

APLICAȚII ALE ANALIZEI FRACTALE ÎN EXAMENUL ANATOMOPATOLOGIC AL PROCESELOR TUMORALE

REZUMAT

Cuvinte cheie: analiză fractală, dimensiune fractală, procesarea imaginilor digitale, microscopie virtuală, diagnostic oncologic, prognostic, rețele neuronale artificiale, medicină bazată pe dovezi

Cercetarea oncologică se află la conjuncția mai multor domenii care trec, în prezent, prin schimbări spectaculoase. Practica medicală clinică se reorganizează progresiv potrivit exigențelor subsumate conceptului de Medicină Bazată pe Dovezi. Genomica și biologia moleculară generează constant noi modele explicative pentru diverse etape ale carcinogenezei, cu impact pe abordările terapeutice și de diagnostic. Tehnicile de examinare, de la imagistica neinvazivă la descifrarea până la nivel molecular și genic a probelor biologice oferă instrumente atât de puternice cercetării încât este tehnic posibil să avansezi rapid în aproape orice direcție, greu fiind de ales direcția. Tehnologia informației se află într-o etapă de schimbare a paradigmei euristice și operaționale, deoarece progresele din microelectronică au făcut accesibile stocarea și prelucrarea unui volum de date enorm. Totuși cancerul, deși studiat intensiv în ultimii 60 ani, rămâne un subiect în care fiecare progres confirmat în cercetare aduce cel puțin atâtea întrebări noi câte răspunsuri oferă la vechile întrebări. O perspectivă care câștigă teren în ultima vreme abordează oncologia din perspectiva sistemelor dinamice neliniare, care pot avea manifestări spontane de autoorganizare. Cancerul ar reflecta o manifestare a perturbării inteligenței de roi, *swarm intelligence*, aceea care în starea pe care o numim *normală* face ca populația enormă de celule somatice să lucreze împreună în organismul pluricelular. Această viziune unificatoare evidențiază o legătură de esență între **carcinogeneza**, **analiza fractală** - care s-a dezvoltat în principal drept instrument de modelare a sistemelor dinamice neliniare și **rețelele neuronale artificiale** – care sunt unul dintre cele mai bine documentate exemple de *swarm intelligence* din lumea inventată de om.

Analiza fractală permite obținerea unor măsuri, a unor numere care cuantifică complexitatea ne-periodică atât de caracteristică structurilor biologice, la toate scalele de mărime în care se manifestă viața. Cercetarea de față a investigat posibilitatea de a include analiza fractală, aplicată imaginilor microscopice histopatologice sau citopatologice, între instrumentele folosite pentru diagnosticul tumorilor la animale. În continuare, am testat introducerea dimensiunii fractale între factorii de prognostic oncologic. În acest scop am elaborat modele statistice și modele de tip rețea neuronală artificială RNA pentru durata de supraviețuire, incluzând dimensiunea fractală în setul de date de intrare pe baza cărora aceste modele estimează prognosticul pentru pacienții cu diagnostic oncologic confirmat.

Structura tezei. Teza de doctorat „Aplicații ale analizei fractale în examenul anatomopatologic al proceselor tumorale” este organizată în două părți principale. În **Partea I Studiu bibliografic**, sunt trecute succint în revistă principalele rezultate publicate în ultimii ani privind aplicarea analizei fractale în anatomia patologică, în alte țări dar și în România, în special în medicina umană. Sunt, de asemenea, sintetizate performanțele raportate pentru unii parametri fractali, în particular pentru dimensiunea fractală a unor elemente din imagini histologice sau citologice, de a reprezenta factori de prognostic pentru pacienții oncologici. Am evidențiat modelele

care au fost folosite pe plan internațional pentru a formula astfel de predicții – în principal modele statistice și modele din clasa inteligenței artificiale, respectiv rețele neuronale artificiale. **Partea a II-a Cercetări originale** debutează cu prezentarea obiectivelor și organizării cercetării, a suportului teoretic folosit, a instrumentelor software și a mijloacelor tehnice utilizate, a cazuisticii incluse în studiu, respectiv a populațiilor de imagini microscopice analizate. Principalele pachete software folosite sunt: Olympus Cell[^]B pentru captura imaginilor, CorelPHOTO-PAINT[®] pentru prelucrarea preliminară a imaginilor, FracLab 2.05 pentru analiza fractală, StatsDirect 3.0 pentru analiza statistică și reprezentarea grafică a rezultatelor, Epi Info 7TM pentru evidența pacienților și informațiilor, EasyNN[©] plus 14.0g pentru dezvoltarea de rețele neuronale artificiale RNA. Captura imaginilor histologice și citologice, precum și diagnosticul anatomopatologic s-au realizat pentru majoritatea cazurilor în Laboratorul de anatomie patologică al FMV-USAMV București. În mod excepțional, unele examene anatomopatologice au fost efectuate la S.C. Histovet s.r.l. și la laboratorul de anatomie patologică al Spitalului de urgență „Prof. dr. Dimitrie Gerota” din București. În continuare sunt prezentate, în capitole distincte, șase studii care au reprezentat etape procedurale și cronologice în desfășurarea cercetării.

