Two Photon Excited Fluorescence)

Și în acest caz probele sunt marcate (colorate), însă avantajul acestei metode este că poate fi obținută în paralel cu generarea armonicii a doua și poate arăta distribuția colagenului în țesut, fie marcat și atunci vedem Eozina, fie nemarcat și atunci vedem structurile autofluorescente la lungimea de undă folosită, de exemplu colagenul este autofluorescent în ultraviolet. (figurile 4.70 și 4.72)





Fig. 4.70. Imagini în microscopie cu fluorescență cu excitație cu doi fotoni pe capsula nodulilor tiroidieni benigni.



Fig. 4.72 Imagini în microscopie cu fluorescență cu excitație cu doi fotoni pe capsula nodulilor maligni.

4.4. Studii utilizând microscopia cu baleiaj laser bazată pe generarea armonicii a doua

Am imaginat și conceput o procedură de extragere de informații cantitative referitoare la orientarea colagenului în probe de țesut tiroidian. Procedura a fost testată pe capsule de noduli maligni și benigni tiroidieni pentru diferențierea obiectivă a acestora în cinci studii de cercetare.

În **STUDIUL NR.1** - am avut ca SCOP comparația între capsula nodulilor maligni (PTC) și benigni (FA), folosind ca METODĂ: analiza cantitativă a imaginlor SHG utilizând transformata Fourier rapidă (FFT).

Plecând de la o imagine SHG achiziționată pe capsula unui nodul PTC, respectiv FA am extras spectrul Fourier bidimensional (spectrul 2D FFT) și l-am fitat cu o elipsă, unde S este axa mică și L este axa mare) și am calculat un indice de orientare a colagenului, bazat pe raportul celor două axe (N = 1 - S/L), astfel orientarea colagenului poate fi reprezentată de un indice variind de la 0 (fibre aleatorii) la 1 (fibre perfect aliniate).

Am achiziționat imagini cu microscopia bazată pe generarea armonicii a doua (Figurile 4.77 și 4.78) care au fost folosite pentru a evalua orientarea colagenului nodulilor tiroidieni capsulari tumorali diagnosticați anterior ca benigni sau maligni prin colorarea convențională cu Hematoxilină & Eozină.



Fig. 4.77 Capsulă nodul benign (imagini achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua)



Fig. 4.78. Capsulă nodul malign (imagini achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua)

Am calculat spectrele FFT pentru imaginile achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua pentru patologiile avute în vedere (Figura 4.79)



Fig. 4.79 Spectrele FFT pentru imaginile SHG achiziționate pe capsula nodulului benign (adenom folicular) (stânga) și pe capsula nodulului malign (carcinom papilar tiroidian) (dreapta)

Se poate observa în Figura 4.79 că orientarea medie a colagenului (N) calculată din spectrul FFT este mai mare pentru capsula de carcinom papilar tiroidian (N = 0,69), decât pentru capsula de adenom folicular (N = 0,4). Spectrele FFT au fost calculate pentru întreaga imagine. Am considerat că, dacă spectrele sunt calculate pentru regiunile mai mici de interes, se poate obține o distribuție a valorilor, în funcție de gradul de aliniere pentru fibrele de colagen din regiunile de interes avute în vedere. În medie, pe o suprafață mai mare, care reprezintă, de asemenea, cazul întregii zone analizate, aceasta duce la un N mai mic. Chiar dacă N a fost calculat pe imagini întregi, rezultatele obținute arată o diferență în organizarea colagenului între cele două capsule.

În **STUDIUL NR.2** - am avut același SCOP: diagnosticul diferențial între capsula nodulilor maligni (PTC) și benigni (FA), folosind ca METODĂ: un set extins de 18 parametrii cantitativi extrasi din imaginile SHG.

Am comparat aceeași arie capsulară (Figura 4.86) ale celor 2 tipuri de microfotografii (cu microscopul optic, respectiv prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua)



Fig. 4.86 Imagini de microscopie optică (rândul de sus) pe secțiuni de țesut colorate cu Hematoxilină & Eozină și imagini achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua (rândul de jos) pentru zone reprezentative pentru capsula glandei tiroide, a capsulei unui nodul benign (adenom folicular) și respectiv malign (carcinom papilar tiroidian).

O analiză calitativă a țesuturilor și capsulelor investigate a arătat o diferență între caspulele nodulilor maligni și a celor benigni, lucru neidentificabil pe imaginile achiziționate cu microscopia optică convențională pe secțiuni colorate cu Hematoxilină & Eozină (Figura 4.86). Astfel, am identificat o structura ondulată a colagenului în capsula glandei tiroide care ar permite deformarea și creșterea normală a țesutului, oferind în același timp rezistență la deformare. O structură morfologică similară se poate observa și în capsulele de noduli benigni (adenom folicular).



Fig. 4.87 Imagini achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua pe capsula tiroidiană (stânga), capsulă de adenom folicular (mijloc) și capsulă de carcinom papilar tiroidian (dreapta)

Analiza vizuală comparativă din Figura 4.87 a imaginilor achiziționate prin generarea armonicii a doua pentru capsula normală a glandei tiroide și a nodulului benign dezvăluie fibrele de colagen înfășurate, structură a colagenului care este în concordanță cu rapoartele privind fibrele de colagen în țesutul mamar care permit o deformare normală a țesutului [10]. Pe de altă parte, diferențele mari, semnificative, sunt observate în cazul distribuirii colagenului pentru capsula care

înconjoară un nodul malign. În acest caz, în imaginea achiziționată prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua se observă o structură de colagen foarte bine direcționată și organizată, cu fibre drepte.

Acest lucru poate fi explicat prin extinderea extensivă a fibrelor de colagen datorită creșterii rapide a nodulului malign sau o reorganizare ale acestora ca un mecanism de apărare împotriva expansiunii și a infiltrării tumorale, o reacție asemănătoare cu cea a reacției dezmoplazice peritumorale.

S-au făcut măsurători ultrastructurale la nivelul fibrelor de colagen capsulare cu mai mulți parametri cantitativi pe imaginile achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua:

-		Parametru	Abreviație
Analiza histogramei		Medie	MedieSHG
		Abatere standard	Hist-StDev
		Indice de asimetrie	Hist-Skew
		Indice de aplatizare	Hist-Kurt
Alternative	e la estimare	Raportul dintre numărul de pixeli cu valori pes	TC-ratio
colagenulu	ii	un prag și numărul total de pixeli	
		Valoarea medie a SHG în zone semnificative	S-mean
Matricea de corelație		Contrast	Contr
nivelurilor de gri		Inverse Difference Moment	IDM
		Angular Second Moment	ASM
		Entropie	Ent
		Corelație	Corr
Analiză	pe imagini binar	Dimensiune fractală	FD-bin
fractală		Lacunaaritate	Lac-bin
	pe imagini în sca	Dimensiune fractală	FD-gray
	gri	Lacunaritate	Lac-gray
Analiză Helmholtz		Abatere standard	Helm-StDev
		Indice de asimetrie	Helm-Skew
		Indice de aplatizare	Helm-Kurt

Tabel 4.1. Parametrii utilizați pentru analiza texturii colagenului din capsule în imaginile achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua.

Distribuția fibrelor de colagen în imaginile 2D achiziționate prin microscopie SHG au fost cuantificate printr-un set de parametri descris anterior și enumerat în Tabelul 4.1.

Practic am testat capacitatea lor de a caracteriza organizarea colagenului în imaginile achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua și de a diferenția tumorile încapsulate benigne de cele maligne.



Fig. 4.88 Parametrii calculati din imaginile achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua pentru cele trei tipuri de capsule investigate. Barele de eroare verticale reprezintă intervale de incredere la 95%. Sub fiecare parametru este afișată valoarea la care s-a efectuat normarea. Diferențe statistic relevate sunt prezentate pentru fiecare parametru în parte, acolo unde este cazul (*p<0.05, **p<0.005, **p<0.0005).

Am testat eficiența parametrilor de cuantificare descriși anterior în a distinge între colagenul provenit din capsula glandei tiroide și capsule care înconjoara noduli benigni și respectiv maligni (Figura 4.88.

Entropia este o măsură a dezordinii din imagine (in acest caz). As vrea sa atrag atentia asupra faptului ca acest parametru nu a indicat diferențe statistic relevante între malign și benign pe imaginile mari, însă la nivel de imagini mici (imaginile întregi de 512 x 512 pixeli au fost împărțite în zone de 32 x 32 pixeli) pentru nodulul benign se obtin 3 distributii cu valori medii la 6.44, \sim 7 si 7.45, iar pt nodulul malign componenta cu valoare mare (7.45) dispare, indicand o ordine mai mare, care însa nu a putut fi pusa în evidență la nivel de imagini intregi, așa cum reiese din figura 4.90.



Fig.4.90. Distribuțiile parametrilor selectați calculați din seturile de imagini SHG de 32 x 32 pixeli pentru cele trei capsule investigate. Curbele negre reprezintă potrivirea Gaussiană cu media (m) și abaterea standard (e) fiind date în intrarea fiecărui grafic. La fiecare distribuție a parametrilor s-au montat un număr maxim de trei gaussieni și se prezintă cazul cu coeficientul maxim de determinare (R2 este prezentat și în inserție).

Rezultatele indică o capsulă malignă mai "ordonată", cu fibre de colagen mai alungite față de capsula malignă mai ondulată. Explicatie: modificări capsulare apărute ca un raspuns al organismului.

Rezultatele pe care le-am obținut, atat cele calitative, dar mai ales cele cantitative indică o morfologie a colagenului specifică capsulei care înconjoară nodulii maligni comparativ cu morfologia capsulei fibroase care înconjoară nodulii benigni și eventual a capsulei glandei tiroide, mai exact indică o capsulă a glandei tiroide densă și groasă, iar capsulele patologice cu o cantitate mai mica de colagen, cu o capsulă în jurul nodulului malign cu fibre de colagen mai disparate.

În **STUDIUL NR.3** am avut alt SCOP și anume identificarea precoce sau anticipată a zonei de invazie în capsula de PTC, folosind aceeași METODĂ ca în STUDIUL DE CERCETARE NR. 2: un set extins de 18 parametrii cantitativi extrasi din imaginile SHG.

Am comparat aceeași arie capsulară ale celor 2 tipuri de microfotografii (cu microscopul optic, respectiv cu microscopia bazată pe generarea armonicii a doua) (Figura 4.95):



Fig. 4.95 Imagini de microscopie optică (rândul de sus) pe secțiuni de țesut colorate cu Hematoxilină & Eozină și imagini achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua (rândul de jos) pentru zone reprezentative pentru aria capsulară invadată tumoral a nodulului malign, aria capsulară indemnă și aria capsulară alăturată zonei de invazie a aceluiași nodul studiat.

Am efectuat măsurători ultrastructurale la nivelul fibrelor de colagen capsulare cu aceeași parametri cantitativi folosiți anterior (Tabel 4.1) pe imaginile achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua.

În acest caz opt parametri calculați din imaginile achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua au furnizat diferențe semnificativ statistic între cele două zone de capsulă investigate (Figura 4.96), deci am putea descoperi o anumită zonă ce urmează să fie invadată, în cazul unei eventuale transformări a unui nodul benign.



Fig. 4.96 Parametrii calculati din imaginile SHG pentru cele 2 regiuni de capsule investigate. Barele de eroare verticale reprezintă intervalele de încredere de 95%.

Sub fiecare parametru este afișată valoarea cu care au fost normalizate. * p < 0.05, ** p < 0.01, sunt valorile p pentru diferența dintre două grupuri comparate.

Concluzie: metodele cantitative de analiză a imaginilor SHG pot oferi indicii legate de zonele de invazie înainte de a avea loc sau fără o vizualizare directă a acestora în secțiunea de țesut aflată sub investigație.

