



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0021046

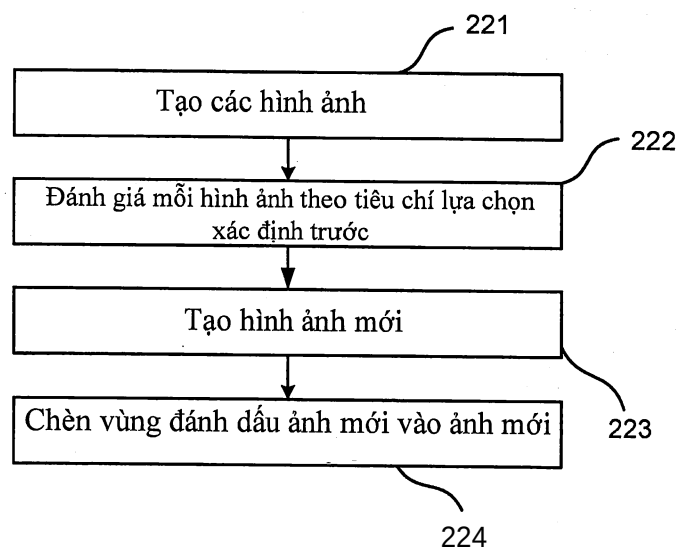
(51)⁷ **G06T 7/00, G06K 9/62, G06T 9/00,**
11/00

(13) **B**

- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|-----------------|------------|
| (21) | 1-2014-00178 | (22) | 27.07.2012 | | |
| (86) | PCT/SE2012/050851 | 27.07.2012 | (87) | WO2013/015740A1 | 31.01.2013 |
| (30) | 1150724-1 | 28.07.2011 | SE | | |
| | 61/512,617 | 28.07.2011 | US | | |
| (45) | 25.06.2019 | 375 | (43) | 25.03.2015 | 324 |
| (73) | MEDETECT AB (SE)
Medicon Village, S-223 81 Lund, Sweden | | | | |
| (72) | ERJEFAELT, Jonas (SE) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.) | | | | |

(54) **PHƯƠNG PHÁP PHÂN BIỆT CÁC VÙNG TRONG CHUỖI GỒM N ẢNH SỐ SƠ CẤP, PHƯƠNG PHÁP HIỂN THỊ CÁC NHÓM TẾ BÀO NẪM TRONG LÁT CẮT MÔ VI PHẪU VÀ PHƯƠNG PHÁP HIỂN THỊ PHÂN BỐ BA CHIỀU CỦA NHIỀU NHÓM TẾ BÀO VÀ CẤU TRÚC TẾ BÀO NẪM TRONG CÙNG MỘT KHÔNG GIAN BA CHIỀU TRONG MẪU MÔ VI PHẪU**

(57) Sáng chế đề cập tới phương pháp phân biệt các vùng trong chuỗi các ảnh số, phương pháp này bao gồm các bước: tạo ra chuỗi các hình ảnh bao gồm các vùng đánh dấu chưa được xác định; đánh giá mọi hình ảnh I_n với $1 \leq n \leq N$ theo tiêu chí lựa chọn xác định trước và xác định các vùng đánh dấu ảnh là các vùng đánh dấu chưa được xác định đáp ứng tiêu chí lựa chọn xác định trước; tạo ra ảnh mới I_{new} ; và chèn các vùng đánh dấu ảnh mới vào ảnh mới I_{new} , các vùng đánh dấu ảnh mới này có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong ảnh I_n nhưng không ở trong ảnh I_{n-1} , và các vùng đánh dấu ảnh mới nêu trên là có thể nhận diện được trong I_{new} nhờ đặc điểm đơn nhất. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp hiển thị các nhóm tế bào trong các lát cắt mô của mẫu mô vi phẫu. Ngoài ra, sáng chế còn bộc lộ phương pháp hiển thị phân bố ba chiều của các nhóm tế bào trong mẫu mô vi phẫu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới lĩnh vực hóa mô miễn dịch cũng như phân tích hình ảnh dựa trên máy tính. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp phân biệt các vùng trong các chuỗi hình ảnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phương pháp phân tích mẫu mô vi phẫu thường được sử dụng cho các mục đích chẩn đoán, ví dụ, phân tích mẫu mô vú để chẩn đoán ung thư vú, hoặc cho các mục đích nghiên cứu, ví dụ, nghiên cứu các loại tế bào để viêm trong các điều kiện viêm như bệnh hen suyễn, xơ vữa động mạch, hoặc các bệnh viêm ruột.

Hóa mô miễn dịch (IHC), trong đó chất đánh dấu (nghĩa là kháng nguyên) được phát hiện bởi kháng thể đặc hiệu kháng nguyên, thường được sử dụng để nhận diện các tế bào trong các lát cắt mô vi phẫu. Lý tưởng là, việc nhận diện một loại tế bào có thể đạt được bằng cách phát hiện một kháng nguyên đặc hiệu tế bào. Tuy nhiên, với các tổ hợp nhiều loại tế bào của nhiều kháng nguyên cần phải được phân tích để nhận diện chính xác.

Mô bị nhiễm bệnh bất kỳ thường đi kèm theo thành phần tế bào đã bị thay đổi. Ví dụ, khi đường hô hấp bị viêm trong bệnh hen suyễn, thành phần của các tế bào cấu trúc tạo nên các đường hô hấp, như các tế bào biểu mô, các tế bào tuyến, các tế bào mạch máu, các tế bào thần kinh, v.v... có sự thay đổi. Ngoài ra, nhiều loại tế bào miễn dịch (nghĩa là các bạch cầu) thâm nhập vào các đường hô hấp đã bị nhiễm bệnh.

Trong nhiều bệnh, bệnh lý (nghĩa là các biến đổi gây phá hủy) trong mô không bị gây ra bởi một loại tế bào mà bởi tương tác phức tạp giữa nhiều loại tế bào. Do đó, khi phát hiện mẫu mô bị bệnh, thường mong muốn nghiên cứu nhiều nhóm tế bào và các cấu trúc mô. Thông tin về hàm lượng tế bào có thể thu được bằng cách nhuộm màu một loại

tế bào tại thời điểm đó trong các lát cắt liên tiếp. Mặc dù các phương pháp tiếp cận này cung cấp một ước lượng tốt về hàm lượng nhiều loại tế bào trong mẫu mô, nhưng nó không cung cấp thông tin chi tiết về quan hệ không gian (nghĩa là quan hệ vật lý) giữa các loại tế bào được phân tích.

Để phát hiện chi tiết hơn cách mà thành phần của các tế bào có thể chỉ ra các tình trạng bệnh cụ thể hoặc để nghiên cứu cách mà các tế bào tương tác và quan hệ với nhau bên trong mô bị bệnh, cần phát triển được các phương tiện để hiển thị được nhiều loại tế bào nằm trong cùng một không gian ba chiều, ví dụ nằm trong một lát cắt mô đơn.