Studiul 1 Cercetări preliminare: comparație între analiza fractală și morfometria clasică în examinări histopatologice și citopatologice a testat performanța analizei fractale, prin comparație cu morfometria nucleară clasică, în a furniza parametri cantitativi corelați cu prezența/absența unor modificări patologice pe imagini histologice sau citologice. În această parte a cercetării am realizat și verificarea posibilității de a folosi pachetele software selectate pentru analiza fractală a unei imagini microscopice histologice sau citologice. Am analizat retrospectiv 88 imagini histopatologice (obiectiv $\times 40$ și $\times 100$, colorație hematoxilin eozină HE), provenind dintr-un studiu anterior, realizat la FMV-USAMV pe șobolani Walker 256 cu cancer iatrogen, urmărind reflectarea în imagini a modificărilor morfologice microscopice ale ficatului sub acțiunea a doi agenți toxici (citostatice) și a unor substanțe cu rol de protector hepatic (extracte fenolice din plante). De asemenea, am analizat 17 imagini citopatologice (obiectiv $\times 100$, colorație May-Grünwald-Giemsa), de probe obținute prin aspirație cu ac fin din limfonoduri de câine, normale (4 imagini) și afectate de limfom malign. Examenul morfometric clasic a determinat valori pentru perimetrul nuclear și aria nucleară, stabilite prin conturare manuală a nucleilor pe imaginile microscopice digitale. Prin analiză fractală am calculat cu metoda boxelor dimensiunea fractală a imaginilor integrale – **DFII**, și dimensiunea fractală a regiunilor de cromatină **DFRC**. Pentru imaginile din probe histologice de țesut hepatic, am stabilit că dimensiunea fractală – atât a regiunilor de cromatină **DFRC** cât și a imaginilor integrale **DFII**, are performanțe net superioare față de morfometria nucleară clasică, în privința corelării cu impactul administrării de agenți toxici și chiar de agenți protectori pentru ficat: dispersii mai mici ale valorilor, care conduc la intervale de încredere 95% pentru medie mai înguste și probabilități foarte mici ($P < 0.0001$, în unele cazuri) ca diferențele de medie între grupurile analizate să se datoreze hazardului. Am stabilit că performanța analizei fractale ca instrument pentru identificarea leziunilor pe o imagine histologică depinde critic de alegerea elementelor morfologice din imagine extrase pentru a fi supuse evaluării dimensiunii fractale: pe țesut hepatic, unii factori toxici generează leziuni decelate optim prin dimensiunea fractală a regiunilor de cromatină **DFRC**, alți factori toxici produc leziuni mai bine evidențiate de dimensiunea fractală a imaginii histologice integrale **DFII**. Așadar, chiar pentru un același organ trebuie evaluate mai multe variante de segmentare a imaginilor pentru a stabili care este cea optimă pentru a evidenția un

anumit tip de leziune prin analiză fractală. În cazul imaginilor din probe citologice, metodele morfometriei clasice s-au dovedit superioare analizei fractale în furnizarea de parametri bine corelați cu diagnosticul. Această concluzie poate fi considerată preliminară, datorită numărului relativ mic de imagini citologice inclus în analiză.

Studiul 2 Cercetări preliminare: optimizarea procedurii și parametrilor pentru aplicarea analizei fractale în diagnosticul anatomopatologic a fost realizat pe aceeași populație de imagini din *Studiul 1*. Am identificat opțiunile de operare a programelor, formatele fișierelor și convențiile de denumire a fișierelor care asigură compatibilitate la transferul datelor între programele implicate în fazele succesive de prelucrarea a imaginilor, analiză fractală și analiză statistică. A fost transpusă într-un program (*Corel script*) secvența de operații de prelucrare a imaginilor digitale pentru optimizarea calității, extragerea regiunilor de interes (cromatină) și reducerea cromatică (nuanțe de gri) și dimensională (800 x 600 pixeli) la formatul adecvat calculului dimensiunii fractale; acest program a permis în studiile ulterioare prelucrarea automată a unui număr mare de imagini microscopice. Am stabilit, prin încercări succesive și evaluări cu metoda ANOVA, *parametrii de lucru* din pachetele software pentru procesări imagini și analiză fractală care conduc la *cea mai bună corelare* dintre dimensiunea fractală calculată pe imagini microscopice prelucrate și datele clinice și anatomopatologice asociate probelor din care s-au preluat acele imagini.