În **STUDIUL NR.4** am avut același SCOP: diagnosticul diferențial între capsula nodulilor maligni (PTC) și benigni (FA), de această data însă la nivel de pixel. Primele trei studii țin de analize pe imagini întregi (512 x 512 pixeli) SHG cu un prim pas făcut la studiul 2 de analiză pe imagini mai mici (32 x 32 pixeli), dar nu la nivel de pixel.

Am folosit ca METODĂ: microscopia SHG dependentă de polarizare (PSHG), urmată de o fitare a datelor experimentale cu un model teoretic pentru colagen redat în formula:



care arată dependența intensității armonicii a doua cu unghiul de polarizare (α), unde φ este unghiul făcut de fibra de colagen cu axa 0x, xy fiind planul imagini și E = direcția de polarizare a radiației laser.

Metoda constă în a avea un set de imagini SHG și prin fitare la nivel de pixel să se obțină: orientarea fibrelor de colagen, rapoarte de elemente ale tensorului susceptivitate de ord II și analiza statistică: medie, valoare mediana, imprastiere (StDev).

S-a încercat să se demonstreze că imagistica colagenului din capsulele nodulilor tiroidieni la diferite unghiuri de polarizare a fasciculului laser cu microscopia bazată pe generarea armonicii a doua, descrie o curbă teoretică ce poate aduce informații despre componentele nenule ale tensorului de susceptivitate de ordinul doi și orientarea fibrelor de colagen. Am utilizat această abordare, în scopul de a oferi informații suplimentare despre colagenul din capsula nodulilor tiroidieni studiați, care pot completa microscopia bazată pe generarea armonicii a doua cantitativă, bazată pe intensitate și, eventual, examenul histopatologic tradițional.

Au fost imaginate în total 10 zone: 3 pentru capsulele tiroidiene, 3 pentru capsulele PTC și 4 pentru capsulele FA. Am colectat imagini la diferite unghiuri de polarizare ale fasciculului laser între 0 și 180 grade în pași de 20 grade. Un cod personalizat Matlab adaptat [11] a fost utilizat pentru fitarea datelor experimentale într-o procedură pixel-cu-pixel cu o curbă teoretică.

Calitatea procedurii de fitare a fost cuantificată prin coeficientul de determinare R² (0 < R² < 1), o valoare mai apropiată de unitate care indică o fitare mai bună. Pentru fiecare set de date de microscopie PSHG au fost calculate trei imagini noi doar pentru acei pixeli cu o fitare bună (R²> 0,8): unghiul de orientare a colagenului (φ), o imagine pentru χ 31/ χ 15 și alta pentru χ 33/ χ 15.

 χ -urile sunt valori dintr-un tensor care caracterizează colagenul din punct de vedere al generarii armonicii a doua. Prin tensor se înțelege o matrice multidimensională care caracterizează relația între intensitatea SHG și câmpul electric al laserului de excitație – elementele din tensor χ 31, χ 33, χ 15 sunt singurele valori nenule. χ -urile rezultă din procesarea unei serii de imagini înregistrate la diferite polarizări. Prin polarizare laser se înțelege direcția de oscilație a vectorului câmp electric.

Imaginile SHG reprezentative pentru capsula glandei tiroidei, a nodulului benign și malign sunt prezentate în Figura 4.97. Analiza vizuală a imaginilor de microscopie SHG dezvăluie fibre de colagen ondulate, dezorganizate, înfășurate pentru capsula tiroidei și capsula nodulului benign, în timp ce o structură direcțională și organizată de colagen este identificată pentru capsula nodulului malign. Pentru a diferenția capsulele studiate nu sunt suficiente doar aceste observații. Pentru aceeași zonă de probă, algoritmul de diferențiere a returnat pentru fiecare pixel trei seturi de rezultate constând în unghiul de fibră în raport cu polarizarea liniară a fasciculului laser (φ) și două rapoarte ale elementelor tensorului susceptivitate nenule ($\chi_{31}/\chi_{15}, \chi_{33}/\chi_{15}$).



Fig. 4.97. Imagini cu microscopie PSHG și hărți rezultate din fitarea pixel cu pixel pentru capsula tiroidiană, capsula de nodul benign și capsula de nodul malign. (a) imaginea de intensitate a microscopiei SHG; (b) imagniea unghiului fibrei (φ) ; (c) hărți χ_{31}/χ_{15} ; (d) histograme ale imaginii χ_{31}/χ_{15} ; (e) imagini χ_{33}/χ_{15} ; (f) histograme ale imaginii χ_{33}/χ_{15} .

Valorile χ_{31}/χ_{15} și χ_{33}/χ_{15} pentru fiecare pixel din Figura 4.97 sunt afișate sub formă de hărți cu coduri de culoare în Figura 4.97 (c) și, respectiv, e). Figura 4.97 (d) și (f) arată histograme (frecvența de apariție) pentru χ_{31}/χ_{15} și χ_{33}/χ_{15} care au fost calculate pentru pixeli în toate imaginile obținute pentru capsulele studiate. Deoarece peste 90% din valorile cu R²> 0,8 sunt obținute atât pentru χ_{31}/χ_{15} cât și pentru χ_{33}/χ_{15} , între 1 și 5, histogramele apărute sunt afișate doar pentru acest interval.

	Parametru	Capsula tiroidei	Capsulă nodul benign	Capsulă nodul malign
χ ₃₁ /χ ₁₅	Valoare mod	1.303	1.042	0.989
	Media	1.31	1.26	1.24
	Deviația standard	0.47	0.44	0.44
χ ₃₃ /χ ₁₅	Valoare mod	2.035	1.903	1.856
	Media	2.21	2.15	2.03
	Deviația standard	0.67	0.6	0.6

Tabel 4.3. Valorile: mod, media și deviația standard calculate din histogramele celor două rapoarte ale elementelor tensorului susceptivitate (χ_{31}/χ_{15} , χ_{33}/χ_{15}). La calcularea histogramelor au fost luate în considerare toate imaginile achiziționate pentru cele trei capsule.

Valorile: *mod* (valoarea cea mai probabilă dintr-o imagine), *media* și *deviația standard* rezultate dintr-o singură potrivire Gaussiană la histograme sunt date în Tabelul 4.3. Valorile *mod* apropiate de l sunt obținute pentru χ_{31}/χ_{15} în caz de capsule nodulare, în timp ce o valoare mai mare este obținută pentru capsula tiroidei. Valorile medii sunt mai mari atunci când se potrivesc histogramele cu o singură potrivire Gaussiană, deoarece histogramele sunt ușor înclinate. Nu s-au observat diferențe semnificative în deviațiile standard calculate pentru cele trei capsule. Valorile *mod* χ_{33}/χ_{15} pentru capsula tiroidei sunt semnificativ mai mari decât valorile pentru capsulele nodulilor, cu o valoare puțin mai mare pentru capsula nodulară benignă.

Modificările valorilor χ_{33}/χ_{15} sunt observate între capsulele nodulilor maligni și benigni. Astfel de modificări au fost interpretate ca posibile modificări ale ultrastructurii fibrelor de colagen. O creștere a χ_{33}/χ_{15} a fost atribuită unei redistribuiri a fibrilelor și a fibrelor de colagen în volumul focal laser [11]. Prin urmare, valorile mai mari ale χ_{33}/χ_{15} și a *deviației standard* pentru capsula tiroidiană pot indica organizare aleatorie a colagenului capsular al glandei tiroide și nodulare benigne și o capsulă a nodulului malign organizată cu fibre de colagen aliniate, paralele.

Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute pentru fibrele de colagen din capsulele nodulare atunci când se utilizează microscopie SHG și analiza texturii pentru a determina organizarea colagenului în tiroida și capsulele nodulare. Deviația standard obținută pentru χ_{33}/χ_{15} la compararea histogramelor cu o singură potrivire Gaussiană este mai mare pentru capsula tiroidiană decât pentru capsulele nodulare, indicând o distribuție mai mare a valorilor, deci încă o dată o dezorganizare mai mare în distribuția colagenului. Rezultatele actuale pot părea în contradicție cu cele obținute în literatura citată anterior [11], când valorile pentru χ_{33}/χ_{15} au indicat o dezorganizare mai mare a fibrelor de colagen în cazul nodulilor maligni. Acele rezultate au fost obținute din distribuția de colagen între foliculi (în stroma tiroidiană) și în interiorul papilelor în cazul carcinomului papilar tiroidian, în timp ce rezultatele obținute în această lucrare sunt pe capsule de colagen nodular și tiroidian. În urma cercetărilor efectuate pot susține faptul că rezultatele actuale ar putea fi interpretate ca o organizare a fibrelor de colagen din capsulele care înconjoară noduli maligni ca un răspuns de apărare al organismului împotriva tumorilor maligne, și că indică la fel ca în cazul STUDIILOR DE CERCETARE ANTERIOARE o structură mai ondulată a capsulelor de colagen în cazul benign.

În **STUDIUL NR.5** - am avut același SCOP ca în studiul anterior: diagnosticul diferențial între capsula nodulilor maligni (PTC) și benigni (FA), tot la nivel de pixel, doar că pe probe provenind de la același pacient. Metodele de investigare au fost: microscopie SHG dependenta de polarizare (PSHG) urmată de fitare cu un model teoretic pentru colagen și analiza orientarii colagenului la nivel de pixel (pentru a utiliza imaginile distribuției unghiulare a fibrelor de colagen φ).

Până acum studiile au fost efectuate pe cazuri diagnosticate de la pacienți diferiți, diagnostice histopatologice, cu ajutorul microscopiei optice, de FA sau PTC. În acest studiu am selecționat cazurile la care, pe aceeași secțiune din țesutul tiroidian, am identificat prin microscopia optică convențională nodulul malign aflat printre ceilalți noduli benigni (Figura 4.98). În acest fel am încercat să elimin rezultatele parametrilor înregistrati presupuși a fi fals-pozitivi sau fals-negativi, stiind faptul că până acum am comparat noduli maligni de la un pacient cu noduli benigni de la alt pacient. Astfel am avut rezultate de pe capsulele celor două tipuri de noduli tiroidieni (maligni sau benigni) din tesut de la același pacient. Am introdus în studiu 3 cazuri (1 caz = 1 pacient) atât cu nodul malign cât și cu nodul benign - decelați pe aceeași lamă pentru a exclude variabilitatea dintre pacienți. Imaginile lamelor cu secțiunile tisulare au fost efectuate cu un sistem automat de scanare cu microscop în câmp luminos Leica APERIO LV1 ("Aperio Whole Slide Scanner, Leica Biosystems") pentru determinarea regiunilor de interes care au fost microfotografiate în continuare la microscopul PSHG. Pentru fiecare pacient, atât capsulele de nodul malign, cât și cele ale nodulilor benigni au fost cercetate și au fost achiziționate imagini pentru cel puțin 7 regiuni de interes pe tip de nodul per pacient, rezultând în total 25 regiuni de interes pe tip de nodul. Fiecare zonă de scanare PSHG a fost de 125 x 125 µm².



Figura 4.98 Lame cu secțiuni colorate cu Hematoxilină & Eozină, scanate cu un sistem automat de scanare a lamelor de microscop Leica APERIO LV1.

În figura 4.98 putem observa secțiuni prin parenchim tiroidian polinodular, anizofolicular cu mai mulți noduli adenomatoși, printre care și un nodul (microfocar) încapsulat de carcinom papilar tiroidian (marcat cu săgeată neagră).

Am luat imagini pe aceeași suprafață a probei prin microscopie TPEF și cu SHG generat înapoi, respectiv cu SHG generat înainte și am suprapus imaginile pentru a avea o mai bună vizualizare a distribuției colagenului din capsulele nodulilor benigni a nodulilor maligni și a capsulei glandei tiroide.