Với các kỹ thuật IHC hiện có, có thể nhuộm lên tới 4 loại tế bào trong một lát cắt, bằng cách sử dụng kỹ thuật đa chất nhuộm hoặc kỹ thuật đa huỳnh quang miễn dịch. Tuy nhiên, trong thực hành thông thường, thường chỉ có 2 loại tế bào có thể được phát hiện đồng thời do thiếu các hỗn hợp kháng thể phát hiện sơ cấp thích hợp.

Để tăng số lượng chất đánh dấu trong một lát cắt mô, các phương pháp mới đã được phát triển, như kỹ thuật SIMPLE được bộc lộ trong WO 2010/115089 và kỹ thuật MELC (Schubert và cộng sự, Nature Biotechnology v. 24, pp. 1270-1278). Mặc dù có hiệu lực nhưng các loại kỹ thuật mới này chủ yếu được phát triển cho các nghiên cứu định vị đồng thời và bao gồm các quy trình phá hủy mô, các quy trình bao gồm việc phá hủy các nhóm phát hiện, hoặc phụ thuộc vào các kháng thể sơ cấp được đánh dấu bằng phân tử phát hiện, các đặc điểm làm hạn chế số lượng chất đánh dấu tế bào có thể được nhuộm màu.

Do các kỹ thuật được đề cập tới ở trên chủ yếu được phát triển cho các nghiên cứu định vị đồng thời nên chúng không giải quyết được thực tế là có nhiều chất đánh dấu nhận diện đôi khi có thể có mặt trên các loại tế bào không được nhắm tới.

Do đó, cần phải có các phương pháp kỹ thuật mới mà nhờ đó một số lượng lớn các loại tế bào có thể được nhận diện một cách chính xác, đồng thời trong cùng một không gian vật lý, như một lát cắt mô. Lý tưởng là, kỹ thuật bất kỳ này có thể có khả năng phân tích toàn bộ lát cắt lớn của các mẫu và cung cấp thông tin chi tiết về tất cả các tế bào riêng biệt được đánh dấu như các tọa độ không gian của chúng trong mô, các thông số kích thước và hình dạng của chúng, v.v..

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế này đề xuất phương pháp phân biệt các vùng trong các chuỗi N ảnh số sơ cấp trong đó, N là số nguyên >1 , nhờ đó tạo ảnh mới, phương pháp nêu trên bao gồm các bước:

a) tạo ra chuỗi N ảnh số sơ cấp bao gồm các vùng đánh dấu chưa được xác định, trong đó, ảnh I_{n+1} bao gồm ít nhất cùng một lượng các vùng đánh dấu chưa được xác định với ảnh số sơ cấp I_n với $2 \leq n \leq N$, trong đó, n là số nguyên;

b) đánh giá mọi ảnh số sơ cấp I_n với $1 \leq n \leq N$ theo tiêu chí lựa chọn định trước và xác định các vùng đánh dấu ảnh là các vùng đánh dấu chưa được xác định thỏa mãn tiêu chí lựa chọn định trước này, và lưu thông tin về vùng đánh dấu ảnh bất kỳ này trong hoặc liên kết/kết hợp với ảnh số thứ cấp tạo thành tương ứng, nhờ đó thu được chuỗi gồm N ảnh số thứ cấp;

c) tạo ra ảnh mới I_{new} ;

d) với mọi n với $2 \leq n \leq N$ của chuỗi các ảnh số thứ cấp thu được trong bước b), chèn các vùng đánh dấu ảnh mới vào ảnh mới I_{new} , các vùng đánh dấu ảnh mới nêu trên có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong ảnh I_n nhưng không ở trong ảnh I_{n-1} , và các vùng đánh dấu ảnh mới nêu trên có thể nhận diện được trong I_{new} nhờ đặc điểm duy nhất;

e) chèn các vùng đánh dấu ảnh mới trong ảnh mới I_{new} , các vùng đánh dấu ảnh mới nêu trên có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong ảnh I_1 và các vùng đánh dấu ảnh nêu trên là có thể nhận diện được trong I_{new} , nhờ đặc điểm đơn nhất.

Tốt hơn là, bước tạo ra ảnh mới I_{new} bao gồm tạo ra ảnh của mẫu mô.

Tốt hơn là, ảnh mới I_{new} là bản sao của một trong các ảnh trong chuỗi các hình ảnh nêu trên.

Tốt hơn là, đặc điểm đơn nhất nêu trên trong các bước d) và e) là đặc điểm có trị số đơn nhất cho mỗi n , $1 \leq n \leq N$.

Tốt hơn là, đặc điểm đơn nhất nêu trên là màu sắc chung và trị số đơn nhất nêu trên của đặc điểm đơn nhất nêu trên là màu sắc riêng được kết hợp với chất đánh dấu tế bào cụ thể.

Tốt hơn là, tiêu chí lựa chọn định trước bao gồm ngưỡng cho đặc tính khả kiến của vùng đánh dấu chưa được xác định.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp hiển thị các nhóm tế bào nằm trong lát cắt mô vi phẫu, phương pháp này bao gồm các bước:

a) tạo ra lát cắt mô đã được làm cho sẵn sàng để nhuộm phân tử theo cách đã biết từ trước;

b) tạo ra các chuỗi gồm K phương tiện phát hiện phân tử cụ thể để liên kết đặc hiệu vào và phát hiện các thành phần của chuỗi xác định trước gồm K chất đánh dấu tế bào có thể có mặt trong lát cắt mô của bước a), các phương tiện phát hiện phân tử này có khả năng cung cấp thông tin về đáp ứng có thể khởi động được và có thể phát hiện được, K là số nguyên > 2 ;

c) với mỗi phương tiện trong các phương tiện phát hiện phân tử cụ thể $k=1,2,...,K$ của bước b) thực hiện quy trình sau:

1) cho lát cắt mô của bước a) tiếp xúc với phương tiện phát hiện phân tử cụ thể này tạo ra liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào xác định trước này;

2) rửa lát cắt mô nêu trên để loại bỏ phương tiện phát hiện phân tử không được liên kết với chất đánh dấu tế bào bất kỳ;

3) khởi động đáp ứng từ phương tiện phát hiện phân tử mà có thể đã liên kết với các chất đánh dấu tế bào của lát cắt mô nhờ đó cho phép phát hiện phương tiện phát hiện phân tử này; và

4) khi các phương tiện phát hiện phân tử này có thể được phát hiện, thực hiện quét/chụp ảnh lát cắt mô để tạo ra ảnh số sơ cấp I_k mà có thể chứa một hoặc nhiều vùng đánh dấu chưa được xác định liên quan đến việc tạo ra polyme phát hiện được;

nhờ đó thu được chuỗi gồm K ảnh số sơ cấp I_k với $k=1,..., K$ chứa lượng tăng dần của các vùng đánh dấu chưa được xác định;

d) thực hiện phương pháp theo khía cạnh thứ nhất trên chuỗi gồm K ảnh số sơ cấp I_k với $k=1,..., K$, thu được trong bước c), nhờ đó tạo ra ảnh I_{new} hiển thị các cấu trúc tế bào này.