Studiul 3 Utilizarea dimensiunii fractale pentru evidențierea tumorilor epiteliale a fost efectuat pe 194 de imagini histologice (obiectiv ×40, colorație HE) de la 19 câini și 5 pisici diagnosticați cu tumori epiteliale benigne și maligne: carcinom de glandă mamară, alte carcinoame, adenom de glandă mamară, epiteliom, seminom, fibroadenomatoză mamară, trichoblastom, trichoepiteliom. Am stabilit că dimensiunea fractală a regiunilor de cromatină - **DFRC** crește semnificativ atunci când pe imaginea analizată sunt prezente elemente caracteristice tumorilor epiteliale. Creșterea este suficient de mare pentru a permite formularea unui test bazat pe **DFRC** care să discearnă între imaginile care includ tumori epiteliale și cele care reprezintă țesut nemodificat tumoral. Performanța testului (sensitivitatea și specificitatea) cresc dacă populația studiată este organizată pe grupe de sex și grupe de vârstă. De asemenea, dintre tipurile de tumori epiteliale incluse în studiu, cea mai bună corelare dintre prezența modificărilor tumorale cu **DFRC** s-a consemnat pentru carcinomul de glandă mamară, aria de sub curba ROC *Receiver Operating Characteristic* fiind 0.869.

Studiul 4 Utilizarea analizei fractale pentru identificarea unor transformări tumorale în glanda mamară a urmărit confirmarea ipotezei că **DFRC** – dimensiunea fractală a regiunilor de cromatină - este statistic corelată cu prezența sau absența unei tumori într-o imagine histologică de glandă mamară. În acest scop, cercetarea a comparat **DFRC** pentru imagini histopatologice de țesut mamar caracterizate în prealabil anatomopatologic ca reprezentând *țesut fiziologic normal / adenom / carcinom* - pentru câini, iar pentru pisici *țesut fiziologic normal / adenom / fibroadenomatoză / carcinom*. Au fost incluse în studiu 1237 imagini histologice (obiectiv ×40, colorație HE) de la 62 pacienți (30 câini și 32 pisici) supuși mastectomiei pe diagnostic clinic de suspiciune de neoplazie la nivelul glandei mamare. Au fost selectate pentru studiu numai imagini care cuprind țesut mamar normal sau modificat tumoral exclusiv la nivelul componentelor epiteliale. Nu au fost incluse în studiu imagini care aveau un conținut mixt de caractere anatomopatologice, cu prezența în ponderi semnificative a mai multor tipuri de leziuni. Am confirmat că **dimensiunea fractală a regiunilor de cromatină DFRC variază semnificativ**

