



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII
Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC
PLATFORMĂ INOVATIVĂ PENTRU DIAGNOSTICUL, STADIALIZAREA ȘI
PROGNOSTICUL TUMORILOR HEPATICE
[INNOLIVER]

Contract 34 din 27/08/2020 (PN-III-P1-1.1-TE-2019-1974)

Director: Prof. Univ. Dr. Costin-Teodor Streba

Etapa 1 - Conceperea bazei de date, sistemului de analiza a imaginilor si sistemului de diagnostic computerizat, testarea acestora si compararea cu standardul de aur - faza 2

Perioada de raportare: 01/01/2021 - 31/12/2021

A doua etapă a proiectului s-a întins pe 12 luni (Ianuarie-Decembrie 2021) și a inclus patru activități: Conceperea bazei de date, sistemului de analiza a imaginilor si sistemului de diagnostic computerizat - faza 2 (activitatea 2.1), Testarea ansamblului baza de date - sistem de analiza a imaginilor - sistem de diagnostic computerizat, prin proceduri medicale - faza 2 (activitatea 2.2), Compararea capabilităților ansamblului baza de date - sistem de analiza a imaginilor - sistem de diagnostic computerizat, cu standardul de aur - faza 2 (activitatea 2.3) și Diseminare si analiza statistica - faza 2 (activitatea 2.4).

Toate obiectivele au fost îndeplinite, realizându-se chiar un indicator suplimentar de rezultat – un al doilea articol trimis spre publicare într-o revistă indexată ISI.

- 1x raport tehnic intermediar privind baza de date structurata, software interfață analiză pCLE si sistem de diagnostic computerizat bazat pe rețele neuronale convolutive;
- 2x Articol trimis spre publicare în reviste indexate ISI Web of Science (proof);
- 1x Propunere de brevet (depusa la OSIM).

A1.1 Conceperea bazei de date, sistemului de analiza a imaginilor si sistemului de diagnostic computerizat - faza 2

Grad de îndeplinire: 100%

Baza de date concepută în cadrul etapei anterioare a fost îmbunătățită semnificativ prin implementarea unor tehnologii de ultimă oră.

- Metoda de accesare a datelor cu cheie de criptare pe 256 biți:
 - De la distanță prin protocoale SSL securizate (tip https)
 - Local prin intermediul Intranetului existent la nivel de Universitate.
- Posibilitățile de asigurare a securității înregistrării și utilizării:
 - Folosirea de combinații de nume și parolă care să constrângă utilizatorul să utilizeze
 - O adresă de e-mail instituțională ca nume de utilizator
 - O combinație completă de minim 8 caractere (litere, inclusiv capitale, cifre, semne de punctuație și simboluri) în cazul parolei
- Stocare și back-up-ul în timp real pe servere proprii, securizate:
 - În acest scop am achiziționat în cadrul proiectului un sistem de stocare tip NAS (Network Attached Storage) accesibil securizat atât din interiorul Universității, cât și de la distanță.
 - NAS-ul a fost configurat în RAID 1 (datele sunt scrise 1:1 în două partiții fizic separate, pentru redundanță și securitate sporită).
- Un firewall fizic la nivel de Universitate, care protejează rețeaua internă și porturile deschise – asigură astfel o comunicare eficientă și sigură cu *cloud*-ul securizat.
- Pentru a asigura o viteză optimă de procesare a datelor, stația de lucru achiziționată în cadrul proiectului, care rulează rețelele neuronale dezvoltate în cadrul activității 2.2, este situată în vecinătatea sistemului NAS, cu legătură fizică prin cablu UTP cu acesta pentru un transfer optim de date (viteze gigabit)
- Sistemul de rețele neuronale funcționează cu ajutorul unor *script*-uri dedicate pentru filtrarea și partajarea informației între rețelele neuronale tip deep learning.
- Anonimizarea datelor se face încă de la colectarea acestora, fiind atribuite coduri unice pacienților. Toate datele medicale au fost colectate local, cu respectarea GDPR și după obținerea acordului informat al subiecților.

În **figura 1** se poate observa o diagramă de funcționare a sistemului în ansamblu.

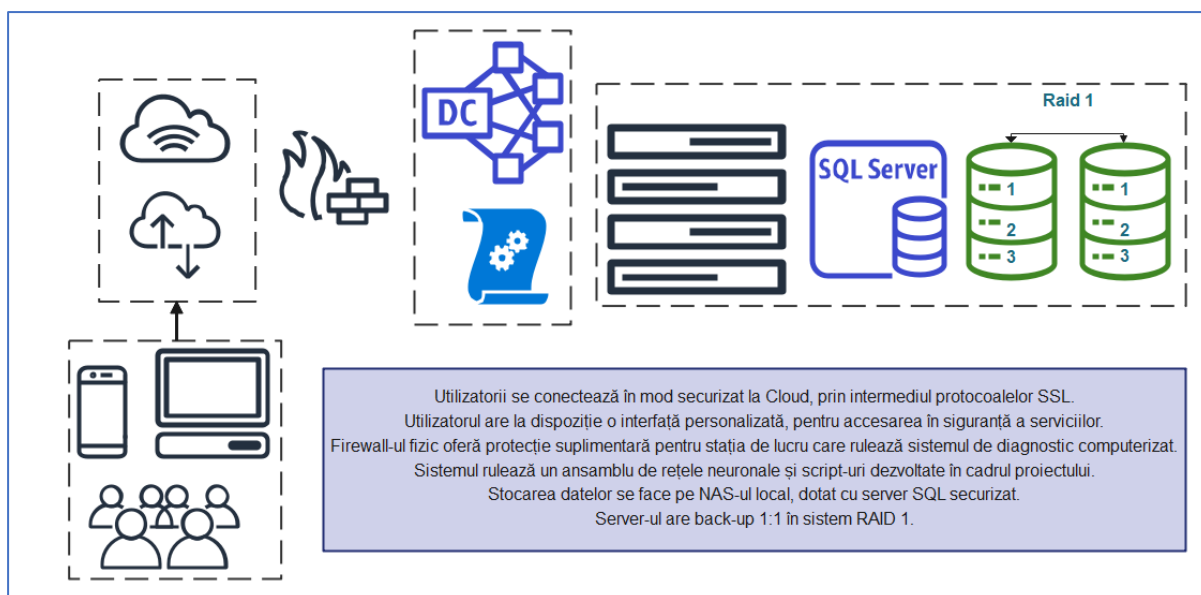


Figura 1. Schema de funcționare a sistemului pus la punct în cadrul proiectului.

Aplicația rulează într-un browser web fără să fie nevoie de instalarea altor pachete pe mașina de lucru. Accesul în aplicație se realizează exclusiv cu nume de utilizator și parolă. Nu există nicio resursă publică în cadrul aplicației cu excepția paginii de autentificare.

Figura 2. Interfața de acces în baza de date.

Pentru executarea aplicației este nevoie de conexiune la internet (fie prin fir, fie wireless) și un browser web modern. Aplicația funcționează cu următoarele browsere web:

- Google Chrome
- Safari
- Opera
- Firefox
- Internet Explorer / Edge

Fiind o aplicație web, nu există limitări în ceea ce privește sistemul de operare. Astfel, funcționează în sistemele dotate cu Windows, mac OS, Linux sau în sistemele mobile dotate fie cu Android fie cu iOS.

Conturile în aplicație sunt generate, în acest moment, doar în cadrul proiectului, interfața fiind în stadiul de testare.