Am folosit aceeași metoda ca în STUDIUL NR. 4: rapoartele elementelor tensorului susceptivitate la care am adăugat încă un element de comparație și anume am încercat să găsim o modalitate de a lua în considerare și unghiul care rezultă din algoritmul utilizat (Figurile 4.108 și 4.109). Principalul dezavantaj al metodelor de calculare a orientării fibrelor de colagen folosite până acum este faptul că le lipsește o referință pentru unghiul fibrei de colagen în cazul matricei extracelulare, adică orientarea fibrei de colagen în funcție de orientarea țesutului. Aceste informații unghiulare pot fi utilizate doar pentru situații particulare, în cazul orientării fibrelor în raport cu marginile tumorii, pentru a oferi informații de diagnostic[12]. În caz contrar, informațiile la nivel de pixel furnizate de astfel de tehnici sunt pierdute, deoarece orientarea unghiulară este cuantificată doar la nivelul întregii imagini prin utilizarea distribuției valorilor unghiulare ale colagenului, cum ar fi deviația standard (de exemplu, pentru a diferenția între stadiile carcinomului pulmonar cu celule mici [14]).

De la statistici simple de prim ordin pentru valorile pixelilor, până la statistici care iau în considerare relația spațială a pixelilor vecini (de exemplu, matricea de corelație a nivelurilor de gri - GLCM) [15] sau chiar la metode mai avansate de analiză a imaginii (de exemplu, analiza fractală [16], transformata wavelet [17], transformata Hough [18]) există o multitudine de metode pentru cunatificarea la nivel de imagine întreagă care au fost folosite anterior pentru analiza distribuției de colagen. Pe de altă parte, folosind seturi de date PSHG se poate calcula factorul de anizotropie [19], gradul de polarizare liniară [20] sau parametrii Stokes [21] care sunt calculate la nivel de pixeli, pentru estimarea alinierii dipolilor moleculari în raport cu polarizarea fasciculului laser incident. O altă abordare care se referă la seturile de date PSHG necesită modele teoretice pentru fibrele de colagen [22], [23] și algoritmi de fitare diferiți pentru a determina coeficienții tensorului susceptivitate neliniară de ordinul doi ($\chi^{(2)}$) pentru colagen cu rezoluție de pixeli. Împreună cu diferite raporturi de coeficienți $\chi^{(2)}$, această metodă calculează orientarea fibrei de colagen.

Astfel am introdus un nou parametru: *Fi* definit ca distribuția unghiulară a fibrelor de colagen din imaginea achiziționată. Intensitatea culorii arată unghiuri 0-180 grade (cu cât fibra este mai ondulată în imagine cu atât variațiile de culoare sunt mai mari).(Figurile 4.108 și 4.109)



Fig. 4.108 Rezultate obținute prin metoda fitării intensității SHG în funcție de unghiul de polarizare pentru **capsula unui** nodul benign (FA - adenom folicular); de la stânga la dreapta: 1).imagini în microscopie cu generarea armonicii a doua (stânga sus BSHG - SHG generat înapoi, iar stânga jos FSHG - SHG generat înainte), 2). SD Fi - unghiul fibrelor de colagen, 3). χ 3115 - Imagine obținută din raportul elementelor tensorului susceptivitate χ 31 și χ 15, 4). χ 3315 -Imagine obținută din raportul elementelor tensorului susceptivitate χ 33 și χ 15,



Fig. 4.109 Rezultate obținute prin metoda fitării intensității SHG în funcție de unghiul de polarizare pentru **capsula unui** nodul malign (PTC – carcinom papilar tiroidian); de la stânga la dreapta: 1).imagini în microscopie cu generarea armonicii a doua (stânga sus BSHG - SHG generat înapoi, iar stânga jos FSHG - SHG generat înainte), 2). SD Fi unghiul fibrelor de colagen, 3). x3115 - Imagine obținută din raportul elementelor tensorului susceptivitate x31 și x15, 4). x3315 - Imagine obținută din raportul elementelor tensorului susceptivitate x31 și x15,

În urma achiziției de stive de imagini PSHG, s-a trecut la analiza acestora. S-a utilizat un cod Matlab personalizat [24] pentru fitarea datelor experimentale într-o procedură pixel cu pixel cu o curbă teoretică [25]. Modelul utilizat pentru dependența intensității SHG de colagen cu unghiul de polarizare de intrare poate fi scris ca:

 $I_{SHG} \sim [\chi_{15} \cdot \sin^2 2 (\alpha - \varphi) + (\chi_{31} \cdot \sin^2 2 (\alpha - \varphi) + \chi_{33} \cdot \cos^2 2 (\alpha - \varphi))^2]$ unde α este unghiul de polarizare incident al fasciculului laser, în timp ce φ este unghiul de orientare a fibrei de colagen în plan, iar χ_{15} , χ_{31} , χ_{33} sunt singurele componente nenule ale tensorului susceptivitate neliniară ($\chi^{(2)}$) sub presupunerea simetriei cilindrice a colagenului.

Folosind această procedură de fitare, am calculat pixel cu pixel trei imagini cu rapoartele elementelor tensorului susceptivitate (χ_{31}/χ_{15} , χ_{33}/χ_{15} și χ_{33}/χ_{31}), imaginea de distribuție unghiulară de colagen și imaginea coeficientului de determinare (\mathbb{R}^2).

Pentru a ține cont de distribuția colagenului într-o abordare pixel cu pixel, am folosit imaginile achiziționate prin PSHG pentru a calcula o dispersie locală a unghiurilor fibrelor de colagen. Fiecare pixel a fost înlocuit cu abaterea standard (SD) sau abaterea absolută mediană (MAD) a pixelilor vecini într-o fereastră pătrată cu latura l, unde l ia valori impare. Am considerat următoarele dimensiuni ale ferestrei: 3, 7, 15, 31 și 63. Imaginile rezultate au fost codificate SD_l și MAD_l, dacă SD și respectiv MAD au fost folosite pentru a contabiliza dispersia locală. În timp ce SD și MAD sunt ambele măsuri de dispersie statistică a unui set de valori, MAD este definită ca mediana abaterilor absolute de la mediană și este mai puțin sensibilă la valori extreme decât SD. Dacă setul de date a fost normal distribuit, SD este de obicei cea mai bună alegere pentru evaluarea răspândirii. Cu toate acestea, dacă datele nu sunt normal distribuite, MAD este măsura mai robustă de utilizat.



Fig. 4.110. Capsule care înconjoară noduli FA și PTC în microscopie PSHG. Primul rând reprezintă imaginile de intensitate SHG (medie a tuturor stărilor de polarizare de intrare) cu canalele verzi și albastre care ilustrează BSHG și respectiv FSHG, suprapuse peste semnalul TPEF din canalul roșu. χ_{31}/χ_{15} , χ_{33}/χ_{15} și χ_{33}/χ_{31} sunt imagini obținute din algoritmul de fitare cu rapoartele elementelor tensorului susceptivitate calculate pentru fiecare pixel din imagini (imagini cu capsulă de nodul FA achiziționate în configurațiile BSHG (a) și respectiv FSHG (b); imagini cu capsule de nodul PTC achiziționate în configurațiile BSHG (c) și respectiv FSHG (d))

Un număr de 14 imagini diferite au fost calculate pentru fiecare stivă de imagini PSHG atât

pentru direcții de colectare înainte, cât și înapoi: trei imagini χ (2), imagini φ , SD_l și imagini MAD_l pentru cinci valori l diferite. Un alt set de 14 imagini a fost obținut luând în considerare numai pixeli cu R2> 0,8 după procedura de fitare.

Seturile de date PSHG au fost achiziționate pe regiunile de interes care conțin capsule atât ale nodulilor maligni (noduli de carcinom papilar tiroidian- PTC), cât și ale nodulilor benigni (adenom folicular – FA). Exemple de imagini din capsule de colagen care înconjoară atât noduli maligni, cât și benigni sunt prezentate în Figura 4.110. Rapoartele elementelor tensorului susceptivitate au fost calculate pentru seturile de date PSHG rezultând trei noi imagini pe fiecare regiune de interes (Figura 4.110).

Am efectuat o analiză la nivel de pixeli pe imaginile raporturilor elementelor tensorului susceptivitate $\chi^{(2)}$. Pentru analiza statistică a distribuției valorilor de pixeli pentru cele trei tipuri de imagini, am testat mai întâi normalitatea probelor de pixeli. Deoarece a eșuat testul de normalitate, care poate fi observat vizual și din Fig. 2.104, toată distribuția fiind înclinată pozitiv, am efectuat o analiză statistică non-parametrică folosind testul Mann-Whitney. În timp ce pentru imaginile BSHG, χ_{31}/χ_{15} nu a returnat diferențe relevant statistic între capsulele nodulare PTC și FA, celelalte două rapoarte pentru BSHG și toate cele trei în cazul imaginilor FSHG au arătat valori semnificative statistic în cazul capsulelor nodulare benigne (FA), comparativ cu cele maligne (PTC). S-a arătat anterior că χ_{33}/χ_{31} este reprezentativ pentru anisotropia locală a eșantionului la nivel de pixeli [26]. În același timp, deoarece valoarea minimă în dependența de polarizare a intensității SHG este Imin ~ $(\chi_{31}/\chi_{15})^2$, χ_{31}/χ_{15} poate fi, de asemenea, conectată cu anisotropia locală. O creștere a ambelor valori poate fi explicată printr-o scădere a anisotropiei locale în cazul capsulelor nodulare benigne (adenom folicular – FA), comparativ cu cele maligne (carcinom papilar tiroidian – PTC). Acest rezultat la nivel de pixeli este în concordanță cu rezultatele anterioare[6] unde analiza texturii pe imagini de intensitate SHG a relevat fibre de colagen organizate aleator în capsulele nodulului benign și o capsulă organizată, cu fibre de colagen aliniate paralel în cazul capsulei nodulului malign.

Chiar dacă valorile rapoartelor elementelor $\chi^{(2)}$ au furnizat diferențe relevante statistic în cinci din cele șase situații luate în considerare, acești parametri singuri nu au aproape nici o capacitate de discriminare între capsulele de noduli maligni și benigni, deoarece ASC este mai mică decât 0,6 (Fig. 4.111).



Fig. 4.111. Analiza statistică a raporturilor elementelor $\chi^{(2)}$ calculate pentru fiecare pixel din seturile de date PSHG din (a) configurația BSHG și (b) configurația FSHG. Inserarea din fiecare grafic furnizează valorile ASC ca măsură a capacității de discriminare a fiecărui raport între capsulele PTC și FA. (ns p> 0,05; *p <0,05; *p <0,01; **** p <0,001; **** p <0,001).

Am cercetat și distribuția unghiulară a colagenului în capsulele nodulilor tiroidieni selectați pentru studiu. Valorile medii sau mediane ale unghiului de orientare în plan φ depind de orientarea

eșantionului și astfel nu pot furniza informații utile. Pe de altă parte, măsurile de distribuție a unghiului de orientare, cum ar fi deviația standard (SD) și abaterea absolută mediană (MAD) au fost extrase din imagini întregi pentru a cuantifica morfologia fibrelor de colagen din probă.

După cum se poate observa în Fig.4.112, ambele valori SD și MAD pentru capsulele care înconjoară nodulii maligni (PTC) sunt mai mici decât pentru capsulele nodulilor benigni (FA), ceea ce indică faptul că fibrele de colagenul sunt mai puțin ondulate în capsulele nodulilor maligni. Acest lucru este vizibil și din imaginile de intensitate SHG din Fig. 4.111 și este în acord cu rezultatele prezentate anterior. Deși diferența între capsulele care înconjoară nodulii maligni (PTC) și benigni (FA) nu este semnificativă statistic pentru SD din imaginile BSHG, există diferențe semnificativ statistice între distribuțiile de fibre de colagen ale capsulelor care înconjoară nodulii maligni (PTC) și benigni (FA) cuantificate de MAD. O posibilă explicație ar fi faptul că MAD este mai puțin sensibilă la valori extreme decât SD, confirmată și de valorile MAD mai mici. O posibilă sursă de astfel de valori în φ imagini poate veni de la faptul că intervalul în care pixelii au valori este (0- 180°), mai precis de la pixelii adiacenți unde a avut loc tranziția de la 0 la 180°.