statistic ($P < 0.001$) după cum în imaginile histologice este sau nu este prezent carcinom de glandă mamară. Atât valorile dimensiunii fractale cât și nivelul ridicat de corelare statistică a acesteia cu prezența leziunilor maligne sunt în bună concordanță cu rezultate raportate în oncologia umană pentru carcinoame de glandă mamară, de prostată și de mucoasă bucală. În cazul imaginilor de glandă mamară, dacă la câini **DFRC** – dimensiunea fractală a regiunilor de cromatină crește progresiv între grupele de imagini *fără leziuni – adenom – tumori maligne*, în cazul pisicilor modificările benigne (adenom, fibroadenomatoză) scad **DFRC**, iar cele maligne sunt însoțite de creșterea **DFRC**. Acest mod ne-sistematic de variație a **DFRC** face ca modelul statistic necesar pentru testarea malignității pe bază de **DFRC** să fie mai complex pentru pisici. Prin evaluarea ROC - *Receiver Operating Characteristic*, testul de malignitate bazat pe **DFRC** pentru câine, care distinge dacă o imagine histologică face parte din grupa „*carcinom*” față de grupa combinată „*fără leziuni sau adenom*”, are aria de sub curba ROC 0.7725 (performanță foarte bună), iar la o alegere echilibrată a valorii limită **DFRC** = 1.8214, testul are o șansă a diagnosticului corect de 5 : 1, o sensibilitate de 0.73 și o specificitate de 0.66. Similar, testul de malignitate pentru pisică, care face distincția între imagini din grupa „*carcinom*” față de cele din grupa combinată „*fără leziuni sau fibroadenomatoză sau adenom*”, are aria de sub curba ROC 0.8513 (performanță excelentă), iar pentru valoarea limită **DFRC** = 1.7891 testul are o șansă a diagnosticului corect de 16.8 : 1, o sensibilitate de 0.88 și o specificitate de 0.70. Am conturat posibilitatea de a transpune direct aceste concluzii într-o procedură care, prin analiza fractală a unei imagini histologice, evaluează probabilitatea ca imaginea să conțină modificări tumorale. Această probabilitate, prin inferență bayesiană cu date de statistică ale populației studiate, poate furniza o estimare a șanselor de diagnostic tumoral pozitiv pentru pacientul de la care provine proba. Pentru glanda mamară de câine, un parametru direct utilizabil drept evaluare a probabilității prezenței leziunilor maligne într-o imagine pentru care se determină **DFRC** este valoarea predictivă pentru prezența leziunii în caz de rezultat pozitiv al testării (*post-test likelihood of lesion*), așa cum este furnizată de modelul ROC dacă în el se introduce valoarea de test a **DFRC** drept valoare limită. Am creat un **indice fractal de evidențiere a leziunilor – IFEL**, derivat din modelul statistic ROC, care am demonstrat că oferă o orientare robustă privind prezența/absența într-o imagine histologică a caracterelor de malignitate, atât în cazul câinilor cât și în cazul pisicilor. **IFEL** poate fi direct folosit în proceduri de *screening*, pentru a selecta regiuni de interes din preparate sau pentru a selecta imaginile care intră în evaluarea specialistului anatomopatolog pentru diagnostic aprofundat. De asemenea, am argumentat posibilitatea aplicării procedurilor din acestui studiu pentru a evalua prin analiză fractală imagini de preparate imunohistochimice și imagini rezultate prin tehnica RCM (*Reflectance Confocal Microscopy*). Studiul nu a identificat vreun avantaj care să decurgă din utilizarea distinctă a componentelor *structurală* și *texturală* ale **DFRC**. Am confirmat corelarea dintre *invazia tumorală a capilarelor limfatice* și **DFRC** median în cazul glandei mamare de pisică. Am investigat și confirmat corelarea dintre *gradul de malignitate* al leziunilor de carcinom mamar și **DFRC** median în grupul de imagini histologice realizate pe leziunile respective, atât pentru câini cât și pentru pisici. Având în vedere valoarea recunoscută de factor de prognostic a gradului de malignitate, coroborând cu concluziile similare din oncologia umană privind analiza fractală, rezultatele studiului aduc argumente în favoarea utilității **DFRC** ca factor de prognostic pentru pacienții câini și pisici cu carcinom mamar.

Studiul 5 Evaluarea posibilității de utilizare a RNA – Rețelelor Neuronale Artificiale

pentru formularea prognosticului pe baza unui set extins de date clinice și anatomopatologice a dezvoltat un model de estimare a prognosticului bazat pe rețele neuronale artificiale RNA, cu acest prilej fiind testat cu succes mediul de programare EasyNN[®] plus 14.0g și fiind identificate problemele de operaționalizare a RNA și modalitățile practice de a surmonta aceste probleme. Au fost folosite date de la 39 câini și pisici diagnosticați cu tumori de glandă mamară (18 cazuri), osteosarcoame, limfoame cutanate, hemangioame, tumori ovariene, melanoame maligne, histiocitoame, carcinoame de diverse tipuri și cu diverse localizări. Au fost cuantificați pe o scară de la 0 la 4, pentru fiecare pacient, un număr de 27 predictorii: *criterii clinice și paraclinice* (ritmul de creștere al tumorii, timpul liber de tumoră post-chirurgical, abaterea de la normal a analizelor de sânge, timpul de vindecare a plăgii chirurgicale, vârsta, scorul TNM la inițierea tratamentului), *criterii anatomopatologice macroscopice* (mărimea tumorii la momentul diagnosticului, consistența – duritatea, vascularizația, ulcerările), *criterii histologice* (gradul de malignitate, implicarea limfonodală, *criterii legate de terapie* (tratament chirurgical, chimioterapie adjuvantă, stimularea imunității, terapie hormonală anterioară diagnosticului, terapie cu antiinflamatoare nesteroidiene AINS). Durata de supraviețuire (în zile) de la momentul diagnosticării a fost singurul parametru de interogare al rețelei neuronale. Am stabilit că cele mai eficiente mijloace de depășire a situației de blocaj reprezentată de *overfitting* sunt clonarea nodurilor ascunse performante, combinată cu înghețarea adaptativă (*adaptive freezing*) a ponderilor și eliminarea nodurilor și sinapselor slab performante (*pruning*).