Odată rezultatul finalizat, se vor putea genera date de intrare noi, pentru utilizatori implicați care doresc să își creeze propriile baze de date cu ajutorul sistemului (din motive de siguranță, accesul la baza de date formată în cadrul proiectului nu va fi pusă la dispoziție într-o primă fază).

Secvența de logare va cuprinde următoarele etape-cheie:

1. Utilizatorul trebuie să instaleze una din cele două aplicații pentru autentificare: Google Authenticator sau Microsoft Authenticator. Ambele aplicații sunt compatibile atât cu iOS cât și cu Android

2. În pagina de activare din aplicație există un cod QR și un cod normal. Utilizatorul are posibilitatea de a opta fie să scaneze codul QR în aplicația aleasă fie să îl introducă manual.

3. După scanare, aplicația de generare a codurilor de autentificare recunoaște aplicația și aceasta va genera un cod pe care utilizatorul trebuie să îl introducă la ultimul pas din ecranul de activare.

Codurile pentru autentificarea în aplicație expiră în 30 de secunde. După activarea autentificării în doi pași, utilizatorul se va autentifica în aplicație folosind parola și codul general de aplicația Google Authenticator sau Microsoft Authenticator.

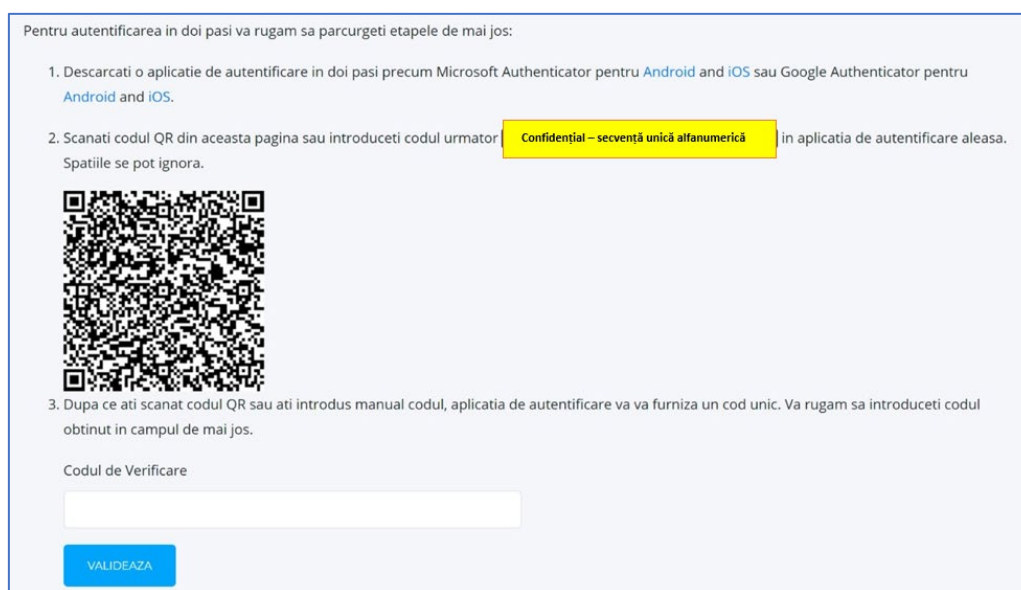
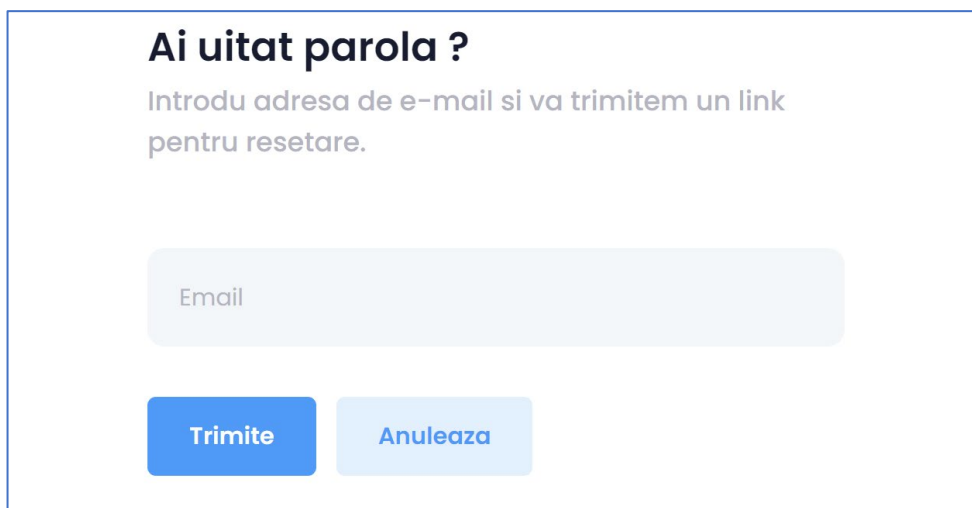


Figura 3. Cod QR generat în cadrul procedurii de log-in a aplicației bază de date

În cazul în care parola este uitată de către utilizator, există posibilitatea recuperării acesteia de la distanță, fără a accesa sistemul fizic. Această operațiune se face prin intermediul e-mail-ului instituțional, securizat, și nu implică trecerea peste procedeul de autentificare în doi pași, care rămâne valabil pentru utilizator.



Ai uitat parola ?

Introdu adresa de e-mail si va trimitem un link pentru resetare.

Email

Trimite Anuleaza

Figura 4. *Interfața pentru generarea unei noi parole securizate.*

Stocarea parolelor utilizatorilor **nu se face ca text simplu**. Parolele sunt stocate folosind metoda **salting passwords** astfel: În momentul în care un utilizator își modifică sau creează parola, la aceasta se adaugă un text generat aleatoriu. Acest text se numește **salt** și se adaugă la parola adăugată de utilizator. Textul format din cele două se stochează **criptat** în coloana **PasswordHash**. Textul generat aleatoriu (**salt**) se adăugă în coloana **SecurityStamp**.

Procedura se repetă și la fiecare autentificare. Dacă un utilizator introduce o parola greșită de mai mult de 3 ori, contul acestuia se blochează pentru 2 ore. De asemenea, utilizatorii au posibilitatea să activeze autentificarea în doi pași.

În **figura 5** se poate observa că un controller nu are acces în mod direct la baza de date și nici la clasa care implementează contextul bazei de date. Un controller trimite solicitarea către un serviciu iar serviciul respectiv decide de unde este livrată informația către controller. Din testele efectuate, am ajuns la concluzia că durata cât este ținută informația în memoria tampon până la resetare este de 100 de secunde. Dar, în situația în care aplicația primește foarte multe solicitări din partea utilizatorilor, timpul acesta poate crește. Așa că, am decis ca această valoare să fie memorată într-un fișier de configurare astfel încât să se poată actualiza facil.