Fig. 4.112. Distribuția unghiulară a colagenului estimată pe seturi de date PSHG întregi din imagini φ folosind valori diferite: abatere standard (SD) și deviație absolută mediană (MAD) în configurația (a) BSHG și (b) configurația FSHG (ns p > 0.05; *p < 0.05; *p < 0.01; ****p < 0.001; ****p < 0.001).

Deoarece algoritmul de fitare a datelor PSHG calculează orientarea colagenului în fiecare pixel, informațiile sunt pierdute doar luând în considerare măsuri ale distribuției de orientare din imagini întregi. Ținând cont de acest aspect, am calculat distribuții locale de orientare a colagenului pixel cu pixel folosind atât SD cât și MAD pentru a cuantifica distribuția de fibre. Având în vedere această procedură, s-au obținut imagini cu orientarea locală a colagenului (fig. 4.113) în funcție de fereastra de calcul pentru distribuție (imagini SD 1 și MAD_l, unde l este dimensiunea ferestrei).



Fig. 4.113. Imagistica de distribuție a orientării colagenului din seturile de date PSHG. Aceleași regiuni de interes ca în Figura 2.103. sunt considerate atât pentru capsulele nodulare maligne (PTC), cât și pentru cele benigne (FA). Primul rând reprezintă distribuția unghiulară a colagenului (φ), calculată din algoritmul de fitare. Imagini SD_l și MAD_l cu SD / MAD cu dimensiuni ale fereastrei de calcul l = 3, 15 și 63 pixeli sunt afișate pentru comparație. Imaginile cu capsulă de nodul benign (FA) dobândite în configurațiile BSHG (a) și respectiv FSHG (b); Imaginile cu capsule de nodule PTC dobândite în configurațiile BSHG (c) și respectiv FSHG (d).

Testul de corelatie liniară Pearson a arătat o corelatie moderată între valorile SD si MAD pentru cazul BSHG (0,62 pentru o fereastră de calcul SD / MAD de 3 x 3 pixeli) și o corelație mai slabă pentru FSHG (0,4 pentru fereastra de calcul 3 x 3). Pentru ambele configurații de colecție SHG, corelația dintre SD și MAD crește cu fereastra de calcul. De exemplu, pentru fereastra de 63 x 63 pixeli, cei doi parametri au fost puternic corelati în cazul capsulelor benigne ale nodulului (0.9 pentru BSHG și 0,8 pentru FSHG) și moderat corelate pentru capsulele maligne ale nodulului (0,7 pentru BSHG si 0,62 pentru FSHG). Mărirea ferestrei de calcul atât pentru SD cât si pentru MAD, duce la un număr crescut de pixeli considerat de la un maxim de 9 pixeli în fereastra 3 x 3 până la aproape 4000 pentru fereastra 63 x 63. Este mai probabil ca valorile pixelilor dintr-un esantion mai larg să fie mai apropiate de o distribuție normală (mai puține valori); de aici și o corelație mai puternică între SD și MAD cu dimensiunea ferestrelor crescută. O corelație mai puternică între SD și MAD pentru capsula benignă decât pentru capsula malignă sugerează că distribuția de orientare este mai aproape de o distribuție normală. Aceste rezultate sunt determinate de ondularea distribuției colagenului, cu un grad mai mare de dezorganizare pentru capsula nodulară benignă. Presupunerea anterioară de normalitate pentru distributiile de orientare este confirmată prin calcularea unei regresii liniare simple între seturile de date SD și MAD. Am obținut o pantă de 1.403, aproape de valoarea teoretică a b = 1.4826 pentru o distributie normală.

Am efectuat analize statistice la nivel de pixeli cu probe de pixeli din imaginile SD / MAD.

Pentru analiza statistică a distribuției valorilor de pixeli pentru cele cinci tipuri de imagine pentru fiecare configurație de colecție SHG, am testat mai întâi normalitatea eșantioanelor de pixeli. Deoarece au eșuat testul de normalitate, care poate fi observat vizual și din Fig. 4.114, toată distribuția fiind înclinată pozitiv, am efectuat analize statistice non-parametrice folosind testul Mann-Whitney.

Pentru imaginile FSHG, toate imaginile obținute pentru diferite dimensiuni ale ferestrei de calcul SD / MAD indică valori mai relevante statistic în cazul capsulelor nodulilor benigni (FA), comparativ cu capsulele de noduli maligni (PTC). Rezultatele sunt similare pentru imaginile BSHG, cu excepția celei mai mici ferestre de calcul pe care le-am considerat (l = 3). Aceste rezultate la nivel de pixeli confirmă rezultatele anterioare pe imagini întregi și indică faptul că distribuția locală a colagenului este aceeași cu distribuția imaginii întregi, cu o ondulare diferită a colagenului între capsulele nodulare maligne (PTC) și benigne (FA).



Fig. 4.114. Parametri statistici extrași din analiza de orientare la nivel de pixel a colagenului în capsulele PTC și FA. Atât imaginile SD_l cât și MAD_l sunt luate în considerare cu dimensiunea ferestrei de calcul l = 3, 7, 15, 31 și 63 de pixeli pentru a fi comparate în (a) seturi de date BSHG și (b) seturi de date FSHG. (ns p> 0,05; * p <0,05; ** p <0,01; **** p <0,001; **** p <0,0001)

Toate seturile de date de pixeli SD / MAD au furnizat diferențe relevante statistic între capsulele PTC și FA nodul. În ciuda acestora, pentru ferestrele de calcul SD / MAD scăzute (l = 3, 7) nu există aproape nici o capacitate de discriminare între capsule maligne și benigne, deoarece ASC este mai mică decât 0,6 (se introduce în Fig. 4.114). Pe măsură ce dimensiunea ferestrei crește capacitatea de discriminare crește, de asemenea, cu cele mai mari valori obținute pentru imaginile MAD și FSHG. Pentru aproape toate situațiile luate în considerare (cu excepția l = 3 din imaginile BSHG) MAD dovedește o mai bună capacitate de diferențiere față de SD în cazul capsulelor de noduli maligni (PTC), comparativ cu capsulele nodulilor benigni (FA).

Analiza texturii a fost realizată pe imaginea φ , cele trei imagini ale raportului elementelor tensorului de susceptivitate $\chi^{(2)}$, cele cinci imagini MAD și cinci SD pentru ambele configurații BSHG și FSHG. În același timp, am calculat imagini care păstrează doar pixeli care corespund R2> 0,8, exact cum se obține din algoritmul de fitare. Imaginile cu intensitate SHG nu au fost luate în

considerare, deoarece analiza texturii imaginilor SHG de intensitate întreagă a fost prezentată în STUDIUL NR. 2, descris anterior.

Capitolul 5 - Concluzii

Investigațiile prezentate în această teză s-au concentrat pe studierea probelor biologice cu țesut patologic tiroidian folosind tehnici microscopice cu baleiaj al fasciculului laser.

Această temă de cercetare abordează un subiect sensibil al patologiei tiroidiene și anume elaborarea unui diagnostic histopatologic cât mai exact al nodulilor tiroidieni încapsulați, cunoscut fiind faptul că medicul anatomopatolog se confruntă frecvent cu lipsa vizualizării totale la microscopul optic, a capsulei tiroidiene ce delimitează nodulul tumoral de parenchimul tiroidian adiacent indemn.

Importanța rezultatelor obținute se datorează colaborării interdisciplinare și aplicării consecvente a unui standard de lucru în cadrul tuturor experimentelor din această lucrare. Din imaginile achiziționate pe capsula nodulilor tiroidieni și a glandei tiroide au fost calculați parametrii cantitativi la nivel de pixel dar și de imagnie, fapt ce a permis analiza colagenului din componența capsulelor. S-au obținut rezultate statistic relevante în urma comparării modificărilor structurale și a distribuției fibrelor de colagen.

Aceste rezultate sugerează, pentru prima dată în literatura de specialitate, faptul că unii noduli tumorali tiroidieni pot fi diferențiați și prin studierea capsulei lor, fără a avea nevoie de morfologia celulară tumorală, element indispensabil în elaborarea diagnosticului histopatologic al anumitor leziuni tumorale nodulare încapsulate.

5.1. Rezultate obținute

Am abordat mai multe tehnici optice de microscopie cum ar fi microscopia confocală, microscopia de baleiaj laser bazată pe fluorescența generată de excitația cu doi fotoni (TPEF), microscopia de baleiaj laser bazată pe generarea armonicii a doua (SHG) și microscopia de baleiaj laser bazată pe generarea armonicii a doua dependentă de polarizarea radiației laser de excitație (PSHG) pentru a observa eventuale modificări capsulare neidentificabile cu microscopia optică clasică tradițională, cu scopul de a diferenția nodulii tumorali aparent încapsulați benigni și maligni.

În microscopia optică clasică, s-au achiziționat microfotografii din cazurile selecționate pentru cercetare, precum și pentru cazuri dificile, la care pentru un diagnostic histopatologic final au fost necesare teste IHC, elaborându-se la fiecare caz exemplificat diagnosticul histopatologic în urma examenului microscopic, respectiv elaborarea unui diagnostic histopatologic complet pe colorația standard Hematoxilină & Eozină corelat cu testele IHC.

În microscopia confocală în modul fluorescență imaginile au putut fi interpretabile, în sensul că am putut decela capsula ce înconjoară nodulul tumoral, capsula glandei tiroide și structurile compatibile cu cele ale foliculilor tiroidieni din interiorul nodulului tumoral, dar și din parenchimul tiroidian adiacent, dar fără a putea face un diagnostic diferențial între caracterul normal, benign sau malign al acestora, neaducând informații suplimentare față de microscopia de fluorescență convențională.

În microscopia confocală de reflexie, imaginile au fost greu de interpretat, deoarece nu am avut contrast în imagine.

Microscopia TPEF a permis obținerea unor imagini de ansamblu ale țesutului tiroidian, deoarece fluorescența are avantajul că poate da o imagine globală, arătând și alte structuri tisulare în

afara colagenului evidențiat de microscopia SHG. Imaginile achiziționate prin microscopia TPEF și cu microscopia SHG le-am studiat separat, dar și suprapuse pentru a cumula informațiile furnizate pe de-o parte de fluorescență, iar pe de altă parte, conform naturii neliniare a generării armonice, prin obținerea unei rezoluții tridimensionale (imagini 3D);

În **studiul nr. 1** am folosit analiza prin transformata Fourier rapidă (FFT) a imaginilor achiziționate prin generarea armonicii a doua pentru capsula nodulului de malign - PTC și nodulului benign - FA. Și în acest caz am decelat rezultate semnificativ statistice. Orientarea medie a colagenului (N) calculată din spectrul FFT este mai mare pentru capsula de FA (N = 0,69), decât pentru capsula de PTC (N = 0,4). Spectrele FFT au fost calculate pentru întreaga imagine. Am considerat că, dacă spectrele sunt calculate pentru regiunile mai mici de interes, se poate obține o distribuție a valorilor, în funcție de gradul de aliniere pentru fibrele de colagen din regiunile de interes avute în vedere. În medie, pe o suprafață mai mare, care reprezintă, de asemenea, cazul întregii zone analizate, aceasta duce la un N mai mic. Chiar dacă N a fost calculat pe imagini întregi, rezultatele obținute arată o diferență în organizarea colagenului între cele două tipuri capsulare.

Microscopia SHG este metoda cea mai performantă, deoarece pe lângă semnalul imagistic mai bun decât în cazul imagisticii de fluorescență, este foarte sensibil la informații structurale ale probei examinate, în cazul nostru colagenul asupra căruia putem analiza modificări cantitative folosind diferiți parametrii din 4 metode de analiză texturală a unei imagini (histograma imaginii, analiza "Matricea de corelație a nivelurilor de gri" (GLCM), analiza fractală și analiza Helmholtz), utilizați începând cu **studiul nr.2**.