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp theo khía cạnh thứ hai, các phương tiện phát hiện phân tử nêu trên là tập hợp của các kháng thể, tốt hơn là các kháng thể đơn dòng hoặc các đoạn kháng thể, trong đó, mỗi kháng thể liên kết với chất đánh dấu tế bào

đặc hiệu và trong đó, enzym được liên hợp với mỗi kháng thể, enzym này có khả năng tạo ra thông tin về polyme có thể phát hiện được khi có mặt của một hoặc nhiều cơ chất thích hợp, trong đó, các mục 1) và 2) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho:

i) lát cắt mô của bước a) được tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi xác định trước của các chất đánh dấu tế bào này; kháng thể này được liên hợp với enzym, enzym này có khả năng tạo ra thông tin về polyme có thể phát hiện được khi có mặt của một hoặc nhiều cơ chất thích hợp;

ii) sau bước i) ở trên, lát cắt mô được rửa để loại bỏ các kháng thể không được liên kết; và trong đó, mục 3) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho:

iii) sau mục 2) lát cắt mô được tiếp xúc với một hoặc nhiều cơ chất thích hợp đối với enzym này, dẫn tới việc tạo thành các polyme có thể phát hiện được trong trường hợp thành phần cụ thể nêu trên của chuỗi xác định trước của các chất đánh dấu tế bào có mặt trong lát cắt mô nêu trên.

Theo một phương án được ưu tiên khác của phương pháp theo khía cạnh thứ hai, các phương tiện phát hiện phân tử nêu trên là tập hợp của các phức hợp phân tử, trong đó, mỗi phức hợp bao gồm kháng thể thứ nhất, tốt hơn là kháng thể đơn dòng, liên kết với chất đánh dấu tế bào đặc hiệu, kháng thể thứ hai hoặc đoạn kháng thể, tốt hơn là kháng thể đơn dòng được liên kết đặc hiệu với kháng thể thứ nhất này, và enzym được liên hợp với kháng thể thứ hai này, enzym này có khả năng tạo ra thông tin về polyme có thể phát hiện được khi có mặt một hoặc nhiều cơ chất thích hợp, trong đó, các mục 1) và 2) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho:

i) lát cắt mô của bước a) được tiếp xúc với kháng thể thứ nhất liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi xác định trước nêu trên của các chất đánh dấu tế bào;

ii) sau bước i) ở trên, lát cắt mô được rửa để loại bỏ các kháng thể không được liên kết;

iii) sau bước ii) ở trên, lát cắt mô được tiếp xúc với kháng thể thứ hai liên kết đặc hiệu với kháng thể thứ nhất, kháng thể thứ hai này được liên hợp với enzym, enzym này có khả năng tạo ra thông tin về polyme có thể phát hiện được khi có mặt của một hoặc nhiều cơ chất thích hợp; và

iv) sau bước iii) ở trên, lát cắt mô được rửa để loại bỏ các kháng thể không được liên kết; và trong đó, mục 3) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho:

v) sau mục 2) lát cắt mô được tiếp xúc với một hoặc nhiều cơ chất thích hợp cho enzym này, dẫn tới sự tạo thành các polyme có thể phát hiện được trong trường hợp thành phần cụ thể của chuỗi được xác định trước nêu trên của các chất đánh dấu tế bào có mặt trong lát cắt mô.

Ưu tiên là, enzym này được chọn từ nhóm bao gồm photphataza kiềm và peroxidaza như peroxidaza củ cải ngựa.

Ưu tiên là, cơ chất nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm 3, 3'-diaminobenzidin, xanh lam Ferangi, đỏ Vulcan Fast, xanh lá Vina, và aminoethyl cacbazol (aminoethyl carbazole - AEC). Xanh lá Vina là một ví dụ về cơ chất tạo ra polyme là hòa tan ít nhất một phần trong nước dưới các điều kiện cụ thể. Aminoethyl cacbazol (aminoethyl carbazole - AEC) là ví dụ về cơ chất tạo ra các polyme hòa tan ít nhất một phần trong các rượu thấp hơn như etanol, dưới các điều kiện nhất định. 3,3'-diaminobenzidin, xanh lam Ferangi, và đỏ Vulcan Fast là các ví dụ về các cơ chất tạo ra các polyme không tan.

Cần hiểu rằng các cơ chất và/hoặc các enzym khác nhau có thể được sử dụng trong quá trình thực hiện phương pháp này. Ví dụ, diaminobenzidin có thể được sử dụng làm cơ chất trong quá trình thực hiện đầu tiên theo mục 2), và đỏ bền vững Vulcan có thể được sử dụng làm cơ chất trong quá trình thực hiện tiếp theo của mục 2).

Theo phương án được ưu tiên khác của phương pháp theo khía cạnh thứ hai, các phương tiện phát hiện phân tử này là tập hợp của các thể liên hợp phân tử bao gồm phần nhận biết được liên kết với phần phát hiện, trong đó phần nhận biết này có khả năng liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi xác định trước của các chất đánh dấu tế bào, phần nhận biết này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể như kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng và các đoạn của chúng, và phân tử axit nucleic như phân tử ARN và phân tử ADN, phần phát hiện này là thuốc nhuộm huỳnh quang, thuốc nhuộm huỳnh quang này có khả năng phát bức xạ có bước sóng cụ thể sau khi tiếp xúc với bức xạ kích thích khác với bức xạ đã phát ra này, trong đó mục 3) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho lát cắt mô và các phương tiện phát hiện phân tử bất kỳ đã liên kết vào đó được tiếp xúc với bức xạ kích thích dẫn tới việc phát ra bức xạ có bước sóng cụ thể trong trường hợp

thành phần cụ thể của chuỗi xác định trước nêu trên của các chất đánh dấu tế bào có mặt trong lát cắt mô nêu trên; và trong đó, mục 4) của bước c) được thực hiện khi bức xạ có bước sóng cụ thể này được phát ra.

Theo phương án được ưu tiên khác của phương pháp theo khía cạnh thứ hai, cơ chất tạo ra các polyme hòa tan ít nhất một phần là các polyme có thể phát hiện được, như xanh lá Vina hoặc aminoethyl cacbazol (AEC), được sử dụng. Phương án này còn bao gồm các bước

e) rửa lát cắt mô để loại bỏ các polyme hòa tan có thể phát hiện được; và

f) lặp lại các bước b - d với chuỗi các phương tiện phát hiện phân tử mới.