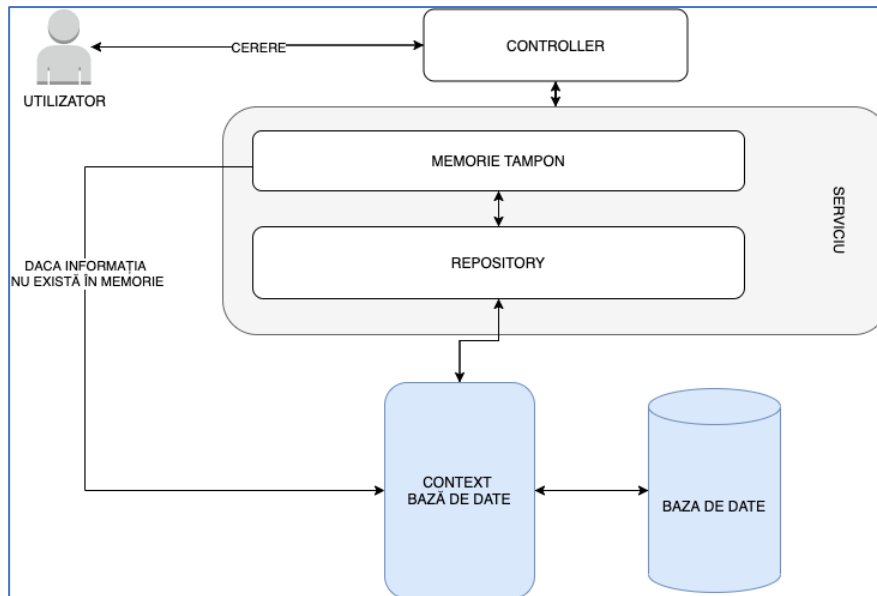


Figura 5. Fluxul informației în baza de date.

Pentru fiecare serviciu există o interfață care definește în mod clar operațiile care se pot realiza în serviciul respectiv. Fiecare clasă care este definită ca un serviciu trebuie să implementeze interfața serviciului respectiv. În caz contrar, clasa respectivă nu se poate adăuga în controller (constrângere de implementare). O instanță a unei clase de tip serviciu este adăugată în controller la pornirea aplicației și este folosită sub forma unui **singleton**. Un **singleton** este un șablon de proiectare prin care se asigură că o anumită clasă se poate instanția o singură dată. Am ales acest șablon de proiectare deoarece un astfel de serviciu trebuie să fie unic pe toată durata execuției aplicației. Diagrama de proiectare a acestui șablon este reprezentată în **figura 6**.

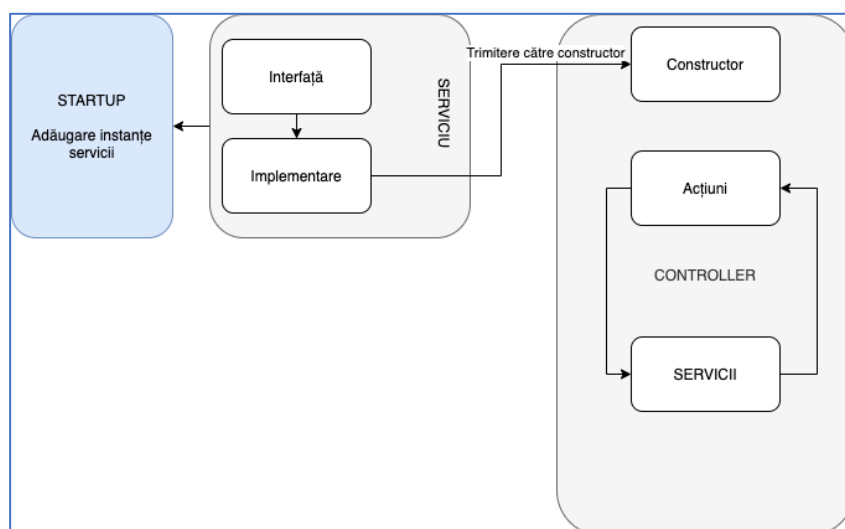


Figura 6. Diagrama de proiectare a unui sigleton

A1.2 Testarea ansamblului baza de date - sistem de analiza a imaginilor - sistem de diagnostic computerizat, prin proceduri medicale - faza 1

Grad de îndeplinire: 100%

Pentru studiul din această activitate am folosit probe de țesut obținute intra-operator, cât și fragmente tisulare obținute prin biopsie hepatică.

În vederea asigurării respectării legislației în vigoare, am solicitat și obținut în timp util acordul Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie din Craiova pentru studiul care a implicat subiecți umani.

Acordul pacientului a fost obligatoriu, atât în cadrul includerii cât mai ales pentru recoltarea materialului biptic. De asemenea, ne-am asigurat că am recoltat o cantitate suficientă de țesut în vederea diagnosticului normal, iar în eventualitatea existenței unui fragment utilizabil, fără a leza în vreun fel parcursul diagnostic normal, acesta a fost folosit în cadrul studiului, respectând astfel în totalitate recomandările de bune-practici existente la nivel internațional.

Model pentru formularul de acceptare

Titlul studiului:
Platforma inovativă pentru diagnosticul, stadializarea și prognosticul tumorilor hepatice.

Numele cercetătorului principal: STREBA COSTIN-TEODOR

Datele participantului:
Numele:
Prenumele:
Adresa:
Sexul:
Data nașterii:

Subsemnatul _____, sau reprezentantul meu legal, am citit și înțeles descrierea acestui studiu, scopurile pe care și le propune, durata preconizată, procedurile care vor avea loc, riscurile cunoscute și neplăcerile pe care le poate cauza, beneficiile așteptate, tratamentele alternative, dezvăluirea datelor mele medicale, (plata) și tratamentul complicațiilor produse în timpul studiului, și posibilitatea de a încheia acest studiu fără consimțământul meu.

Iau parte la acest studiu conform propriei mele voințe. Voi putea să mă retrag oricând sau să retrag autorizația de utilizare și eliberare a datelor mele de sănătate după semnarea acestui formular de acceptare, fără ca această retragere să influențeze îngrijirea de care voi beneficia acum și în viitor sau să determine pierderea unor beneficii la care am dreptul. Consimțământul meu nu influențează drepturile mele legale privind lipsa de îngrijire sau neglijența persoanelor implicate în acest studiu. Semnătura mea semnifică faptul că am citit (sau mi-au fost citite) informațiile anterioare, că întrebările mele au primit un răspuns satisfăcător și că de fiecare dată când voi avea întrebări voi putea discuta cu cercetătorul al cărui nume este trecut mai sus.


Informații sensibile privind starea de sănătate
Sunt de acord să permit eliberarea informațiilor medicale privind infecția cu virusul HIV/SIDA, abuzul de droguri sau/și alcool, tulburările de comportament, afecțiunile psihiatrice.

Numele participantului _____	Semnătura participantului _____	Data/Ora _____
Numele martorului _____	Semnătura martorului _____	Data/Ora _____

Am explicat acest studiu participantului. Consider că participantul își exprimă consimțământul în mod liber și fiind bine informat are capacitatea legală de a-și da consimțământul informat pentru a participa în cadrul acestui studiu.

Numele cercetătorului _____	Semnătura cercetătorului _____	Data/ora _____
-----------------------------	--------------------------------	----------------

Figura 7. Modelul formularului de acceptare în studiu, agreeat de Comisia de Etică a UMF din Craiova.


MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII
UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
Comisia de Etică și Deontologie Universitară și Științifică
Nr. 40/29.03.2021

Raport de avizare a proiectului de cercetare
Comisia de Etică și Deontologie Universitară și Științifică

Pentru studiul (proiectul de cercetare)


PLATFORMA INOVATIVĂ PENTRU DIAGNOSTICUL, STADIALIZAREA ȘI PROGNOSTICUL TUMORILOR HEPATICE

Conducătorul proiectului de cercetare: Streba Costin - Teodor
Echipe de cercetare: Pirici Daniel, Ghișona Ioana, Șerbanescu Mircea Sebastian, Oblieaga Cosmin, Ungureanu Bogdan Silviu, Streba Liliana, Rosu (Nicola) Gabriela - Camelia.