Intensitățile de pixeli ale parametrului "MedieSHG" - (medie), au fost mai mici obținute atât pentru capsulele FA, cât și pentru PTC, cu diferențe semnificativ statistic în ceea ce privește capsula tiroidei. Acestea sunt o indicație a unui semnal SHG mai mic în cele două stări patologice studiate, fie datorită scăderii densității colagenului, fie unei scăderi a semnalului SHG pe fibre de colagen individuale, sau ambele. Calculând alți doi parametri, și anume "TC-ratio" (raportul dintre numărul de pixeli cu valori peste un prag și numărul total de pixeli) și "S-mean" (valoarea medie a SHG în zone semnificative) am încercat să răspundem la această întrebare. "TC-ratio" estimează suprafața totală a colagenului dintr-o imagine SHG și contabilizează doar modificările densității colagenului. Pentru acest parametru a fost obținută o scădere semnificativ statistic între capsula tiroidă și ambele capsule nodulare patologice. Acest rezultat este în concordantă cu capsula mai subtire în cazul nodulului benign și cu densitatea mai mică a fibrelor de colagen pentru capsula PTC, fără să poată face distincția între ele. Pe de altă parte, "S-mean", care ar arăta modificări ale intensității pixelilor numai pe zonele acoperite de colagen, indică o scădere semnificativ statistic a semnalului SHG atunci când se compară capsula tiroidei cu capsula nodulului PTC. Valoarea mai mică a "S-mean", poate apărea din cauza reorganizării fibrelor de colagen, fie prin pierderea cristalinității sau la o tulburare mai mare în volumul focal.

Parametrul "Hist-StDev" (abatere standard) a fost utilizat pentru a cuantifica cantitatea de dispersie a setului de date. De obicei, o abatere standard mai mică a unei distribuții a intensității pixelilor este un semn al unei imagini mai clare, ceea ce în cazul nostru ar putea indica o distribuție mai răspândită a fibrelor individuale de colagen. Aceasta este situația capsulei nodulului PTC care are o abatere standard - "Hist-StDev" mai scăzută semnificativ statistic decât capsula tiroidei.

În ceea ce privește parametrul "Hist-Skew" (indicele de asimetrie), toate cele trei distribuții sunt puternic pozitive. O valoare mai mare pentru acest parametru arată o imagine mai întunecată, prin urmare, intensitatea semnalului SHG pe colagen este mai mică sau o densitate mai mică de colagen în zona imagistică. Valoarea mai mare a parametrului "Hist-Skew" pentru capsula PTC este

în concordanță cu observarea fibrelor de colagen mai subțiri și mai dispersate în interiorul capsulei PTC.

Toate cele trei distribuții studiate au avut parametrul "Hist-Kurt" (indicele de aplatizare), înalt pozitiv. Am observat o creștere semnificativă din punct de vedere statistic atât din capsula tiroidei, cât și din capsula nodulului FA până la capsula nodulului PTC care indică faptul că distribuția pixelilor sunt mai aproape de medie decât pentru o distribuție normală, și o mică parte a variației este cauzată de abateri extreme rare.

Un nivel inferior al parametrului "Hist-StDev" (abatere standard), corelat cu un nivel superior al parametrului "Hist-Kurt" (indicele de aplatizare), indică o distribuție mai restrânsă a valorilor de pixeli în jurul valorii medii și în ceea ce privește "Hist-StDev", indică caracteristici mai clare referitor la distribuția fibrei de colagen din imagine.

Avantajul utilizării parametrilor de formă de distribuție, cum ar fi parametrii "Hist-Skew" (indicele de asimetrie), și "Hist-Kurt" (indicele de aplatizare), constă în faptul că sunt independenți de intensitate și sunt astfel mai robuști pentru a caracteriza trăsăturile structurale ale colagenului capsular.

In timp ce parametrii statistici de prim ordin calculați folosind histograma imaginii sunt direct legați de distribuția nivelului de gri în imagine, parametrii statistici de ordinul II depind de aranjamentele spațiale și corelarea intensităților între pixeli.

Parametrul de contrast ("Contr") este asociat cu diferența medie de gri între pixelii vecini și cuantifică distribuția heterogenă a colagenului prezent în imagine. Un contrast ("Contr") mai mare indică imagini foarte contrastate, care pot fi asociate cu caracteristici care sunt distribuite fără o aliniere preferențială. Un contrast ("Contr") semnificativ statistic mai mare a fost obținut pentru capsula tiroidei, decât pentru capsula PTC, care poate fi explicată prin prezența fibrelor de colagen aliniate în capsula PTC.

Parametrul "IDM" - "Inverse Difference Moment" (omogenitatea sau momentul diferenței inverse) cuantifică asemănările locale din imaginea SHG și din experimentul nostru, deși "Contr" și "IDM" sunt invers corelate, "IDM" este capabil să ofere diferențe semnificativ statistic între capsulele de noduli benigni și maligni, în timp ce "Contr" nu este capabil.

Parametrul "ASM" - "Angular Second Moment" (energia sau al doilea moment unghiular) detectează tulburări în texturi, atingând o valoare maximă egală cu cea care apare atunci când distribuția nivelului de gri este omogenă. Valorile mai mici ale "ASM" se datorează unui număr mai mare de intrări mici în "Matricea de corelație a nivelurilor de gri" (GLCM - "Gray Level Co-occurrence Matrix") și sunt o indicație a imaginilor heterogene, în cazul nostru distribuții de colagen mai puțin omogene. "ASM" este singurul parametru care reflectă o creștere semnificativ statistic de la valoarea corespunzătoare capsulei tiroidiene, apoi capsula nodulului FA și în final capsula nodulului PTC, indicând o creștere a omogenității colagenului.

O entropie ("Ent") mai mare indică o textură a imaginii mai complexă, ca și în cazul contrastului "Contr" și "IDM", deși "ASM" și entropia ("Ent") sunt invers corelate, "ASM" este capabil să ofere diferențe semnificativ statistic între cele trei clase considerate, în timp ce entropia ("Ent") nu este.

Parametrul statistic corelație ("Corr") este o măsură a dependențelor liniare ale nivelurilor de gri din imagine. Toate cele trei capsule studiate au returnat valori mici de corelație. Deoarece o corelație ("Corr") scăzută înseamnă, în general, niveluri de gri adiacente independente, în imagine nu se poate identifica un model regulat semnificativ.

Pentru a folosi capacitatea parametrului de corelație ("Corr") în a detecta tiparele obișnuite într-o imagine am comparat valorile corelației ("Corr") ale "Matricei de corelație a nivelurilor de gri" (GLCM) la diferite distanțe de pixeli și am potrivit dependența corelație-distanță (dependența acesteia cu distanța între pixeli) cu o curbă exponențială pentru a calcula rata de scădere a acesteia. Cantitativ, corelația ("Corr") pentru capsula PTC a scăzut cu o pantă mai abruptă care sugerează fibre liniare distincte, în timp ce pentru capsula FA corelația a rămas ridicată pe măsură ce distanța de pixeli a crescut, ceea ce sugerează o structură fibroasă de colagen mai dezorganizată.

Analiza fractală a fost calculată atât pe imagini în scală gri (parametrii "FD-grey" și "Lacgrey") cât și pe imagini binare (parametrii "FD-bin" și "Lac-bin") obținute după pragul de imagine. Deși analiza binară este cea mai utilizată, unul dintre dezavantajele sale (de exemplu, nevoia unui prag pentru binarizarea imaginii) a fost întâlnit și în cazul nostru. Nici unul dintre parametrii "FDbin" și "Lac-bin" nu au putut detecta diferențe semnificative între capsulele nodulilor maligni și benigni. O posibilă explicație este că pentru imaginea binară, parametrul "FD-bin" a oferit informații despre textura marginilor din imaginea binară, mai degrabă decât textura distribuției de colagen, ceea ce este cazul într-un studiu anterior care a abordat investigațiile pe membrana celulelor tumorale. Pe de altă parte, am considerat că imaginile la nivel de gri sunt mai potrivite pentru analiza fractală atunci când determinăm textura distribuției colagenului. Parametrul "FD-grey" a arătat o scădere semnificativă a complexității capsulei nodulului PTC în comparație atât cu cea a glandei tiroide, cât și cu capsula nodulului FA. Parametrul "Lac-grey" crește pentru capsula nodulilor tumorali, cu o valoare mai mare pentru noduli maligni, un rezultat care este în concordanță cu cele obținute pentru parametrii "TC-ratio" și "S-mean" discutați anterior.

Valori semnificativ statistice au fost înregistrate și pentru parametrii folosiți în cadrul analizei Helmholtz. În cazul capsulei glandei tiroide parametrul "Helm-StDev" (abatere standard) mai mare, asociat cu parametrul "Helm-Skew" (indice de asimetrie) moderat crescut ("Helm-Skew" = 1,12), iar pentru capsulele nodulare distribuțiile aproximativ simetrice ("Helm-Skew" < 0,5) și "Helm-Kurt" semnificativ mai scăzut, indică o valoare mai mare a dispersiei în distribuția de colagen cu o valoare semnificativ mai mare pentru capsula PTC. Acest rezultat este în concordanță cu o posibilă reorganizare a fibrelor de colagen, fie prin pierderea cristalinității sau la o tulburare mai mare a volumului focal care ar putea fi indicată prin "S-mean".

Nu toți parametrii de cuantificare au putut diferenția între capsulele FA și PTC. O posibilă explicație este că modificările structurale ale colagenului ar putea fi dispersate în imagini la scară largă, prin urmare, am testat parametrii pe imaginile SHG la scară mică pentru capsula nodulilor benign și malign și s-a dovedit că explicația a fost validă.

Deși, atunci când este calculată pentru întreaga imagine SHG, parametrul "MedieSHG" (medie), a scăzut pentru capsula nodulului PTC, pentru imaginile la scară mică, este evidentă o deplasare a distribuției mediei ("MedieSHG") spre valori mai mari. Acest rezultat poate fi atribuit unei modificări la scară mică a organizării colagenului în volumul focal, contrar concluziei trase din "MedieSHG" calculată pe întreaga imagine.

O componentă comună, parametrul "IDM" - "Inverse Difference Moment" (omogenitatea sau momentul diferenței inverse) în jurul valorii de 0,11 a fost obținută atât pentru distribuții benigne, cât și pentru maligne. Pe de altă parte, valorile "IDM", mai mari centrate la 0,092 sunt obținute pentru capsula nodulului PTC, două regiuni centrate la 0,049 și 0,078 rezultând pentru nodulii benigni. Aceste rezultate confirmă creșterea semnificativ statistic a parametrului "IDM", pentru nodulii PTC obținuți pe imagini SHG întregi. Rezultate similare sunt obținute și pentru parametrul "ASM" - "Angular Second Moment" (energia sau al doilea moment unghiular) cu o componentă de valoare

ridicată (~ $2 \cdot 10$ -3) prezentă atât pentru capsulele FA, cât și pentru PTC, în timp ce valorile celelalte sunt distribuite între 0,63 · 10-3 și 1,02 · 10-3 pentru capsula FA și respectiv 0,84 · 10-3 și 1,26 · 10-3 pentru capsula PTC. Analiza la scară mică a parametrilor "ASM" și "IDM" indică o caracteristică pentru nodulii PTC: zonele locale cu un "IDM" mai mare atribuit la o similaritate ridicată și zone cu ASM mai mare, alocate regiunilor mai omogene. Astfel, presupunem că distribuția de colagen suferă modificări semnificative la scară mică, care ar putea fi ratate prin cuantificarea imaginilor mari de câmp.