Studiul 6 Analiza fractală și rețelele neuronale artificiale aplicate în estimarea prognosticului pacienților cu cancer a condus la realizarea modelului **OncoVetNeuralNet**, care permite estimarea duratei de supraviețuire pentru câini și pisici cu carcinom mamar, atât pe baza unei modelări statistice (analiză Kaplan-Meier și regresie Cox) cât și cu ajutorul unei rețele neuronale artificiale - RNA. Au fost incluși în studiu 74 pacienți ai clinicii ORTOVET, 41 câini și 33 pisici, diagnosticați cu carcinom de glandă mamară între 2002 și 2014. Au fost cuantificați și introduși în model 22 de factorii de prognostic/predicție: date generale despre pacient (specie, vârsta la diagnosticare, vârsta când tumora a fost observată), date clinice (status limfonodal macroscopic, prezența metastazelor, prezența recidivelor), date anatomopatologice (tipul și gradul histologic, implicarea limfonodurilor, dimensiunea fractală a regiunilor de cromatină –**DFRC** - valoarea maximă pentru imaginile histologice din probele de la pacient), parametri sanguini la data diagnosticării (număr/nivel pentru leucocite, neutrofile, monocite, eozinofile, fosfatază alcalină, alanin-transaminază, aspartat-transaminază, creatinină, uree, glucoză), date privind terapia (status gonadal, chemoterapie, chirurgie excizională, AINS). Componenta RNA a modelului **OncoVetNeuralNet** a permis concluzia că **DFRC – dimensiunea fractală a regiunilor de cromatină este un factor de prognostic important** (în primele trei poziții dintre cei 22 predictorii) pentru câinii și pisicile diagnosticați cu cancer. Studiul a stabilit că și vârsta la diagnosticare, mărimea tumorii, numărul/nivelul în sânge pentru leucocite, neutrofile, alanin-transaminază, creatinină la momentul diagnosticării sunt *factori de prognostic* relevanți pentru estimarea timpului de supraviețuire. De asemenea, tratamentul cu AINS și ovariectomia sunt *factori de predicție* cu impact favorabil asupra timpului de supraviețuire.

Concluziile generale și recomandările sunt incluse în capitolul final al lucrării. Tot aici sunt menționate succint unele aplicații extinse ale rezultatelor acestei

cercetări, având în vedere că procedurile pentru prelucrarea imaginilor și analiza lor fractală dezvoltate în *Studiul 1* și *Studiul 2* au devenit între timp instrumente operaționale de cercetare în Laboratorul de anatomie patologică al FMV-USAMV București; în consecință, de la nivelul acestui laborator au fost comunicate în ultimii ani rezultate ale aplicării analizei fractale în studierea fibrozării hepatice, a adipocitelor și țesutului adipos, în identificarea modalității în care s-a realizat prepararea termică a cărnii destinate hranei umane, în prefigurarea unor noi metode de cercetare a tranziției epitelio-mezenchimale.

Partea I Studiu bibliografic are 28 pagini, reprezentând 15.5 % din lucrare.

Partea a II-a Cercetări originale cuprinde 153 pagini, reprezentând 84.5 % din lucrare. Este alcătuită din 8 capitole: **Materiale și metode**, 6 capitole cuprinzând cele 6 studii ale cercetării și capitolul de **Concluzii, aplicații și recomandări**.

În cele două părți ale lucrării sunt incluse 82 figuri (dintre care 7 sunt reproduse din lucrările din bibliografie) și 30 tabele.

Bibliografia cuprinde 216 titluri de lucrări.

Anexele cuprind detalii privind drepturile de reproducere pentru cele 7 figuri preluate din lucrări din bibliografie, lista lucrărilor publicate de doctorand, *Curriculum vitae* și memoriul său de activitate.

Lucrarea are un total de 250 pagini (**Rezumat** în română/engleză/franceză, **Cuprins** în română/engleză/franceză, **Introducere** în română/engleză, **Partea I**, **Partea a II-a**, **Bibliografie**, **Anexe**).