Confirmăm că orientările Codului de Etică Universitară a Universității de Medicină și Farmacie din Craiova au fost consultate și că toate problemele de etică și implicațiile în legătură cu proiectul de mai sus au fost luate în considerare, iar procedurile studiului au fost urmate în conformitate cu aceste linii directoare.

Au fost respectate principiile etice care stau la baza Declarației de la Helsinki și a Codului de Etică Universitară cu privire la buna desfășurare a cercetării, împreună cu codurile de practică stabilite de către Codul de deontologie medicală.

Avizare: DA <input checked="" type="checkbox"/> NU <input type="checkbox"/> în ședința Comisiei din data 29.03.2021
--

Președinte Comisia de Etică și Deontologie
Universitară și Științifică,
Prof. univ. dr. Vlăcea Ionică-Daniel


Craiova, Str. Petru Rareș Nr. 2, Cod 200349, Jud. Dolj, ROMANIA
Tel: + 40351 443 500, Int. 4022; E-mail: cosmin.critica@umfcv.ro

Figura 8. Acordul Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie din Craiova

În **figura 7** am redat un exemplu de formular de acceptare a includerii în studiu, în formatul agreed de Comisia de Etică a Universității. În **figura 8** se poate observa acordul Comisiei de etică, nr. 40 din 29.03.2021.

Proba de țesut hepatic folosită în cadrul activității 1.2 a fost obținută în baza acordului exprimat de către pacient în cadrul procedurilor standard intra-spitalicești, includerea în studiu nefiind făcută prospectiv și având doar rolul de testare a fezabilității metodei.

În ceea ce privește formularul de informare, pacientului i-au fost explicate clar și cuprinzător toate elementele studiului, într-un limbaj accesibil și fără a denatura în vreun fel natura și scopul procedurilor. Formularul de acceptare are 5 pagini și se bazează pe legislația națională și internațională existentă în acest moment. Am stipulat în mod explicit procedurile și programul vizitelor, explicând pacientului necesitatea recoltării țesutului. Numele tuturor celor implicați în proiect (echipa de cercetare) a fost explicit pusă la dispoziția pacienților, aceștia având la dispoziție un număr de contact al Directorului de Proiect.

De asemenea, am menționat Responsabilitățile pacientului odată intrat în studiu, posibilitățile de retragere (stipulând explicit lipsa oricărei consecințe pentru acesta în cazul retragerii). Toate riscurile, disconfortul eventual și orice neplăcere posibilă cauzată de studiu au fost explicate în acest document, alături de beneficiile potențiale (“Nu veți avea parte de beneficii materiale în urma acestui studiu. Cu toate acestea, participarea dumneavoastră ar putea contribui la acumularea de cunoștințe medicale privind obiectul studiului.”).

Drepturile participantului au fost explicit menționate, cât și date despre confidențialitatea studiului și a înregistrărilor medicale.

Am menționat în mod clar utilizarea și dezvăluirea informațiilor privind starea de sănătate, în acord cu legislația în vigoare. Am stipulat lipsa costurilor și am reiterat faptul că toate investigațiile fac parte din parcursul normal al pacientului, fără a aduce vreun prejudiciu sau a influența diagnosticul și procedurile medicale.

Scurtă descriere a sistemului testat în cadrul proiectului

La început rețelele neuronale artificiale erau compuse dintr-o funcție de activare (care conținea o pondere) și o valoare fixă (bias). Datorită structurii relativ precare, s-a demonstrat matematic că sunt de ajuns două straturi ascunse de neuroni cu această arhitectura pentru a aproxima orice funcție. Odată cu apariția rețelelor neuronale convoluționale, care în loc de pondere au o matrice de valori numită kernel sau filtru teorema cu cele maxim două straturi ascunse nu se mai poate aplica, lăsând astfel loc conceptului de deep learning – rețele neuronale cu adâncime mai mare ca doi (deep = adânc).

Rețele de tip deep learning revoluționează toate domeniile din "computer vision" dar în mod special revoluționează imagistica medicală, cu toate aspectele ei de la imagini din domeniul radiologiei în tonuri de gri, până la imagini colorate histologic – color și chiar imagini multispectrale/compozite cu mai mult de 3 dimensiuni.

Proiectarea unei rețele de deep learning

Când proiectăm o nouă arhitectură pentru deep learning, primul pas este întotdeauna pregătirea datelor. Dorim să aflăm ceva despre datele noastre și să le procesăm dacă este necesar. Este important să avem o idee despre numărul de eșantioane, numărul de caracteristici, intervalele de date, dacă există intrări evident ciudate sau erori tipografice și așa mai departe. În mod obișnuit, vom folosi apoi instrumente de vizualizare pentru a reprezenta o parte sau toate datele, astfel încât să înțelegem datele. Există modele evidente pe care le putem exploata? Există duplicate pe care le putem elimina? De asemenea, putem rula teste statistice pentru a ajuta la identificarea modelelor și tendințelor pe care nu le putem vedea cu ochii, în special dacă datele au mai mult de trei dimensiuni. În funcție de ceea ce intenționăm să facem cu datele noastre, le putem transforma sau mapa. De exemplu, am putea folosi o metodă pentru a analiza și simplifica datele noastre prin eliminarea sau combinarea caracteristicilor. O etapă finală tipică de pre-procesare pentru rețelele neuronale este standardizarea unora sau a tuturor caracteristicilor, astfel încât acestea să aibă o medie de 0 și o abatere standard de 1.

Odată ce avem în vedere structura generală, trebuie să alegem valori pentru parametrii din fiecare strat. Cele mai multe straturi au valori implicite utile pentru majoritatea parametrilor, dar de obicei vom dori să înlocuim cel puțin unele dintre aceste valori pentru a se potrivi mai bine cu datele noastre și cu procesarea pe care dorim să o aplicăm acestora. Apoi trebuie să selectăm hiperparametrii sau valorile care se aplică rețelei în ansamblu. În general, cel mai important hiperparametru care trebuie corectat este rata de învățare. Următorul pas este să folosim efectiv sistemul, rularea acestuia cu datele de antrenament și apoi evaluarea performanței sale pe datele de testare.

Dacă ar exista un drum de aur pentru a construi „cea mai bună” arhitectură de învățare profundă pentru o anumită problemă, toată lumea ar urma-o. Dar ceea ce avem în schimb este o colecție bogată de publicații de arhitecturi care, în cele din urmă, au funcționat bine pentru diferite aplicații. Aceasta este una dintre marile valori ale competițiilor online de învățare automată, cum ar fi Kaggle, în care un număr mare de oameni concurează pentru a proiecta un sistem de învățare care oferă cele mai bune rezultate pe un anumit set de date. Avantajul

competițiilor este că putem apoi să le implementăm din nou abordările și chiar să le importăm dacă dezvoltatorii și-au împărtășit ponderile finale. Putem apoi experimenta cu acel model.

Tipuri de straturi în rețelele de tip deep learning

Pentru a crea arhitecturi vom face combinații de straturi de diverse tipuri pe care le vom descrie pentru a înțelege ce fac și cum le putem folosi.

Straturi de intrare (input layers)

1. Strat de intrare a imaginii 2D într-o rețea; aplică normalizarea datelor.
2. Strat de intrare a imaginii 3D într-o rețea - introduce imagini sau volume 3D într-o rețea și aplică normalizarea datelor.

Convolution and Fully Connected Layers

1. Strat convoluțional 1-D

Un strat convoluțional 1-D aplică filtre convoluționale glisante la intrarea 1-D. Stratul implică intrarea prin deplasarea filtrelor de-a lungul intrării și calculând produsul punctual al greutateților și al intrării, apoi adăugând bias.