În cazul parametrului "Ent" (entropie), deși valorile obținute pe întreaga imagine SHG nu au fost statistic diferite pentru capsulele benigne și maligne, atunci când am calculat acest parametru pe imagini mai mici, am obținut o diferență semnificativă între aceste două capsule. În timp ce distribuțiile centrate la 6.44 și ~ 7 sunt prezente în ambele cazuri, o "Ent" (entropie) mai mare (~7.45) este obținută doar pentru capsula nodulului FA care indică texturi de imagine mai complexe la scară mică, în concordanță cu structura ondulată de colagen observată anterior.

Valorile parametrului statistic "Corr" (corelație) au fost echipate cu două distribuții, ambele centrate pe valori mai mari pentru nodulul malign decât pentru nodulul benign. În cazul corelației ("Corr") calculat pe imagini SHG întregi, nu a existat nici o diferență semnificativă între noduli. Aceste valori mai mari ale corelației ("Corr") ar putea indica un model regulat în imagini, care ar putea fi fibrele liniare distincte, prezente în imaginile cu capsule de noduli maligni.

Pentru imaginile la scară mică, am testat doar parametrii din analiza fractală pe imagini în scală gri (parametrii "FD-gray" și "Lac-gray"). Valorile "FD-gray" au fost distribuite în mod normal pentru capsulele nodulilor FA și PTC, cu o distribuție mai largă pentru capsula nodulului PTC, dar neexistând diferențe semnificative între capsule. Prin urmare, "FD-gray" este mai potrivit pentru a detecta modificările pe imagini SHG pe scară largă. Pe de altă parte, două componente scăzute a parametrului "Lac-gray" sunt prezente atât în distribuțiile capsulei nodulului benign, cât și în cele ale capsulei nodulului malign, cu o valoare mai mare doar pentru nodulii maligni, în concordanță cu densitatea mai mică a fibrelor de colagen observate pentru acest tip de capsule. Astfel, "Lac-gray" este un alt exemplu de parametru calculat pe imagini la scară mică, care a putut să facă o diferențiere, în timp ce pe scară largă nu a făcut-o.

Analiza Helmholtz realizată pe imagini la scară mică asigură doar o mică creștere a valorilor parametrului "Helm-MedieSHG" (medie) ale celor două distribuții de colagen capsulare studiate, în timp ce analiza la scară largă a returnat o creștere semnificativ statistic a parametrului"Helm-StDev" (abatere standard) pentru capsula nodulului malign.

În **studiul nr. 3**, folosind aceeași parametri ale celor 4 metode de analiză de imagine, am arătat că există o modificare a distribuției colagenului din capsula nodulului tumoral malign în apropierea zonei de invazie capsulară față de capsula indemnă a nodulului tiroidian diagnosticat histopatologic ca un carcinom papilar tiroidian invaziv. În acest caz opt parametri ("MedieSHG", "Hist-StDev", "Hist-Skew", "S-mean", "Contr", "Ent", "Corr" și "FD-gray") calculați din imaginile achiziționate prin microscopia SHG au furnizat diferențe semnificativ statistic între cele două zone de capsulă investigate.

În **studiul nr.4** am folosit microscopia bazată pe generarea armonicii a doua dependentă de polarizarea radiației laser de excitație (PSHG), a fragmentelor de țesut tiroidian pentru a compara aceleași tipuri capsulare din jurul nodulilor PTC și FA, și capsula glandei tiroide. Am calculat orientarea fibrelor de colagen și raportul dintre două elemente nenule ale tensorului de susceptivitate de ordinul doi pentru colagen ($\chi 31/\chi 15$ și $\chi 33/\chi 15$). S-a încercat să se demonstreze că imagistica colagenului din capsulele nodulilor tiroidieni la diferite unghiuri de polarizare a fasciculului laser cu

microscopia bazată pe generarea armonicii a doua, descrie o curbă teoretică ce poate aduce informații despre componentele nenule ale tensorului de susceptivitate de ordinul doi și orientarea fibrelor de colagen. Am utilizat această abordare, în scopul de a oferi informații suplimentare despre colagenul din capsula nodulilor tiroidieni studiați, care pot completa microscopia bazată pe generarea armonicii a doua cantitativă.

Valorile: mod (valoarea cea mai probabilă într-un set de date), media și deviația standard rezultate dintr-o singură potrivire Gaussiană la histograme sunt date în Tabelul 2.2. Valorile mod apropiate de l sunt obținute pentru $\chi 31/\chi 15$ în caz de capsule nodulare, în timp ce o valoare mai mare este obținută pentru capsula tiroidei. Valorile medii sunt mai mari atunci când se potrivesc histogramele cu o singură potrivire Gaussiană, deoarece histogramele sunt ușor înclinate. Nu s-au observat diferențe semnificative în deviațiile standard calculate pentru cele trei capsule. Valorile mod $\chi 33/\chi 15$ pentru capsula tiroidei sunt semnificativ mai mari decât valorile pentru capsulele nodulilor, cu o valoare puțin mai mare pentru capsula nodulară benignă. Modificările valorilor $\chi 33/\chi 15$ sunt observate între capsulele nodulilor maligni și benigni. Astfel de modificări au fost interpretate ca posibile modificări ale ultrastructurii fibrelor de colagen. O creștere a $\chi 33/\chi 15$ a fost atribuită unei redistribuiri a fibrilelor și a fibrelor de colagen în volumul focal laser. Prin urmare, valorile mai mari ale $\chi 33/\chi 15$ și a deviației standard pentru capsula tiroidiană pot indica organizare aleatorie a colagenului capsular al glandei tiroide și nodulare benigne și o capsulă a nodulului malign organizată cu fibre de colagen aliniate, paralele.

Parametrul 'Deviația standard' obținută pentru $\chi 33/\chi 15$ la compararea histogramelor cu o singură potrivire Gaussiană este mai mare pentru capsula tiroidiană decât pentru capsulele nodulare, indicând o distribuție mai mare a valorilor, deci încă o dată o dezorganizare mai mare în distribuția colagenului. Rezultatele actuale pot părea în contradicție cu cele publicate în literatura de specialitate, când valorile pentru $\chi 33/\chi 15$ au indicat o dezorganizare mai mare a fibrelor de colagen în cazul nodulilor maligni. Acele rezultate au fost obținute din distribuția de colagen între foliculi (în stroma tiroidiană) și în interiorul papilelor în cazul carcinomului papilar tiroidian, în timp ce rezultatele actualei lucrări sunt pe capsule de colagen capsular nodular și pe capsula glandei tiroide, aceste rezultate fiind în concordanță cu cele obținute pentru fibrele de colagen din capsulele nodulare atunci când se utilizează microscopie SHG și analiza texturii pentru a determina organizarea colagenului în tiroida și capsulele nodulare .

În **studiul nr. 5** am introdus cazuri ale unor pacienți diagnosticați histopatologic cu gușă polinodulară adenomatoasă (entitate tumorală benignă tiroidiană) la care s-a descoperit incidental și câte un nodul transformat malign. Am selecționat cazurile la care, pe aceeași secțiune din țesutul tiroidian, de la același pacient, am identificat prin microscopia optică convențională nodulul malign aflat printre ceilalți noduli benigni. În acest fel am încercat să elimin rezultatele parametrilor înregistrați presupuși a fi fals-pozitivi sau fals-negativi, știind faptul că până acum am comparat noduli maligni de la un pacient cu noduli benigni de la alt pacient. Am folosit aceeași metoda ca în studiul nr. 4 – luând în considerare rapoartele elementelor tensorului susceptivitate (elementele din tensor $\chi 31$, $\chi 33$, $\chi 15$ sunt singurele valori nenule) la care am adăugat încă un element de comparație și anume am încercat să găsim o modalitate de a lua în considerare și unghiul care rezultă din algoritmul utilizat, deoarece principalul dezavantaj al metodelor de calculare, folosite până acum, a orientării fibrelor de colagen, este faptul că le lipsește o referință pentru unghiul de colagen în cazul matricei extracelulare, adică orientarea fibrei de colagen în funcție de orientarea țesutului.

Am realizat o analiză la nivel de pixel pe imaginile PSHG, urmărind identificarea unei metode pentru cuantificarea orientării/organizării fibrelor de colagen. Prin calculul local al înprăștierii

valorilor obținute în urma fitării pentru unghiul fibrelor de colagen am obținut imagini noi pe zonele pe care am realizat imagistica PSHG. Aceste noi imagini oferă informații al împrăștierii unghiulare a fibrelor de colagen prin prisma valorilor SD și MAD locale. Folosind aceste rezultate am identificat diferențe între imaginile obținute pe capsule de noduli PTC și respectiv FA. În același timp am arătat că o combinare a tehnicilor de analiză la nivel de pixel cu cele la nivel de imagine este o metodă importantă de a diferenția acești noduli tiroidieni.

5.2. Contribuții originale

În spatele acestor rezultate se ascunde o muncă de cercetare, dar și de consultare a literaturii de specialitate, o reexaminare a cazurilor din histoteca Departamentului de Patologie a Spitalului Universitar de Urgență Militar Central pe o perioadă de 5 ani (2015 - 2019), urmată de o selecție atentă a blocurilor de parafină cu țesutul tiroidian patologic potrivit pentru studiu.

Am imaginat și conceput o procedură complementară de diagnostic prin extragere de informații cantitative referitoare la orientarea colagenului în probele de țesut tiroidian. Procedura a fost testată pe capsule de noduli maligni și benigni tiroidieni pentru diferențierea obiectivă a acestora. Am folosit imagini de armonica a doua achiziționate folosind radiație laser incidentă cu polarizare circulară. Setul de imagini a fost obținut dintr-o stivă de imagini achiziționate la diferite adâncimi în probă, ulterior calculându-se proiecția intensității maxime din acestea pentu a obține imaginea finală pe care s-a realizat și analiza cantitativă.

În studiul de cercetare nr. 1 am testat capacitatea unei prime metode de analiză a imaginii de a diferenția organizarea fibrelor de collagen în cele 2 tipuri capsulare nodulare studiate. Această metodă este analiza prin transformata Fourier rapidă (FFT) a imaginilor achiziționate prin generarea armonicii a doua pentru capsula nodulului de carcinom papilar tiroidian și nodulului benign. În acest caz am decelat rezultate semnificativ statistice.

În studiul de cercetare nr.2 analiza cantitativă a fost realizată folosind parametrii extrași prin diferite metode de analiză a texturii disponibile într-un program "open source" de analiză de imagini de microscopie, ImageJ. Practic am testat capacitatea acestor parametri de a caracteriza organizarea colagenului în imaginile achiziționate prin microscopia bazată pe generarea armonicii a doua și de a diferenția tumorile încapsulate benigne de cele maligne. Această organizare a colagenului se traduce prin alinierea și distribuția fibrelor de colagen, iar setul de parametri utilizat a fost determinat folosind 4 metode de analiză texturala a imaginii: histograma imaginii, analiza "Matricea de corelație a nivelurilor de gri" (GLCM), analiza fractală și analiza Helmholtz. Parametrii au fost testați în studiul nr.2 pe capsula nodulilor maligni, benigni și pe capsula glandei tiroide și în studiul nr. 3 pe capsula nodulului tumoral malign în apropierea zonei de invazie capsulară și în regiunile capsulare indemne a nodulului tiroidian diagnosticat histopatologic ca un carcinom papilar tiroidian invaziv.