Phương án này là hữu dụng khi có mặt lượng lớn của các chất đánh dấu tế bào cần được đánh giá.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp hiển thị phân bố ba chiều của nhiều nhóm tế bào và các cấu trúc tế bào nằm trong cùng một không gian ba chiều trong mẫu mô vi phẫu, bao gồm các bước:

i) tạo ra mẫu mô, và cắt mẫu này thành nhiều lát cắt mô chồng lên nhau ban đầu theo cách đã biết từ trước;

ii) thực hiện phương pháp theo khía cạnh thứ hai cho tất cả các lát cắt mô thu được trong bước i); và

iii) chồng chập các hình ảnh thu được trong bước ii) theo các nguyên tắc đã biết, nhờ đó thu được sự hiển thị ba chiều của phân bố ba chiều của nhiều nhóm tế bào và cấu trúc tế bào nằm trong cùng một không gian ba chiều trong mẫu mô vi phẫu.

Các định nghĩa

Trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ sáng chế, các thuật ngữ sau đây sẽ được sử dụng theo các định nghĩa được chỉ ra dưới đây. Trừ khi được xác định theo cách khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây đều có cùng một ý nghĩa như các ý nghĩa đã được biết tới rộng rãi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế này thuộc về. Mặc dù các phương pháp và các vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và các vật liệu được mô tả ở đây đều có thể được sử dụng trong việc thực hiện sáng chế này, nhưng các phương pháp và vật liệu được ưu tiên được mô tả ở đây. Như được sử dụng ở đây, mỗi thuật ngữ trong các thuật ngữ sau có

ý nghĩa liên quan đến nó trong phần này. Các giá trị cụ thể và được ưu tiên hơn được liệt kê dưới đây cho các gốc, các nhóm thế, và các khoảng chỉ để minh họa; chúng không loại trừ các giá trị được xác định khác nằm trong các khoảng được xác định cho các gốc và các nhóm thế này.

Chất đánh dấu tế bào nghĩa là cấu trúc đặc hiệu, phụ thuộc vào loại tế bào, có thể xuất hiện nhiều hơn hoặc ít hơn, thường là ở trên bề mặt của tế bào thuộc loại tế bào này, nhưng đôi khi cũng nằm trong tế bào. Thông thường, chất đánh dấu tế bào là thụ thể có khả năng liên kết đặc hiệu với phân tử đích cụ thể. Chất đánh dấu tế bào này có thể là protein, glycoprotein, hoặc hydrat cacbon, axit nucleic, lipid hoặc loại khác của các phân tử sinh học xuất hiện trong tự nhiên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ biết về các chất đánh dấu tế bào này và các loại tế bào mà trên đó chúng xuất hiện. Sự hiện diện của một hoặc nhiều chất đánh dấu tế bào này có thể chỉ ra rằng tế bào này thuộc lớp hoặc loại tế bào nhất định.

Phương tiện phát hiện phân tử nghĩa là khối kết tập hoặc thể liên hợp hai chức năng bao gồm phần thứ nhất có khả năng liên kết đặc hiệu với chất đánh dấu tế bào cụ thể, và phần thứ hai có khả năng tạo ra đáp ứng có thể phát hiện được.

Nhiều loại khác nhau của phương tiện phát hiện phân tử có thể được sử dụng trong sáng chế này.

Thông thường, phần thứ nhất có khả năng liên kết đặc hiệu với chất đánh dấu tế bào cụ thể có thể là kháng thể hoặc một đoạn của chúng như đoạn Fab, hoặc thể nano (nanobody), hoặc phân tử axit nucleic như phân tử ADN hoặc phân tử ARN hoặc dẫn xuất axit nucleic như PNA. Thông thường, phần thứ hai có khả năng tạo ra đáp ứng có thể phát hiện được có thể là enzym, hoặc hợp chất hóa học có khả năng tạo ra một số loại tín hiệu có thể phát hiện được, như thuốc nhuộm huỳnh quang, khi được cảm ứng bởi tác dụng đặc hiệu.

Phương tiện phát hiện phân tử có thể, theo phương án đơn giản nhất của nó, chứa phần thứ nhất như kháng thể hoặc phân tử axit nucleic mà phần thứ hai như enzym hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang được liên kết với nó. Theo cách khác, phương tiện phát hiện phân tử thích hợp có thể là phức hợp bao gồm phần tử thứ nhất, thường là kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng liên kết đặc hiệu với chất đánh dấu tế bào cụ thể, phần tử thứ hai,

thường là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng, liên kết đặc hiệu với phần tử thứ nhất, và phần tử thứ ba được liên kết với phần tử thứ hai, trong đó, phần tử thứ ba này có thể là enzym hoặc hợp chất hóa học có khả năng tạo ra một số loại tín hiệu có thể phát hiện được, như thuốc nhuộm huỳnh quang, khi được cảm ứng bởi tác dụng đặc hiệu.

Đáp ứng có thể phát hiện được nghĩa là đáp ứng có thể được phát hiện trong bước quét/chụp ảnh theo cách sao cho đáp ứng này có thể được định vị trong hình ảnh được tạo ra bởi bước quét/chụp ảnh nêu trên.

Theo một phương án, đáp ứng có thể phát hiện được là sự tạo thành polyme đục và/hoặc có màu. Các polyme này có thể được tạo thành bằng cách cho các enzym cụ thể mà là một phần của phương tiện phát hiện phân tử tiếp xúc với các cơ chất đặc hiệu cụ thể trong các điều kiện thích hợp. Ví dụ về các enzym thích hợp là photphataza kiềm và peroxidaza, như peroxidaza củ cải ngựa.

Ví dụ về các cơ chất thích hợp cho các enzym này là 3, 3'-diaminobenzidin, xanh lam Ferangi, đỏ bền vững Vulcan, aminoethyl cacbazol (AEC), và xanh lá Vina.

Theo phương án khác, đáp ứng có thể phát hiện được là sự phát bức xạ có bước sóng cụ thể, như bức xạ được phát ra bởi chất hóa học huỳnh quang sau khi bị kích thích.

Theo một phương án khác, các dạng khác của các đáp ứng có thể phát hiện được được sử dụng trong một lần thực hiện duy nhất của phương pháp này.

Ảnh số sơ cấp nghĩa là ảnh số thu được bởi kỹ thuật số hóa trực tiếp (ví dụ, quét phiên hoặc chụp ảnh hiển vi) lát cắt mô. Không thực hiện thêm việc điều chỉnh, biên tập hoặc đánh giá cho hình ảnh này. Hình ảnh như vậy được coi là dữ liệu nguồn thô.

Ảnh số thứ cấp nghĩa là ảnh thu được nhờ một số kiểu biên tập hoặc đánh giá số hóa cho ảnh số sơ cấp. Ảnh số thứ cấp có thể thu được nhờ, ví dụ, việc biên tập và/hoặc đánh giá ảnh số sơ cấp. Do đó, ảnh số sơ cấp được định nghĩa lại là ảnh số thứ cấp.