Dimensiunea pe care se întinde stratul depinde de intrarea stratului:

- Pentru introducerea seriilor de timp și a secvențelor vectoriale (date cu trei dimensiuni corespunzătoare canalelor, observațiilor și pașilor de timp), stratul convolvează peste dimensiunea de timp.
- Pentru introducerea imaginii 1-D (date cu trei dimensiuni corespunzătoare pixelilor spațiali, canalelor și observațiilor), stratul convolvează peste dimensiunea spațială.
- Pentru intrarea desecvențe de imagini 1-D (date cu patru dimensiuni corespunzând pixelilor spațiali, canalelor, observațiilor și pașilor de timp), stratul convolvează peste dimensiunea spațială.

2. *Strat convoluțional 2-D*

Un strat convoluțional 2-D aplică filtre convoluționale glisante la intrarea 2-D. Stratul implică intrarea prin deplasarea filtrelor de-a lungul intrării pe verticală și orizontală și calculând produsul punctual al greutateților și al intrării, apoi adăugând un bias.

Există o mare variație de interpretări

3. *Strat convoluțional 3-D*

Un strat convoluțional 3-D aplică filtre de convoluție cuboidale glisante la intrarea 3-D. Stratul implică intrarea prin deplasarea filtrelor de-a lungul intrării pe verticală, orizontală și

de-a lungul adâncimii, calculând produsul punctual al greutateilor și al intrării și apoi adăugând un bias.

4. Strat convoluțional grupat 2-D

Un strat convoluțional grupat 2D separă canalele de intrare în grupuri și aplică filtre convoluționale glisante. Utilizăm straturi convoluționale grupate pentru convoluția separabilă în funcție de canal (cunoscută și ca separabilă în funcție de adâncime). Pentru fiecare grup, stratul implică intrarea prin deplasarea filtrelor de-a lungul intrării pe verticală și orizontală și calculând produsul punctual al greutateilor și al intrării, apoi adăugând un bias. Stratul combină în mod independent circumvoluțiile pentru fiecare grup. Dacă numărul de grupuri este egal cu numărul de canale, atunci acest strat efectuează o convoluție în funcție de canal.

5. Strat de convoluție 2-D transpus

Un strat de convoluție 2-D transpus eșantionează hărți caracteristice. Acest strat este uneori cunoscut incorect ca strat „deconvoluție” (deconv). Acest strat este transpunerea convoluției și nu efectuează deconvoluția.

6. Strat de convoluție 3-D transpus

Un strat de convoluție 3-D transpus prelungește hărțile de caracteristici tridimensionale, similar celui 2-D.

7. Fully connected layere

Un strat complet conectat înmulțește intrarea cu o matrice de ponderi și apoi adaugă un vector bias.

Straturi de normalizare, dropout și ajustare a dimensiunilor imaginilor

1. Strat Batch normalization

Un strat de normalizare a lotului normalizează un mini-lot de date pentru toate observațiile pentru fiecare canal în mod independent. Pentru a accelera antrenamentul rețelei neuronale convoluționale și a reduce sensibilitatea la inițializarea rețelei, utilizați straturi de normalizare a loturilor între straturi convoluționale și neliniarități, cum ar fi straturile ReLU.

După normalizare, stratul scalează intrarea cu un factor de scară γ care poate fi ponderat și îl deplasează cu un offset β care, de asemenea, poate fi ponderat.

2. Strat Dropout

Un strat dropout setează aleatoriu elementele de intrare la zero cu o probabilitate dată.

Straturi de Pooling și Unpooling

1. Average pooling

Un strat de average pooling 1-D efectuează downsampling prin împărțirea intrării în regiuni de pooling 1-D, apoi calculând media fiecărei regiuni.

Dimensiunea peste care se adună stratul depinde de intrarea stratului:

- Pentru introducerea seriilor temporale și a secvenței vectoriale (date cu trei dimensiuni corespunzătoare canalelor, observațiilor și pașilor de timp), stratul se adună peste dimensiunea de timp.
- Pentru intrarea imaginii 1-D (date cu trei dimensiuni corespunzătoare pixelilor spațiali, canalelor și observațiilor), stratul se adună peste dimensiunea spațială.
- Pentru intrarea de secvențe de imagini 1-D (date cu patru dimensiuni corespunzătoare pixelilor spațiali, canalelor, observațiilor și pașilor de timp), stratul se adună peste dimensiunea spațială.

2. Max pooling

Un strat de pooling 1-D max efectuează downsampling prin împărțirea intrării în regiuni de pooling 1-D, apoi calculând maximumul fiecărei regiuni. Aplicarea și interpretarea sunt similare average pooling.

Straturi de ieșire

În funcție de aplicație există multiple straturi de ieșire, dar pentru aplicația noastră vom descrie doar stratul de clasificare.

3. Strat de Clasificare

Un strat de clasificare calculează pierderea de entropie încrucișată pentru sarcinile de clasificare și clasificare ponderată cu clase care se exclud reciproc.

Stratul deduce numărul de clase din dimensiunea de ieșire a stratului anterior. De exemplu, pentru a specifica numărul de clase K ale rețelei, puteți include un strat complet conectat cu dimensiunea de ieșire K și un strat softmax înaintea stratului de clasificare.

În figurile 9-11 am descris procedura de marcarea zonelor de imagine în endomicroscopia confocală laser. Acest pas este esențial pentru antrenarea cu succes a sistemului, etapă în care practic calculatorul “învață” să recunoască elemente de imagine care pot să fie apoi folosite în cadrul diagnosticului computerizat.

Codurile de culoare alese au fost folosite de sistem în diferențierea unei zone care trebuie ignorată (culoarea siclam) – aceste elemente ar putea introduce în cadrul sistemului un bias semnificativ, putând fi interpretate ca fals pozitive (zone tumorale în absența acestora).

Marcarea zonelor în roșu (tumoral) și albastru (parenchim normal) a fost aleasă pentru a putea face o expunere clară a acestor caracteristici, astfel încât ansamblul de rețele neuronale

convoluționale să clasifice corect pattern-urile de țesut din imagine și a putea emite o clasificare exactă.

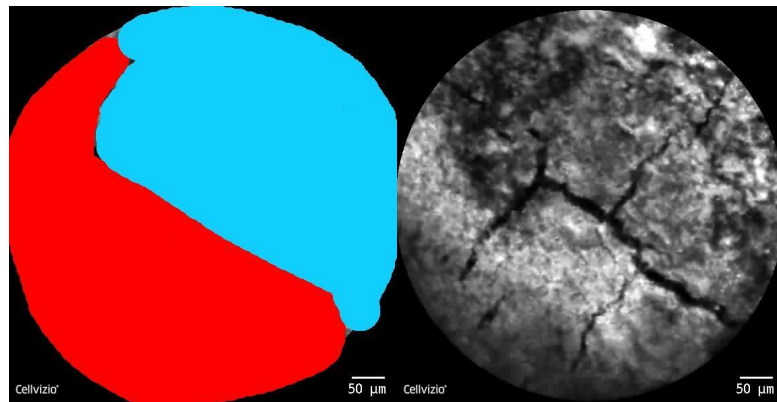


Figura 9. *Aspect normal – parenchim hepatic vizualizat prin pCLE (dreapta). Analiză computerizată (stânga) – marcarea a zonelor de interes pentru antrenarea rețelei neuronale (roșu – zona tumorală, albastru – zonă parenchim normal).*