Mai mult decât atât, metodele folosite pentru vizualizarea colagenului din capsula glandei tiroide și a nodulilor tumorali tiroidieni sunt pentru prima dată descrise pe capsula nodulară tiroidiană în literatura de specialitate, și anume:

Folosind histograma imaginii, un set de patru parametri, direct legați de distribuția nivelului de culoare a intensităților pixelilor extrași din imaginile 2D SHG (medie - "MedieSHG", abatere standard - "Hist-StDev", indice de asimetrie - "Hist-Skew" și indice de aplatizare - "Hist-Kurt") au fost calculați utilizând caseta de instrumente de analiză histogramă de la ImageJ. Deoarece intensitatea SHG în fiecare pixel depinde de densitatea emițătorilor din volumul focal, dar și de organizarea și distribuția acestora, s-au luat în considerare și doi parametri selectivi suplimentari care pot fi folosiți pentru a diferenția structurile de colagen care prezintă diferite distribuții (raportul dintre

numărul de pixeli cu valori peste un prag și numărul total de pixeli - "TC-ratio" și valoarea medie a SHG în zone semnificative - "S-mean"). În timp ce media ("MedieSHG") și abaterea standard ("Hist-StDev") sunt momente statistice bine cunoscute, indicele de asimetrie ("Hist-Skew") și indicele de aplatizare ("Hist-Kurt") descriu forma unei distribuții. Pixelii din imaginea SHG cu intensitate peste o valoare a pragului sunt contorizați și raportul total al suprafeței de colagen ("TC-ratio") este determinat ca raport între acest număr și suprafața totală a imaginii. Al doilea parametru pe care l-am numit valoarea medie a SHG în zone semnificative ("S-mean") este determinat ca valoarea medie a semnalului SHG în regiunile care prezintă semnale SHG semnificative, folosind același prag ca și pentru parametrul anterior.

Un al doilea set de parametri derivat din analiza GLCM - "Matricea de corelație a nivelurilor de gri" ("Gray Level Co-occurrence Matrix") furnizează informații despre relațiile spațiale dintre intensitățile pixelilor dintr-o imagine dată. GLCM este construit prin adunarea numărului de apariții ale unui nivel de gri, adiacent unui alt nivel de gri, la o distanță specificată a pixelilor - aplicabili în special imaginilor care conțin structuri fibrilare cum ar fi imaginile SHG ale colagenului și pot fi folosite pentru a da o măsurare cantitativă asupra orientării reciproce a fasciculelor de fibre de colagen. Informatii privind organizarea colagenului din imaginile SHG pot fi extrase din GLCM utilizând diferiti parametri care au fost clasificati în literatura de specialitate ca parametri de contrast, organizare și statistici. Parametrii de contrast pot fi folosiți pentru a oferi informații cantitative despre fluctuațiile de intensitate din imaginea SHG. Printre acești parametri, contrastul ("Contr") este o măsură a variațiilor locale prezente în imagine, în timp ce omogenitatea sau momentul diferenței inverse (IDM - "Inverse Difference Moment") oferă informații despre asemănarea unei valori de pixel în combinatie cu pixelul său vecin cu toate celelalte perechi de pixeli vecini din imagine. Parametrii de organizare sunt aplicabili în special imaginilor care conțin structuri fibrilare, cum ar fi imaginile SHG cu colagen și pot fi folosite pentru a măsura cantitativ orientarea reciprocă a pachetelor de fibre de colagen. De exemplu, energia sau al doilea moment unghiular (ASM - "Angular Second Moment") este o măsură a uniformității texturale și atinge o valoare maximă egală cu 1, corespunzând celei mai mari uniformități structurale, în timp ce entropia ("Ent") este o măsură a tulburării dintr-o imagine. "ASM" și entropia ("Ent") sunt invers corelate. Parametrii statistici se bazează pe analiza statistică a dependenței de valoarea pixelilor și pot fi folosiți pentru a evalua periodicitatea în cadrul unei imagini. Dintre parametrii statistici, metoda de corelație ("Corr") reprezintă o abordare puternic aplicabilă imaginilor SHG cu fibre de colagen. Am comparat valorile corelației ("Corr") din analiza GLCM la diferite distanțe de pixeli și am potrivit dependența corelație-distanță (dependența acesteia cu distanța între pixeli) cu o curbă exponentială pentru a calcula rata de scădere a acesteia.

O altă metodă pentru cuantificarea obiectivă a unei organizări texturale într-o imagine este analiza fractală. Imaginile SHG au fost analizate fie ca imagini la scală în gri, fie ca imagini binare. Analiza a fost realizată folosind un plugin ImageJ (FracLac) care a calculat dimensiunea fractală pe imagini binare ("FD-bin"), pe imagini în scală gri ("FD-gray") și lacunaritatea pe imagini binare ("Lac-bin"), pe imagini în scală gri ("Lac-gray") folosind metoda "counting box" (,,numărarea casetelor"). Imaginea este acoperită cu casete succesive mai mici, iar la fiecare nivel sunt numărate casetele care conțin detalii ale imaginii. Astfel de detalii sunt pixelii albi în cazul imaginilor binare și diferența de intensitate a pixelilor în aria acoperită de caseta luată în considerare pentru imaginile în nuanțe de gri. Dimensiunea fractală este o măsură de complexitate a imaginii, iar Lacunaritatea se bazează pe distribuția pixelilor într-o imagine care este calculată din scanări la diferite dimensiuni ale casetelor și este o măsură a adânciturilor (a "gropilor") dintr-o imagine. Analiza Helmholtz a fost utilizată pentru a determina distribuția medie de orientare a colagenului în imaginile SHG. Pentru imaginile de distribuție a orientării obținute cu ajutorul analizei Helmholtz, s-a calculat același set de 4 parametri ca și pentru imaginile 2D SHG (medie - "Helm-MedieSHG", abatere standard - "Helm-StDev", indice de asimetrie - "Helm-Skew" și indice de aplatizare - "Helm-Kurt"). Valorile parametrului medie – "Helm-MedieSHG", nu au fost luate în considerare în acest caz, deoarece unghiul mediu ar depinde de orientarea eșantionului în raport cu planul de scanare.

Pentru a evalua în continuare dacă diferențele de distribuție de colagen între capsulele maligne și benigne se datorează caracteristicilor la scară mică sau la scară largă, toate cele trei seturi de date de imagine au fost împărțite în imagini de 32x32 pixeli și toți parametrii de analiză a texturii au fost calculați și pentru aceste seturi de date extinse. Distribuțiile obținute au fost echipate cu trei distribuții Gaussiene pentru interpretarea datelor. Calitatea procedurii de fitare a fost cuantificată prin coeficientul de determinare R2 (0 < R2 <1), o valoare mai apropiată de 1 care indică o fitare mai bună.

În studiul nr. 3 am avut alt scop și anume identificarea precoce sau anticipată a zonei de invazie în capsula de PTC, folosind aceeași metodă ca în studiul nr. 2: un set extins de 18 parametrii cantitativi extrasi din imaginile SHG. Și în acest caz alți opt parametri calculați din imaginile achiziționate prin microscopia SHG au furnizat diferențe semnificativ statistic între cele două zone de capsulă investigate, deci am concluzionat că am putea descoperi o anumită zonă ce urmează să fie invadată, în cazul unei eventuale transformări maligne a unui nodul benign.

În studiul nr.4 am folosit microscopia bazată pe generarea armonicii a doua dependentă de polarizarea radiației laser de excitație (PSHG), a fragmentelor de țesut tiroidian pentru a compara capsulele din jurul nodulilor PTC și FA cu capsula glandei tiroide, deci pentru a investiga aceeași organizarea a colagenului în capsulele fibrilare care înconjoară noduli tiroidieni. Calculând orientarea fibrelor de colagen și raportul dintre două elemente nenule ale tensorului de susceptivitate de ordinul doi pentru colagen ($\chi 31/\chi 15$ și $\chi 33/\chi 15$) am demonstrat că imagistica colagenului din capsulele nodulilor tiroidieni la diferite unghiuri de polarizare a fasciculului laser cu microscopia bazată pe generarea armonicii a doua, descrie o curbă teoretică ce poate aduce informații despre componentele nenule ale tensorului de susceptivitate de ordinul doi și orientarea fibrelor de colagen. Am utilizat această abordare, în scopul de a oferi informații suplimentare despre colagenul din capsula nodulilor tiroidieni studiați, care pot completa microscopia bazată pe generarea armonicii a doua cantitativă.

În studiul de cercetare nr.5 - am avut același scop: diagnosticul diferențial între capsula nodulilor maligni (PTC) și benigni (FA), tot la nivel de pixel, ca în studiul de cercetare nr.4, doar că probele au provenit de la același pacient, deoarece până acum studiile au fost efectuate pe probe tisulare provenite de la pacienți diferiți. În acest fel am încercat să elimin rezultatele parametrilor înregistrați presupuși a fi fals-pozitivi sau fals-negativi, știind faptul că până acum am comparat noduli maligni de la un pacient cu noduli benigni de la alt pacient. Astfel am avut rezultate de pe capsulele celor două tipuri de noduli tiroidieni (maligni sau benigni) din țesut de la același pacient atât cu nodul malign cât și cu nodul benign - decelați pe aceeași lamă, pentru a exclude variabilitatea dintre pacienți.

Am luat imagini pe aceeași suprafață a probei prin microscopie TPEF și cu SHG generat înapoi, respectiv cu SHG generat înainte și am suprapus imaginile pentru a avea o mai bună vizualizare a distribuției colagenului din capsulele nodulilor benigni a nodulilor maligni și a capsulei glandei tiroide.

Am folosit aceeași metodă ca în studiul nr.4 și anume rapoartele elementelor tensorului susceptivitate. Rezultate au fost statistic relevante, cu excepția unei situații SHG colectat înapoi pentru $\chi 31/\chi 15$, cu mențiunea că $\chi 31/\chi 15$ este o măsură a anizotropiei și a avut o valoare mai mică pentru capsula nodulului malign decât pentru cea a nodulului benign. Apoi am adăugat încă un element de comparație și anume am încercat să găsesc o modalitate de a lua în considerare și unghiul care rezultă din algoritmul utilizat, rezultând alte imagini pe care se poate face o analiză statistică prin calcularea distribuției pixelilor din imaginile nou formate. Deci am realizat o analiză subiectivă a distribuției unghiulare a colagenului folosind imagini în pseudoculori (în funcție de valoarea pixelului) pentru a evidenția gradul de organizare/dezorganizare a fibrelor de colagen în capsule. Pe aceste imagini în pseudoculori, rezultate din calcularea distribuției unghiulare (φ) a colagenului, am realizat o altă distribuție a orientării colagenului la nivel de pixel și anume am realizat imagini noi ale distribuției locale a colagenului, mai exact imagini SD 1 și MAD 1 cu SD / MAD cu dimensiuni ale ferestrei de calcul cu latura cu număr impar de pixeli 1 = 3, 15 și 63 pixeli. La nivel local pot exista variatii mari și am observat ca la nivelul capsulei nodulului malign variația de pseudoculori este mult mai uniformă. Rezultă că fibrele sunt mai aliniate (mai ordonate). Rezultatele au arătat același lucru la nivel de pixel cu cele obținute pe întreaga imagine din studiile anterioare, cu mentiunea că la nivel de pixel putem identifica exact locul unde se modifică distribuția fibrelor de colagen ale capsulei nodulului patologic.

Aceste rezultate sugerează, pentru prima dată în literatura de specialitate, faptul că unii noduli tumorali tiroidieni pot fi diferențiați și prin studierea capsulei lor, fără a avea nevoie de morfologia celulară tumorală, element indispensabil în elaborarea diagnosticului histopatologic al anumitor leziuni tumorale.

5.3. Lista contribuțiilor originale

ARTICOLE ÎN REVISTE ISI

1. L.G. Eftimie, R. Hristu, M. Dumitrescu, M. Costache, S.G. Stanciu, M. Sajin, G. A. Stanciu; "Modern methods to differentiate benign thyroid nodules from malignant ones"; Original Article, Romanian Journal of Military Medicine; Vol. CXXI. No.1, p.40, 2018.

2. R. Hristu, L.G. Eftimie, S.G. Stanciu, D.E. Tranca, B. Paun, M. Sajin, G.A. Stanciu; "Quantitative second harmonic generation microscopy for the structural characterization of capsular collagen in thyroid neoplasms"; Original Article, Biomedical Optics Express, vol. 9, no. 8, p. 3923, 2018.