Vùng đánh dấu chưa được xác định có nghĩa là yếu tố hoặc cấu trúc có thể phát hiện được trong ảnh số sơ cấp của lát cắt mô. Vùng đánh dấu chưa được xác định có thể chỉ thị sự có mặt của các cấu trúc và các yếu tố đục xuất hiện tự nhiên, như các mạch máu và các cơ quan tế bào, trong lát cắt mô hoặc chất màu nội sinh trong các yếu tố mô. Nó cũng có thể chỉ thị sự có mặt của các phương tiện đánh dấu có thể phát hiện được, như polyme có thể phát hiện được hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang, các chất này lại chỉ thị sự

có mặt của chất đánh dấu tế bào mà đã được phát hiện bởi các phương tiện phát hiện phân tử gây ra sự tạo thành polyme này hoặc sự phát bức xạ có thể phát hiện được sau khi kích thích.

Vùng đánh dấu ảnh nghĩa là vùng trong ảnh số thứ cấp của lát cắt mô. Vùng đánh dấu ảnh tương ứng với toàn bộ hoặc một phần của vùng đánh dấu chưa được xác định trong ảnh số sơ cấp. Vùng đánh dấu ảnh thu được bằng cách đánh giá ảnh số sơ cấp, và cụ thể là vùng đánh dấu chưa được xác định của ảnh số sơ cấp, và xác định các vùng đánh dấu ảnh theo tiêu chí lựa chọn cụ thể. Ảnh số thứ cấp chứa các vùng đánh dấu ảnh còn chưa hoặc được kết nối/được kết hợp với thông tin về mỗi vùng đánh dấu ảnh.

Hình dạng của vùng đánh dấu ảnh nghĩa là hình dạng của đường bao ngoài của vùng này. Đã biết nhiều phương pháp để xác định hình dạng của các vùng trong ảnh số, nằm trong phần mềm như ImageJ được cung cấp bởi Viện sức khỏe quốc gia (National Institute of Health - NIH) và Photoshop® được cung cấp bởi Adobe®.

Vị trí của vùng trong ảnh nghĩa là vị trí mà vùng nằm trong ảnh. Cùng một vị trí đối với một vùng trong các hình ảnh khác nhau nghĩa là

- cùng một vị trí liên quan tới hệ tọa độ được tạo ra tương đương cho các hình ảnh này; hoặc
- vị trí tương ứng cho đối tượng được mô tả, nếu hai hình ảnh mô tả cùng một đối tượng.

Tiêu chí lựa chọn nghĩa là tiêu chí lựa chọn có thể được sử dụng để đánh giá ảnh số sơ cấp để xác định các vùng đánh dấu ảnh. Tiêu chí này có thể, ví dụ, bao gồm các ngưỡng đối với các màu sắc và/hoặc cường độ cho một điểm ảnh hoặc nhóm của các điểm ảnh liên kề trong ảnh. Tiêu chí lựa chọn có thể bao gồm tiêu chí hình dạng, tiêu chí màu sắc, tiêu chí kích thước hoặc các loại tiêu chí khác sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả chi tiết sau đây và sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu. Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật đương nhiên sẽ thực hiện phương pháp này để tối ưu hóa các thông số và tiêu chí lựa chọn cho các tình huống cụ thể.

Đặc điểm đơn nhất nghĩa là đặc điểm của một hoặc nhiều vùng đánh dấu ảnh được nhận diện là loại cụ thể phân biệt với các vùng đánh dấu ảnh khác. Đặc điểm đơn nhất có

thể bao gồm đặc điểm trực quan như màu sắc, ký hiệu, hình dạng, nhãn hoặc là mối liên hệ số hóa giữa các vùng đánh dấu ảnh và loại cụ thể của chúng (ví dụ, loại tế bào sơ cấp). Mối liên hệ này được lưu trong, ví dụ, cơ sở dữ liệu. Đặc điểm đơn nhất có thể là đặc điểm thích hợp khác bất kỳ để phân biệt vùng đánh dấu thuộc loại nhất định trong ảnh số với các vùng đánh dấu thuộc các loại khác.

Đặc điểm này cũng có thể còn được chia thêm thành các giá trị đơn nhất. Ví dụ các phương tiện phát hiện phân tử để phát hiện các chất đánh dấu tế bào tương tự mà không khác biệt có thể nhận diện được nhờ đặc điểm đơn nhất (như màu sắc) và mỗi chất đánh dấu tế bào đơn lẻ có thể được nhận diện bởi trị số đơn nhất (như sắc thái của màu sắc nêu trên).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế này sẽ được mô tả với sự tham khảo tới các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 minh họa thiết bị thực hiện phương pháp theo sáng chế này.

Các Fig.2a-b minh họa phương pháp để phân biệt các vùng đánh dấu trong chuỗi các hình ảnh theo sáng chế.

Fig.3 minh họa đánh giá của ảnh số sơ cấp.

Fig.4 minh họa chuỗi các hình ảnh của lát cắt mô.

Các Fig.5a-b minh họa các hình ảnh được tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế này.

Các Fig.6a-c minh họa các đặc điểm trực quan đơn nhất khác nhau của các vùng đánh dấu ảnh trong các hình ảnh được tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế.

Fig.7 minh họa giao diện đồ họa theo một phương án thực hiện của sáng chế.

Fig.8 minh họa quy trình phát hiện theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế này liên quan tới kỹ thuật được gọi là Nhuộm màu nhiều lần dựa trên việc lọc và loại bỏ một số điểm ảnh được viết tắt là ESMS. Kỹ thuật này có thể tạo ra hình ảnh có độ phân giải cao của lát cắt mô vi phẫu, trong đó nhiều loại tế bào và cấu trúc mô có thể được nhận diện. Các phương pháp phân tích không gian cho nhiều tế bào và nhiều loại tế bào có thể được áp dụng để tạo ra thông tin không gian hữu ích cho lát cắt mô mà không thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết. Sáng chế này dựa trên phát hiện

là thông tin này có thể có giá trị lớn khi phân tích các lát cắt mô. Tác giả sáng chế đề xuất kỹ thuật tạo ra các hình ảnh của lát cắt mô bao gồm thông tin không gian theo cách đơn giản và hiệu quả. Kỹ thuật này còn có thể tạo ra dữ liệu hình ảnh có độ phân giải cao ở dạng ba chiều tạo thuận lợi cho các nghiên cứu về tương tác phức tạp của các tế bào và các cấu trúc mô nằm trong cùng một không gian ba chiều trong mẫu mô.