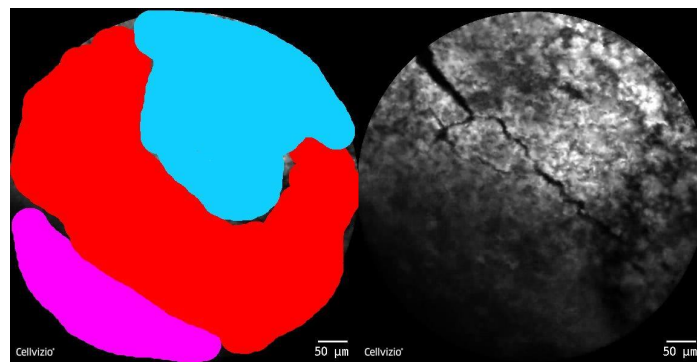


Figura 10. *Analiză computerizată a unei imagini pCLE care conține artefact de tip 1 (zonă fără semn) în cadranul inferior stâng. Pentru marcarea în acest caz am folosit o schema de trei culori, cu siclam marcând zona artefact pe care sistemul trebuie să o ignore.*

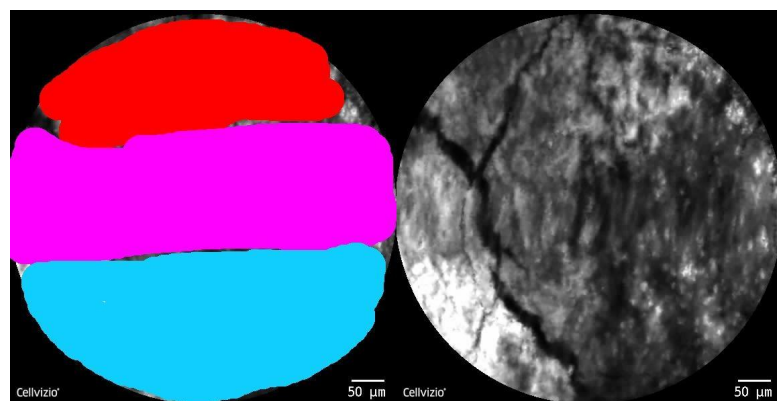


Figura 11. Imagine pCLE cu artefact de tip 2 – bandă centrală de intensitate diferită și rezoluție diferită. Sistemul este antrenat să ignore zona (marcată cu siclam).

A2.3 Compararea capabilitatilor ansamblului baza de date - sistem de analiza a imaginilor - sistem de diagnostic computerizat, cu standardul de aur - faza 2

Grad de îndeplinire: 100%

Rolul biopsiei hepatice în contextul proiectului

Biopsia hepatică și evaluarea histologică a parenchimului hepatic pot fi încă numite „standarde de aur” în diagnosticul și stadializarea bolii asociate. Cu toate acestea, biopsia hepatică în sine implică o serie de riscuri și disconfort inerent pentru pacient. Odată cu disponibilitatea tot mai mare a altor metode non-invazive utilizate în mod obișnuit în diagnosticarea și stadializarea bolilor hepatice, mulți dezbat necesitatea și implicațiile etice ale prelevării de țesuturi.

Biopsie chirurgicală sau laparoscopică a cunoscut de asemenea abordări noi pentru biopsia hepatică, fiind preferată la pacienții cu afectare peritoneală când este prezent un cancer abdominal, cu ascită asociată sau boală peritoneală cu ascită de origine hepatică suspectată. De asemenea, leziunile hepatice focale pot fi vizate pentru biopsie prin canalul laparoscopic. Biopsia poate fi astfel efectuată fie cu sisteme de ace normale, fie prin rezeecție complexă, care poate furniza o cantitate mare de țesut. Cu toate acestea, abordarea ulterioară poate suprastadializa tumora, deoarece rezeecția se efectuează prea aproape de capsula fibrotică care învăluie ficatul. În comparație directă cu biopsia percutanată, abordarea laparoscopică oferă un nivel mai ridicat de acuratețe deoarece permite evaluarea peritoneului înconjurător.

Țesutul hepatic obținut prin biopsie este transferat rapid într-o soluție tampon, de obicei 4% sau 10% formol neutru, pentru a evita modificările pe care le poate suferi din cauza autolizei enzimelor hepatice. Acesta poate fi apoi supus la diferite tehnici de preparare, în conformitate cu ce teste de diagnostic vor urma cu acea probă specifică (secțiune congelată, detecție ARN etc.).

Un fragment de biopsie adecvat are o lungime între 1 și 4 cm, cântărind între 10 și 50 mg, cu un diametru minim de 1 mm. Pentru a reprezenta în mod corespunzător arhitectura parenchimală, cel puțin 10-11 tracturi portal ar trebui să fie complet prezente, șase fiind un număr minim acceptabil. Specimenele de lungimi inadecvate conduc de obicei la substadierea fibrozei și subestimează gradul inflamației. Parenchimul cirotic este de obicei fragmentat prin biopsie, ducând astfel la erori de prelevare de aproximativ 20%.

Întrucât se apreciază că o probă de biopsie hepatică reprezintă 1/50 000 din masa totală de organ, discuții cu privire la cât de reprezentativ poate fi pentru leziunile difuze au existat întotdeauna în literatură. S-a demonstrat că mărimea eșantionului este direct corelată cu o subestimare a modificărilor țesutului, cu un efect direct asupra stadializării ulterioare. De aceea este nevoie ca tehnica de investigare a țesutului să prezinte cu rapiditate și siguranță maximă un rezultat verificabil pentru medicul operator, încă din momentul intervenției.

O altă problemă foarte dezbătută în literatură este variabilitatea inter-observatori. Toate interpretările sunt supuse experienței și pregătirii patologului, care este o variabilă independentă în sine, separată de erorile inerente de eșantionare și procedurale. O a doua opinie este întotdeauna recomandată, iar în majoritatea centrelor mari de referință sunt prezenți doi patologi. De asemenea, este de preferat colaborarea dintre patolog și clinicianul care efectuează biopsia hepatică, așa cum au indicat unele studii. Hiperplazia nodulară regenerativă sau ciroza macronodulară pot fi uneori clasificate ca parenchim normal, iar variațiile inerente ale infiltratului celular inflamator normal pot fi înșelătoare pentru un patolog fără experiență atunci când observă leziuni inflamatorii de grad scăzut. Nodulii mai mari de 2 centimetri descoperiți prin ecografie de rutină ar trebui să fie diagnosticați în mod ideal prin proceduri non-invasive; totuși, atunci când constatările radiologice sunt atipice, trebuie obținută o biopsie hepatică ca confirmare.

Cea mai recentă dezvoltare în evaluarea histologică a structurilor gastrointestinale este endomicroscopia laser confocală. Permite evaluarea *in vivo* a displaziei și tumorilor maligne ale tractului gastrointestinal sau pentru a obține biopsii direcționate care să permită diagnostice rapide și mai precise. Primele exemple de realizare ale acestei tehnici au necesitat ca endoscoape dedicate să fie utilizate pentru evaluarea structurilor cavitare accesibile de la ambele capete ale tractului digestiv.

Progresele recente au reușit să miniaturizeze tehnologia, astfel încât miniprobe de imagistică să poată fi conectată la 30.000 de fire de fibră optică care permit detectarea punct-la-punct în timp real la 12 cadre/sec. Dispozitivul de imagistică în sine măsoară mai puțin de 1,5 milimetri în diametru, permițând astfel utilizarea sa prin ace de biopsie 19G sau tru-cut, sau inserarea prin laparoscopie. Această tehnologie permite imagistica *in vivo*, în timp real, a histologiei hepatice, îmbunătățind din punct de vedere tehnic capacitățile biopsiei hepatice. Câteva studii pe modele animale există în literatură, care detaliază utilizarea pCLE pentru imagistica histologică hepatică.