3. Juan M. Bueno, Francisco J. Ávila, Radu Hristu, Stefan G. Stanciu, Lucian Eftimie, And George A. Stanciu"Objective analysis of collagen organization in thyroid nodule capsules using and the Hough Transform"; Applied Optics, 2020; https://doi.org/10.1364/AO.393721

4. A.M. Sîrbu, C.A. Sîrbu, L.G. Eftimie, A.M. Soare, M.C. Ghinescu, F Ioniță-Radu; "Multiple sclerosis, human herpes virus 4, and thyroid collision tumor: A case report"; Experimental and Therapeutic Medicine, 2020; https://doi.org/10.3892/etm.2020.897

5. R. Hristu, L.G. Eftimie, B. Păun, M. Costache, S.G. Stanciu, M. Sajin, G.A. Stanciu; "Pixellevel angular quantification of capsular collagen in second harmonic generation microscopy images of encapsulated thyroid nodules"; Journal of Biophotonics, 2020; https://doi.org/10.1002/jbio.202000262

CONFERINȚE NATIONALE

1. L.G. Eftimie, R. Hristu, M. Dumitrescu, R.Bulata, A. Calu, M.Curea, L.Toma, F.Vasilescu, M. Costache, S.G. Stanciu, M. Sajin, G.A. Stanciu; "Tehnici moderne de diferențiere a nodulilor tiroidieni benigni de cei maligni"; Conferința Națională a Spitalului Universitar de Urgență Militar Central "Dr. Carol Davila", București, 2017 – PREMIUL 1

2. L.G. Eftimie, R. Hristu, M. Dumitrescu, R.Bulata, A. Calu, M.Curea, L.Toma, F.Vasilescu, M. Costache, S.G. Stanciu, M. Sajin, G.A. Stanciu; "Microscopia bazată pe generarea armonicii a doua (SHG) poate ajuta patologul în a diagnostica Carcinomului papilar tiroidian, prin identificarea invaziei capsulare?"; Conferința Națională a Spitalului Universitar de Urgență Militar Central "Dr. Carol Davila", București, 2018.

3. L.G. Eftimie, R. Hristu, M. Dumitrescu, R.Bulata, A. Calu, M.Curea, L.Toma, F.Vasilescu, R. Glogojeanu, M. Costache, S.G. Stanciu, M. Sajin, G.A. Stanciu; "Corelații între microfotografii pe secțiuni colorate cu H&E și imagini de microscopie multifotonică achiziționate pe nodulii încapsulați tiroidieni"; Conferința Națională a Spitalului Universitar de Urgență Militar Central "Dr. Carol Davila", București, 2019.

CONGRESE INTERNAȚIONALE - ABSTRACTELE APAR ÎN PROCEEDINGS ISI

1. L.G. Eftimie, R. Hristu, O. Voinea, M. Dumitrescu, M. Sajin, G.A. Stanciu; "Differential diagnosis between benign and malignant thyroid nodules using Second Harmonic Generation Microscopy"; Poster European Congress of Pathology, Amsterdam, 2017.

2. L.G. Eftimie, R. Hristu, M. Dumitrescu, M. Costache, S.G. Stanciu, M. Sajin, G.A. Stanciu; "Modern methods for the structural characterization of collagen in capsular invasion areas in papillary thyroid carcinoma"; Poster European Congress of Pathology, Bilbao, 2018.

3. R. Hristu, B. Paun, L.G. Eftimie, S.G. Stanciu, D.E. Tranca, G.A. Stanciu; "Changes in the Collagen Structure of Thyroid Nodule Capsules Determined by Polarization-Resolved Second Harmonic Generation Microscopy", ICTON (20th International Conference on Transparent Optical Networks), București, 2018.

4. R. Hristu, L.G. Eftimie, G.A. Stanciu; "Second harmonic generation imaging for materials science and biomedical applications", 2020 2nd International Conference on Advanced Materials and Ecological Environment, 2020

5.4. Perspective de dezvoltare ulterioară

Având în vedere rezultatele lucrării prezentate, consider că aceasta ar putea avea aplicație practică în domeniul medical, deoarece ar intra în categoria metodelor complementare, ajutând la elaborarea unui diagnostic histopatologic cât mai exact. Folosită ca o tehnică suplimentară cu aplicabilitate în Anatomia Patologică ar putea ajuta la evitarea subdiagnosticării sau supradiagnosticării unor leziuni, al căror diagnostic corect este esențial pentru un tratament adecvat și eficient. De asemenea, prin utilizarea acestei tehnici, se va evita folosirea în exces a altor tehnici complementare de diagnostic relativ costisitoare existente în prezent (tehnici de biologie moleculară, teste genetice, teste IHC, microscopie electronică etc.)

Se poate ridica ipoteza unei alte aplicabilități îndrăznețe, ce ar revoluționa lumea medicală dacă s-ar construi un dispozitiv de mici dimensiuni cu proprietățile microscopiei de baleiaj laser bazate pe generarea armonicii a doua (SHG), ce poate fi manevrat cu ușurință de medicul examinator

pe regiunea cervicală anterioară. Astfel imaginile cu nodulii tiroidieni patologici pot fi vizualizate transtegumentar "in vivo", folosind în direct un soft implementat cu metodele prezentate de analiză texturală capsulară, utilizând parametrii folosiți în această lucrare, care ar putea genera un "grafic de corelație – dreaptă de regresie" asupra caracterului capsular benign sau malign tumoral. Această metodă ar putea concura cu ultrasonografia, ca o metodă imagistică de explorare și de diagnostic noninvazivă, nontraumatică pentru organele cu localizare superficială, cum este glanda tiroidă. De asemenea poate înlocui cu succes tehnica biopsiei în scop diagnostic histopatologic sau a puncției aspirative cu ac fin sub ghidaj ultrasonografic cu scopul de a preleva material celular pentru un diagnostic citopatologic, metode minim invazive folosite în prezent pentru confirmarea malignității unui nodul tiroidian și stabilirea indicației chirurgicale.

În acest moment metoda prezintă limite din punct de vedere al costurilor, pregătirii personalului medical în a o folosi, dimensiunilor mari ale aparaturii și ar merita implementată dacă și-ar extinde aplicabilitatea medicală și pentru alte leziuni încapsulate. Totodată vor fi necesare cercetări pe un lot mult mai mare de pacienți și studii clinice pentru ca metoda să fie validată de Ministerul Sănătății.

Bibliografie selectivă

[1] World Health Organization [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer]

[2] American Cancer Society [https://www.cancer.org/cancer/thyroid-cancer/about/key-statistics.html]

[3] Larsen, William J. (2001). Human embryology (3. ed.). Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone. pp. 372–374. ISBN 978-0-443-06583-5.

[4] S. E. Mills, Histology For Pathologists. Fourth Edition., Md. 2012, 2007 By Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Business. Isbn 978-1-4511-1303-7.

[5] R. V. Lloyd, R. Y. Osamura, G. Kloppel, J. Rosai, WHO Classification of tumours of endocrine organs, 4th edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2017, p.65-96.

[6] J. Rosai, R. A. DeLellis, M.L. Carcangiu, W.J Frable, G. Tallini; AFIP Atlas Of Tumor Pathology. Tumors Of The Thyroid And Parathyroid Glands. Fourth Series. Fascicle 21. American Registry Of Pathology. Silver Spring, Maryland, 2014.

[7] P. Davidovits and M. D. Egger, Photomicrography of Corneal Endothelial Cells in vivo, Nature, 244: 366-367, 1973.

[8] J. M. Bueno, F. J. Ávila, and P. Artal, "Second Harmonic Generation Microscopy: A Tool for Quantitative Analysis of Tissues," in Microscopy and Analysis, S. G. Stanciu, Ed. InTech, 2016.

[9] E. A. Gibson, O. Masihzadeh, T. C. Lei, D. A. Ammar, and M. Y. Kahook, "Multiphoton microscopy for ophthalmic imaging," Journal of Ophthalmology, vol. 2011, pp. 1–11, 2011, doi: 10.1155/2011/870879.

[10] Cicchi, Riccardo; Vogler, Nadine; Kapsokalyvas, Dimitrios; Dietzek, Benjamin; Popp, Jürgen; Pavone, Francesco Saverio (2013). "From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy". Journal of Biophotonics. 6 (2): 129–142. doi:10.1002/jbio.201200092. ISSN 1864-063X

[11] I. Amat-Roldan, et. al.: Fast image analysis in polarization SHG microscopy, Opt. Express, vol. 18. pp.17209-17219, 2010.

[12] J. Adur et al., "Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer," J. Biophotonics, 2014.

[13] Z. fang Li, S. ping Qiu, S. lian Wu, and H. Li, "Quantification of collagen fiber orientation based on center line of second harmonic generation image for naturally aging skins," Optoelectron. Lett., 2018.

[14] A. Golaraei et al., "Polarimetric second-harmonic generation microscopy of the hierarchical structure of collagen in stage I-III non-small cell lung carcinoma," Biomed. Opt. Express, 2020.

[15] L. B. Mostaço-Guidolin et al., "Collagen morphology and texture analysis: From statistics to classification," Sci. Rep., 2013.

[16] K. E. Frisch, S. E. Duenwald-Kuehl, H. Kobayashi, C. S. Chamberlain, R. S. Lakes, and R. Vanderby, "Quantification of collagen organization using fractal dimensions and Fourier transforms," Acta Histochem., 2012.

[17] K. Tilbury, J. Hocker, B. L. Wen, N. Sandbo, V. Singh, and P. J. Campagnola, "Second harmonic generation microscopy analysis of extracellular matrix changes in human idiopathic pulmonary fibrosis," J. Biomed. Opt., 2014.

[18] C. Bayan, J. M. Levitt, E. Miller, D. Kaplan, and I. Georgakoudi, "Fully automated, quantitative, noninvasive assessment of collagen fiber content and organization in thick collagen gels," J. Appl. Phys., 2009.

[19] X. Chen, O. Nadiarynkh, S. Plotnikov, and P. J. Campagnola, "Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure," Nat. Protoc., vol. 7, no. 4, pp. 654–669, 2012.

[20] D. Tokarz, R. Cisek, A. Golaraei, S. L. Asa, V. Barzda, and B. C. Wilson, "Ultrastructural features of collagen in thyroid carcinoma tissue observed by polarization second harmonic generation microscopy," Biomed. Opt. Express, 2015.

[21] N. Mazumder, J. Qiu, M. R. Foreman, C. M. Romero, P. Török, and F.-J. Kao, "Stokes vector based polarization resolved second harmonic microscopy of starch granules," Biomed. Opt. Express, 2013.

[22] S. Psilodimitrakopoulos, S. I. C. O. Santos, I. Amat-Roldan, A. K. N. Thayil, D. Artigas, and P. Loza-Alvarez, "In vivo, pixel-resolution mapping of thick filaments' orientation in nonfibrilar muscle using polarization-sensitive second harmonic generation microscopy.," J. Biomed. Opt., 2011.

[23] J. Duboisset, D. Aït-Belkacem, M. Roche, H. Rigneault, and S. Brasselet, "Generic model of the molecular orientational distribution probed by polarization-resolved second-harmonic generation," Phys. Rev. A - At. Mol. Opt. Phys., 2012.

[24] I. Amat-Roldan, S. Psilodimitrakopoulos, P. Loza-Alvarez, and D. Artigas, "Fast image analysis in polarization SHG microscopy," Opt. Express, 2010.

[25] B. Paun, R. Hristu, S. G. Stanciu, A. V. Dumitru, M. Costache, and G. A. Stanciu, "Strategies for Optimizing the Determination of Second-Order Nonlinear Susceptibility Tensor Coefficients for Collagen in Histological Samples," IEEE Access, 2019.

[26] P. Réfrégier, M. Roche, and S. Brasselet, "Precision analysis in polarization-resolved second harmonic generation microscopy," Opt. Lett., 2011.