Phương pháp này tạo ra các hình ảnh kết hợp của các lát cắt mô, mà ngoài việc hiển thị phân bố nhiều chất đánh dấu nằm trong cùng một lát cắt, tạo ra cơ sở để tách thông tin có thể được sử dụng để phân tích toán học tiên tiến các mẫu phân bố của các cấu trúc và các thành phần trong lát cắt mô. Ví dụ về thông tin này là mối quan hệ giữa các thành phần, như các tế bào, hoặc thông tin về các cấu trúc trong các lát cắt được phát hiện bằng cách nhuộm nền màu xanh da trời truyền thống như các cấu trúc mô hoặc các vùng trọng tâm của các tổn thương mô, suy dinh dưỡng, tái định hình mô v.v..

Sáng chế có thể được thực hiện bắt đầu từ mẫu mô bất kỳ có thể được sử dụng để phát hiện các phân tử hoặc các cấu trúc trong nghiên cứu mô. Các ví dụ về việc phát hiện phân tử trong sáng chế liên quan tới các phương pháp mô miễn dịch nhưng các phương pháp khác gồm các phân tử nhuộm màu cũng có thể được sử dụng; ví dụ phương pháp lai hóa tại chỗ, các kỹ thuật liên kết phối tử không phụ thuộc kháng thể, hoặc hóa học mô miễn dịch enzym. Thông thường, trước khi phát hiện phân tử, mẫu mô được nhúng vào trong thuốc hãm (ví dụ, formaldehit được đậm 4%, độ pH=7,6) qua đêm sau đó khử nước trong chuỗi các dung dịch có nồng độ rượu (EtOH) tăng dần và cuối cùng là nhúng vào trong xylen. Sau bước khử nước, mẫu đã khử nước được gắn vào parafin và các lát cắt parafin được tạo ra với thiết bị vi phẫu cắt parafin thông thường. Các lát cắt parafin được gắn trên các phiến kính hiển vi tiêu chuẩn và được bảo quản ở 4°C cho tới khi sử dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã quen thuộc với nhiều chất hãm thích hợp khác nhau và nhiều quy trình hãm cho các loại lát cắt mô khác nhau và do đó họ có thể sử dụng các phương pháp khác này thay cho phương pháp được đề cập tới ở trên, bao gồm các kỹ thuật cắt lạnh.

Trước hóa học mô miễn dịch thực sự (được viết tắt là IHC), các lát cắt parafin được khử parafin hóa và thường được đưa vào phức hồi kháng nguyên nhờ enzym hoặc

cảm ứng nhiệt. Các quy trình này cũng đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Lát cắt mô thu được sau khi khử parafin hóa và phục hồi kháng nguyên cảm ứng nhiệt được đưa vào phát hiện đặc hiệu hơn nữa. Gần như có thể xác định được các loại tế bào và các loại mô được bao gồm trong lát cắt mô này. Để có thể thực hiện điều này, sự xuất hiện của một số chất đánh dấu tế bào đặc hiệu trong lát cắt mô được kiểm tra.

Bảng 1 dưới đây liệt kê một số ví dụ về các chất đánh dấu tế bào miễn dịch thích hợp để sử dụng trong sáng chế, và các tế bào biểu hiện chúng:

Bảng 1: Các chất đánh dấu tế bào để phát hiện bằng IHC các tế bào trong các lát cắt vi phẫu

Chất đánh dấu tế bào	Tế bào sơ cấp
CD20	Các tế bào lympho B
CD8	Các tế bào lympho T
ECP (EG2)	Bạch cầu ưa eozin
CD11c	Các tế bào hình sao tủy, các đại thực bào
Triptaza	Các tế bào không lồ
CD68	Các đại thực bào/bạch cầu đơn nhân (và các tế bào bạch cầu trung tính phụ động)
MPO	Các tế bào bạch cầu trung tính
CD163	Hầu hết các đại thực bào mô (nhưng không ở trong các đại thực bào nang) và các tế bào Langerhan
CD123	Các tế bào tua dạng tương bào, các đại thực bào/bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa eozin
CD68	Các đại thực bào/bạch cầu đơn nhân, các bạch cầu trung tính, bạch cầu ái kiềm, các tế bào lympho lớn
CD45	Tất cả các bạch cầu

Khi xác định được sự hiện diện của chất đánh dấu tế bào trong lát cắt mô theo sáng chế, lát cắt mô được tiếp xúc với phương tiện phát hiện phân tử liên kết đặc hiệu với chất đánh dấu tế bào nêu trên.

Phần thứ nhất của phương tiện phát hiện phân tử có thể là phối tử tự nhiên được liên hợp với chất đánh dấu tế bào mà nó liên kết đặc hiệu vào đó. Theo cách khác, và tốt hơn là, phần thứ nhất này là kháng thể, và thường là kháng thể đơn dòng hoặc một đoạn của chúng.

Phần thứ hai của phương tiện phát hiện phân tử thường chứa enzym có khả năng tạo ra polyme có thể phát hiện được khi có mặt cơ chất thích hợp. Các ví dụ không giới hạn về các enzym này là photphataza kiềm và các peroxidaza, như peroxidaza củ cải ngựa. Các peroxidaza, ví dụ, tạo ra polyme màu nâu có thể phát hiện được khi có mặt cơ chất peroxidaza 3,3'-diaminobenzidin (được viết tắt là DAB), và các photphataza kiềm tạo ra các polyme có thể phát hiện được khi có mặt xanh lam Ferangi và đỏ bền vững Vulcan. Ví dụ không giới hạn khác về cơ chất tạo ra polyme hòa tan ít nhất một phần là xanh lá Vina. Polyme tạo thành từ xanh lá Vina là tan được trong nước trong các điều kiện nhất định. Ví dụ không giới hạn khác về cơ chất tạo ra polyme hòa tan ít nhất một phần là aminoethyl cacbazol (AEC). Polyme tạo thành từ aminoethyl cacbazol là tan được trong các rượu thấp, như etanol, trong các điều kiện nhất định. Các cơ chất khác có thể tạo ra các polyme hòa tan bởi các chất lỏng khác.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tìm được các enzym và cơ chất thích hợp như vậy, hoặc cũng biết rằng, thay cho các enzym, các thuốc nhuộm huỳnh quang có thể được sử dụng để hiển thị các phân tử đánh dấu bởi kính hiển vi huỳnh quang miễn dịch.

Phương tiện phát hiện phân tử có thể được cung cấp dưới dạng thể liên hợp đơn, thường bao gồm kháng thể liên kết với chất đánh dấu tế bào và enzym như peroxidaza hoặc photphataza kiềm, trong đó, kháng thể và enzym này được nối bởi nhóm liên kết hóa học. Theo cách khác, và tốt hơn là, phương tiện phát hiện phân tử được cung cấp dưới dạng khối kết tập phân tử bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng thứ nhất hoặc một đoạn của chúng và kháng thể thứ hai hoặc một đoạn của chúng được liên kết hóa học với enzym như photphataza kiềm hoặc peroxidaza. Phân tử kháng thể thứ hai hoặc một đoạn của chúng liên kết đặc hiệu với kháng thể sơ cấp thứ nhất hoặc một đoạn của chúng, nhờ đó tạo thành khối kết tập phân tử.