Compararea cu standardul de aur (imagini de anatomie patologică și imunohistochimie)

Blocurile de țesut încorporate în parafină au fost secționare cu o grosime de 5 μm și lamele au fost procesate pentru detectarea imunohistochimică individuală a E-Cadherin (iepure, clona 24E10, Semnalizare celulară, diluată la 1:300) și Aquaporină 1 (șoarece, Thermo Scientific, clona OTI2D10, diluată ca 1:400).

Secțiunile au fost deparafinate, rehidratate în serii descrescătoare de alcool, prelucrate pentru recuperarea antigenului prin punerea la microunde în tampon citrat 0,1 M pH6 timp de 20 de minute, incubate în peroxid de hidrogen 1% în apă distilată timp de 30 de minute pentru a bloca activitatea peroxidazei endogene și păstrate încă o dată. 30 de minute în lapte degresat 3% în PBS pentru blocarea situsurilor antigenului nespecific. Pentru imunohistochimia enzimatică unică, anticorprii primari au fost incubați pe lame la 4°C timp de 18 ore, iar a doua zi semnalul a fost amplificat timp de 60 de minute utilizând un sistem pe bază de polimer peroxidază specific speciei adsorbit pentru imunoglobuline umane (Nikirei Bioscience, Tokyo, Japonia). Semnalul a fost apoi detectat cu 3,3'-diaminobenzidină (DAB) (Nikirei-Bioscience) și lamelele au fost acoperite în DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Statele Unite) după o contracolorare cu hematoxilina. Controalele negative au fost obținute prin omiterea anticorpilor primari, iar modelele de colorare intrinseci în țesutul hepatic normal au fost utilizate ca martori pozitivi.

Pentru imunohistochimie dublă cu fluorescență, lamele au fost prelucrate ca mai sus, incubate simultan peste noapte cu ambii anticorpi primari, iar în a doua zi au fost incubate în continuare cu un amestec de sistem pe bază de polimer anti-peroxidază de șoarece (Nikirei Bioscience) și Alexa Fluor anti- iepure. 596 de anticorpi secundari (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA; 1:300, 2 ore la temperatura camerei). Semnalul AQP1 a fost amplificat în continuare și detectat cu o etapă de precipitare Alexa-488-tiramidă (Thermo Scientific, 1:200, 10 minute). În toate cazurile, lamele au fost contracolorate cu 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) timp de 15 minute, incubate timp de 20 de secunde într-o soluție alcoolică 0,3% Sudan Black (Sigma-Aldrich) la reduce autofluorescența, spălate în apă distilată și acoperite cu un mediu de montare fluorescent anti-decolorare (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Statele Unite).

Microscopia cu lumină transmisă și imagistica prin fluorescență au fost efectuate utilizând un microscop motorizat Nikon 90i (Nikon Europe BV, Amsterdam, Țările de Jos) echipat cu o cameră DS-Ri Nikon CMOS de înaltă rezoluție și zgomot redus de 16 Mp și o sursă de fluorescență LED. După confirmarea colorării pe imunohistochimie enzimatică, pentru analiza semicantitativă, imaginile au fost captate pe lame colorate cu fluorescență, iar imaginile au fost capturate utilizând obiectivul 40×. Imaginile au fost obținute prin scanarea

secvențială a fiecărui canal cu perechi specifice de filtre personalizate extrem de selective pentru a elimina diafonia fluoroforilor și pentru a asigura o cuantificare fiabilă pentru spectrele DAPI, Alexa 488 și Alexa 594 (Chroma Technology Corp. , Bellows Falls, VT, SUA). Toate datele de imagine cu fluorescență au fost procesate pentru deconvoluție oarbă utilizând algoritmi de deconvoluție Nikon, la 5 iterații.

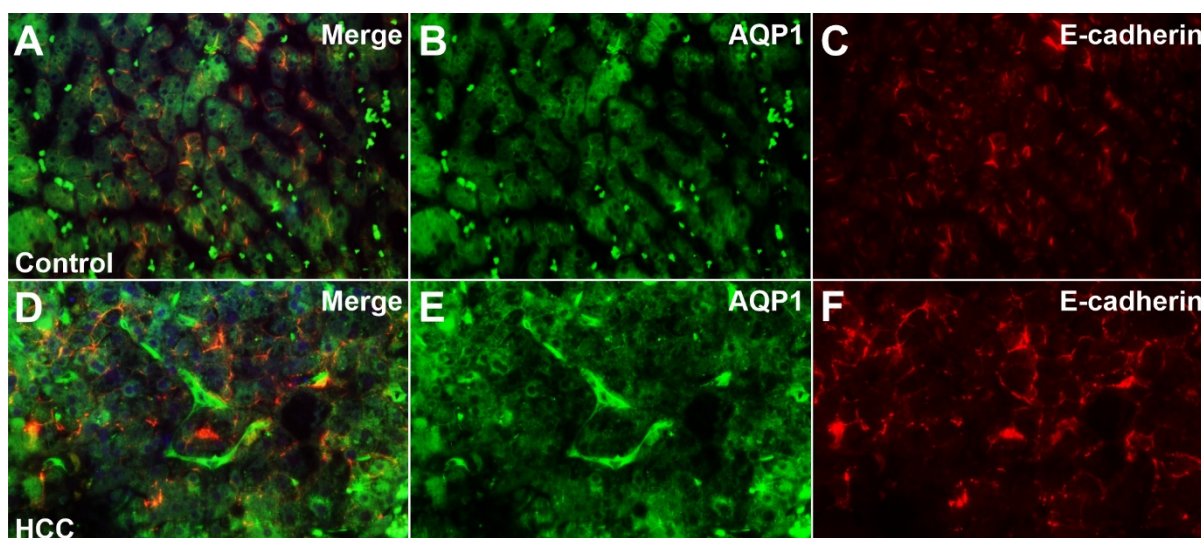
Deoarece am vizat numai epiteliul tumoral prin această analiză, înainte de orice cuantificare, în toate seturile de imagini cu fluorescență stroma, vasele de sânge și canalele biliare au fost îndepărtate manual și, prin urmare, nu au fost luate în considerare în continuare. Toate semnalele fluorescente au fost cuantificate ca zonă și apoi raportate ca procent din epiteliul total din imaginea respectivă utilizând software-ul de analiză a imaginii Image-Pro Plus AMS 7 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, Statele Unite). Au fost mediate procentele pentru toate imaginile din fiecare diapozitiv (pacient) și apoi diapozitivele de la pacienți cu aceeași gradare patologică.

Mai mult, gradele de colocalizare E-cadherină și Aquaporină 1 au fost calculate în software-ul de analiză a imaginii Image-Pro Plus AMS 7, utilizând colocalizarea dintre canalele lor de fluorescență respective și au fost raportate ca coeficienți care se suprapun.