Phương pháp theo sáng chế tạo ra cách thức phân biệt nhiều thành phần và cấu trúc trong lát cắt mô và theo đó một chuỗi các phương tiện phát hiện phân tử được sử dụng. Phụ thuộc vào loại cơ quan hoặc mô mà lát cắt mô được lấy ra từ đó cũng như hiểu biết cơ bản về chất đánh dấu tế bào từ nhiều loại tế bào và mô khác, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế chuỗi phương tiện phát hiện phân tử thích hợp cần được sử dụng trong việc phân biệt các loại tế bào và mô trong lát cắt mô.

Cần hiểu rằng nhiều loại phương tiện phát hiện phân tử khác nhau có thể được kết hợp trong một lần thực hiện duy nhất của phương pháp của sáng chế. Điều này có thể có lợi do các thành phần và các cấu trúc này có thể được phân biệt với nhau và với phần xung quanh nó dễ dàng hơn trong quá trình phân tích hình ảnh của các ảnh số sơ cấp.

Theo sáng chế, quy trình phát hiện sau đây cho lát cắt mô được chạy với một phương tiện phát hiện phân tử của chuỗi các phương tiện phát hiện phân tử này tại thời điểm:

1) cho lát cắt mô của bước a) tiếp xúc với phương tiện phát hiện phân tử cụ thể nêu trên gây ra sự liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào đã xác định trước này;

2) rửa lát cắt mô nêu trên để loại bỏ phương tiện phát hiện phân tử không liên kết với chất đánh dấu tế bào bất kỳ;

3) bổ sung cơ chất thích hợp gây ra sự tạo thành polyme có thể phát hiện được;

4) rửa lát cắt mô để loại bỏ cơ chất còn lại; và

5) quét/chụp ảnh lát cắt mô để tạo ra ảnh số sơ cấp có thể chứa một hoặc nhiều vùng đánh dấu ảnh chưa xác định hoặc các vùng liên quan đến việc tạo ra polyme có thể phát hiện được.

Quy trình phát hiện được minh họa như là phương pháp trên Fig.8, trong đó, phương pháp này bao gồm các bước:

- tạo ra (811) lát cắt mô;
- tạo ra (812) các phương tiện phát hiện phân tử;
- cho (813) lát cắt mô tiếp xúc với phương tiện phát hiện phân tử, như được bộc lộ trong bước 1) ở trên;
- rửa (814) lát cắt mô, như được mô tả trong bước 2) trên đây;

- bổ sung (815) cơ chất thích hợp, như được mô tả trong bước 3) ở trên;
- rửa (816) lát cắt mô, như được mô tả trong bước 4) ở trên; và
- chụp ảnh (817) lát cắt mô, như được bộc lộ trong bước 5) ở trên.

Bằng cách lặp lại các bước 812-817, như được chỉ ra bởi 821, cho các phương tiện phát hiện phân tử và các cơ chất khác nhau thích hợp cho nhiều loại tế bào sơ cấp khác nhau, chuỗi các hình ảnh được cung cấp bao gồm các hình ảnh được tạo ra trong bước 817. Ví dụ về chuỗi các hình ảnh được minh họa bởi Fig.4, sẽ được mô tả chi tiết hơn sau đây.

Bước quét/chụp ảnh hiển thị được bao gồm như bước 5 trong quy trình phát hiện có thể được thực hiện với thiết bị quét phiến kính bất kỳ sẵn có trên thị trường được dự định dùng cho lát cắt mô, kính hiển vi được lắp với máy ảnh số hoặc robot quét toàn bộ các phía.

Các bước 812-817 lặp lại có thể được thực hiện theo cách tự động hóa. Như là một ví dụ không giới hạn, kỹ thuật được gọi là buồng phiến có thể được sử dụng cho các bước được lặp lại. Trong kỹ thuật buồng phiến, lát cắt mô được bố trí trong ngăn micro mà phương tiện phát hiện phân tử, chất lỏng rửa, v.v. có thể chảy qua đó. Do đó, các bước 812-817 khác có thể được thực hiện mà không cần phải chuyển mẫu mô tới và từ phương tiện tạo ảnh. Do đó, các hình ảnh sơ cấp có thể được cung cấp có cùng các đặc tính ảnh, như bộc lộ cùng một phần chính xác của mẫu mô này và có cùng một độ sâu tiêu cự. Ngoài ra, phương pháp này có thể được thực hiện theo cách hiệu quả về thời gian hơn và không cần phải thao tác hoặc tương tác thủ công. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận thấy rằng phương pháp này cũng có thể được thực hiện bằng các phương tiện của kỹ thuật tự động hóa khác.

Khi quy trình phát hiện được thực hiện cho toàn bộ các phương tiện phát hiện phân tử của chuỗi này, thì thu được chuỗi các hình ảnh, trong đó có số lượng các điểm màu gia tăng. Các hình ảnh thứ nhất tương ứng với việc xử lý bằng một lượng nhỏ của phương tiện phát hiện phân tử có thể chỉ bao gồm một số ít điểm. Trái lại, hình ảnh cuối cùng sẽ bao gồm vô số điểm và cũng có thể là một số điểm bị nhòe và được mở rộng thành các vùng có màu lớn.

Theo một phương án, chuỗi các hình ảnh có thể được tạo ra bằng cách chụp ảnh lát cắt mô theo quy trình phát hiện sau:

- 1) cho lát cắt mô tiếp xúc với các phương tiện phát hiện phân tử cụ thể gây ra sự liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào xác định trước;
- 2) rửa lát cắt mô để loại bỏ phương tiện phát hiện phân tử mà không được liên kết với chất đánh dấu bề mặt tế bào bất kỳ nào;
- 3) bổ sung các tác nhân phát hiện thích hợp như kháng thể thứ cấp nhận biết kháng thể phát hiện sơ cấp. Thông thường, kháng thể thứ cấp được đánh dấu bằng enzym, ví dụ peroxidaza,
- 4) rửa lát cắt mô để loại bỏ phương tiện phát hiện phân tử không được liên kết với chất đánh dấu bề mặt tế bào bất kỳ;
- 5) bổ sung cơ chất enzym gây ra sự tạo thành polyme có thể phát hiện được;
- 6) rửa lát cắt mô để loại bỏ cơ chất còn lại; và
- 7) quét/chụp ảnh lát cắt mô để tạo ra ảnh số sơ cấp có thể chứa một hoặc nhiều vùng đánh dấu chưa được xác định liên quan đến việc tạo thành polyme có thể phát hiện được.