Nr.	Init	Ani	Gen	Recoltare	Rezultat anatomopatologic
1	TC	51	F	03.2021	Metastaza de melanom malign. Se remarca prezenta câtorva fibre musculare striate. Proliferare celulara constituita din celule cu aspect epitelioid sau fuziform, cu marcat polimorfism citonuclear, pigment brun intra- si extracelular.
2	GA	65	F	05.2021	Metastaza hepatica segment VII. Metastaza de adenocarcinom slab diferentiat, cu zone de necroza tumorala si zone hemoragice. Biopsie peritoneala: Structura microscopica de tesut fibrocolagen si adipos cu multiple fire de catgut si inflamatie xantogranulomatoasa gigantocelulara nespecifica, de corp strain.
3	PP	79	M	06.2021	Ciroză hepatică. Structură microscopică de parenchim hepatic cu prezența de noduli de regenerare cu degenerescență granulară și steatoză hepatocitară, intensă fibroză colagenă, bogat infiltrat inflamator limfoplasmocitar, hiperplazia canaliculelor biliare.
4	HS	41	M	07.2021	Carcinom hepatocelular. Zonă de tumora malignă (cel mai probabil carcinom) slab diferențiat, infiltrativ, solid, cu prezența de emboli tumorali în vase de calibru mic.
5	UM	66	F	07.2021	Adenom hepatic/nodul displazic (borderline). Parenchim hepatic cu degenerescență granulară hepatocitară, zone de fibroză și adiacent proliferare celulară epitelială

					hepatocitară cu dispoziție glomeruloidă cu hepatocite de talie variabilă binucleate pe alocuri, cu prezența de nucleoli, hiperemie vasculară.
6.	MG	71	M	10.2021	Nodul displazic (Borderline) – parenchim hepatic cu arhitectura distorsionată, fibroza intensă și infiltrate inflamator limfoplasmocitar în spațiile porte, hepatocyte mărite de volum uni/bi nucleate, anizocarie nucleară cu degenerescență granulară, izolate sau în grupuri înconjurate de fibroza și reactive inflamatorice cronice, colestază.
7	BS	71	M	10.2021	Carcinom hepatocelular cu pattern steatohepatitic. Hepatocite cu citoplasma eozinofilă și nuclei ușor pleiomorfi, rare multinucleeri, steato macro și microveziculară (aprox. 5%). Tendința la pseudorezetare. Grupuri de hepatocite balonizate și corpi Mallory, focare de inflamație limfocitară (2-3 focare / x200) Frecvente aspecte de apoptoză și necroză litică focală, nuclei glicogenați, fibroză perisinusoidal difuză și sub formă de tracturi fibroase groase cu dispoziție lamelară, care nu includ spații porte și tind să schițeze noduli.
8	DP	64	M	10.2021	Carcinom hepatocelular convențional bine diferențiat cu pattern de creștere mixt trabecular și pseudoglandular. Proliferare tumorală cu celule poligonale cu citoplasmă eozinofilă, pleiomorfism nuclear redus și rari nucleoli, cu pattern de creștere trabecular și glandular, grupuri de celule neoplazice cu colestază ușoară
9	DN	74	M	11.2021	Carcinom hepatocelular. Proliferări celulare epitelale maligne cu dispoziție pseudoglandulară și trabeculară, leziuni de degenerescență granulară hepatocitară, redus infiltrat inflamator cronic în spațiile porte.

Tabelul 1. Listă pacienți incluși în studiu în urma unei biopsii hepatice, analizate prin endomicroscopie confocală laser.



A2.4 Diseminare si analiza statistica - faza 2

Grad de îndeplinire: peste 100%

Datele numerice continue obținute au fost exportate și reprezentate grafic în Microsoft Office Excel 2010 și au fost analizate folosind software-ul SPSS (IBM SPSS Statistics, Versiunea 20.0). Pentru a evalua diferențele statistice, am folosit ANOVA unidirecțională (ANOVA - analiza varianței) cu analiză post-hoc Least Significant Difference (LSD) pentru a compara mediile a mai mult de două grupuri.

Corelațiile au fost evaluate folosind coeficientul de corelație al lui Pearson. Datele au fost raportate ca medie ± Eroare standard a mediei (SEM) și, în toate cazurile, $p < 0,05$ a fost utilizat pentru a indica semnificația statistică.

Pentru diseminarea eficientă a rezultatelor proiectului, am pus la punct două site-uri dedicate:

<http://umfcv.ro/34-te> - la nivel instituțional, în cadrul infrastructurii UMF Craiova
www.innoliver.ro





Pe site-ul instituțional umfcv.ro/34-te sunt disponibile rapoartele tehnice și restul informațiilor specifice proiectului.

În cadrul site-ului innoliver.ro sunt puse la dispoziția echipei baza de date a pacienților și restul uneltelor dedicate bunei funcționări a proiectului.

Am trimis spre publicare două articole în reviste medicale de specialitate indexate ISI Web of Science, cu acknowledgement-ul explicit, și o cerere de brevet de invenție înregistrată la OSIM.

Articole trimise spre publicare în revistă de specialitate (indexate ISI Web of Science):

1. *Urhut CM, Sandulescu LD, Sandulescu SM, **Streba L, Streba CT**, Iovanescu V, Danoiu S. Hepatocellular carcinoma with gastrointestinal involvement: a case report and a systematic review. **Diagnostics**, 2021 – In press. – **Factor de impact 3,706***

			
		Systematic review	1
		Hepatocellular carcinoma with gastrointestinal involvement: a case report and a systematic review	2
			3
		<small>Cristiana Marinela Urhut, Larisa D Sandulescu and Sarmis M Sandulescu ^{2*}, Liliana Streba, Costin Streba, Vlad F Iovanescu, Suzana Danoiu</small>	4
			5

Acknowledgments: This work was supported by a grant of the Romanian Ministry of Education and Research, CNCS - UEFISCDI, project number PN-III-P1-1.1-TE-2019-1474, within PNCDI III

2. Ciurea AM, Popp CG, Pirici D, Streba CT, Cercelaru L, Pirici I, Vere CC. E-Cadherin and Aquaporin 1 co-expression analysis in hepatocellular carcinoma: a pilot study. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, 2021 – In press. – **Factor de impact 1,033**

Brevet de invenție – depus la OSIM în data de 03.12.2021 – nr. registratură OSIM A100725/03 Decembrie 2021 (indexate ISI Web of Science):

CERERE DE BREVET DE INVENTIE	
Nr. referinta solicitant/mandatar 1737/6.12.2021	Registratura OSIM (numarul si data primirii): A100725 03 DEC 2021
Se completează de către OSIM	
Numarul cererii de brevet de invenție	
Data primirii la Registratura Generala a OSIM	
Data de depozit	
Data primirii partii lipsa la Registratura Generala a OSIM	
Data de depozit după primirea părții lipsă la Registratura Generală a OSIM	
Data primirii cererii de retragere a partii lipsa la Registratura Generala a OSIM	
Data de depozit atribuita cererii de brevet	
1. Solicitanți (nume și prenume/denumire, adresă de domiciliu/sediu, telefon, fax, e-mail) UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA, Str. Petru Rareș Nr. 2, Craiova 200349, tel. 0722389906, e-mail costinstreba@gmail.com	
<input type="checkbox"/> continuare pe pag. 3	
2. Solicitam în baza Legii nr. 64/1991 privind brevetele de invenție, republicată, modificată prin Legea nr.83/2014 privind invențiile de serviciu acordarea unui brevet de invenție cu titlul: Sistem pentru asistența rezecției hepatice laparoscopice bazat pe inteligență artificială și imagistică	
2.1. Solicitantul este îndreptățit la depunerea cererii de brevet de invenție în baza : <input type="checkbox"/> Legii nr. 64/1991 privind brevetele de invenție, republicată; <input type="checkbox"/> Legii nr.83/2014 privind invențiile de serviciu. <input checked="" type="checkbox"/> unui contract de cercetare	

Director proiect

Prof. Univ. Dr. Costin-Teodor Streba