Như được chỉ ra trong Bảng 1 ở trên, một số chất đánh dấu bề mặt tế bào được kết hợp với một khoảng giới hạn của các tế bào, trong khi đó các chất đánh dấu khác xuất hiện trong một khoảng rộng hơn. Trên Bảng 1, chú ý là CD20 chủ yếu được kết hợp với các tế bào lympho B. Trái lại, CD123 được kết hợp với khoảng gồm nhiều loại tế bào gần như rộng hơn. Khi thiết lập chuỗi phương tiện phát hiện phân tử này, có lợi nếu bao gồm phương tiện phát hiện phân tử chỉ đặc hiệu với số lượng nhỏ của các loại tế bào, và tốt hơn, nếu chỉ là một loại tế bào duy nhất, ở phần đầu của chuỗi của các phương tiện phát hiện phân tử. Sau đó, các cấu trúc và các loại tế bào trùng hợp đã được kết hợp và đã được phát hiện bằng phương tiện phát hiện phân tử thứ nhất có thể được loại trừ khi xác định các cấu trúc và các loại tế bào sử dụng phương tiện phát hiện phân tử đa năng hơn sau đó và độ chính xác của việc nhận diện tế bào được gia tăng. Dựa trên thông tin này, dễ dàng cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để nhận biết chuỗi các chất phát hiện phân tử thích hợp.

Thấy rằng các ví dụ sau về chuỗi các phương tiện phát hiện phân tử liên kết với chất đánh dấu bề mặt tế bào tạo ra các kết quả tốt:

A: phát hiện đồng thời 10 nhóm bạch cầu có nhận diện tế bào được cải thiện

Chất đánh dấu tế bào	Tế bào sơ cấp	Ghi chú
CD20	Các tế bào lympho B	
CD4	Các tế bào lympho Th	
CD8	Các tế bào lympho Tct	
BB1	Bạch cầu ưa bazơ	
EG2	Bạch cầu ưa oezin	
MPO	Bạch cầu trung tính	
Triptaza	Các tế bào khổng lồ	
CD68	MQ/bạch cầu đơn nhân (mà còn là bạch cầu trung tính phụ động)	Bạch cầu trung tính trùng hợp đã được nhuộm màu và được nhận diện trong bước trước đó và bị loại trừ về mặt vật lý và số hóa trong chu kỳ nhuộm CD68
CD11 c	DC tủy (nhưng cũng trên các đại thực bào)	Các đại thực bào trùng hợp đã được nhận diện.
CD123	DC tương bào (mà còn trên các đại thực bào và bạch cầu trung tính và các bạch cầu ưa oezin)	Các đại thực bào trùng hợp và bạch cầu trung tính đã được nhận diện và có thể được loại trừ

B: Nhận diện đồng thời nhiều phần chứa mô vi phẫu

Chất đánh dấu bề mặt tế bào	Phần chứa/cấu trúc mô
Enolaza đặc hiệu tế bào thần kinh hoặc PGP đánh dấu thần kinh	Dây thần kinh
Actin cơ trơn alpha	Mô cơ trơn
DP-40 (prox-1)	Các mạch bạch huyết
Cav-1 (hoặc CD31)	Các mạch máu

Cytokeratin	Các mô biểu mô và mô tuyến
Vimentin	Các nguyên bào sợi (khi được sử dụng sau gói bạch cầu)

C: Phân tích các mô hình thâm nhập bạch cầu liên quan tới các vùng mô bị tổn thương/hồi phục và các phần chứa mô vi phẫu chính của các đường hô hấp

Chất đánh dấu bề mặt tế bào	Cấu trúc/tế bào sơ cấp
CD20	Các tế bào lympho B
CD3	Các tế bào lympho T
BB1	Các bạch cầu ưa bazơ
EG2	Các bạch cầu ưa oezin
MPO	Bạch cầu trung tính
Triptaza	Các tế bào khổng lồ
CD68	Các đại thực bào
Pan-Cytokeratin	Mô biểu mô
Yếu tố Von Willebrand	Mạch máu
SMA Alpha	Mô cơ trơn

E: Sự cải thiện trong việc nhận diện các nhóm tế bào tua (DC) của mô

Chất đánh dấu bề mặt tế bào	Cấu trúc/tế bào sơ cấp	Ưu điểm/thông tin bổ sung
CD21	Các DC có nang	
CD68	MQ/bạch cầu đơn nhân	Che MQ và bạch cầu đơn nhân trùng hợp
BDCA-3	Nhóm phụ BDCA3 ⁺ của các tế bào hình sao tủy	Các chất đánh dấu ảnh mới thể hiện các tế bào hình sao tủy BDCA-3 ⁺ âm tính CD68.
CD11c	Các tế bào hình sao tủy BDCA3 ⁻	Ảnh mới thể hiện các DC CD68 ⁻ , BDCA-3 ⁻ , CD11c ⁺ .
CD123	DC tương bào	* Các DC CD68 ⁻ , CD123c ⁺
Langerin (CD207)	DC pop1 niêm mạc	* Các DC CD68 ⁻ , CD11c ⁻ , CD207 ⁺

CD1a	DC pop2 niêm mạc	*CD68 ⁺ , CD207 ⁺ , CD1a ⁺
------	------------------	---

* Chỉ các chất đánh dấu dương tính và âm tính thích hợp để cải thiện sự nhận diện tế bào (về mặt kỹ thuật, các tế bào được nhuộm trong bước bất kỳ là âm tính đối với tất cả các chất đánh dấu được sử dụng trong các chu kỳ nhuộm màu trước đó)

Phần bản chất của sáng chế này đề cập đến cách thức mà chuỗi các hình ảnh thu được được phân tích và được biến đổi thành các hình ảnh được biên tập mới và các mô tả ba chiều bao gồm thông tin được bổ sung để hiển thị nhiều nhóm tế bào và các cấu trúc mô và quan hệ không gian của chúng nằm trong cùng một không gian hai chiều hoặc ba chiều.

Phần phân tích hình ảnh của sáng chế này sẽ được mô tả đầy đủ hơn dưới đây với sự tham khảo tới các hình vẽ kèm theo, trong đó, các phương án thực hiện cụ thể của sáng chế được thể hiện. Tuy nhiên, sáng chế có thể được bao gồm ở nhiều dạng khác nhau và không được hiểu là bị giới hạn ở các phương án đã chỉ ra ở đây; mà các phương án này được cung cấp làm ví dụ nhờ đó phần mô tả này sẽ là đầy đủ và thông suốt, và sẽ chuyển tải đầy đủ phạm vi bảo hộ của sáng chế tới người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các số chỉ dẫn giống nhau đề cập tới các thành phần giống nhau.

Fig.1 là giản đồ khối minh họa thiết bị, được ký hiệu chung là 1, để phân biệt các vùng trong chuỗi các hình ảnh theo sáng chế. Thiết bị bao gồm thiết bị 10 bao gồm bộ xử lý 11 và bộ nhớ 12. Thiết bị 10 có thể là một bộ phận của máy tính. Bộ xử lý 11 có thể được bố trí để ghi lại hình dạng và vị trí của các vùng trong ảnh. Hình dạng và vị trí này có thể được lưu được kết hợp với hoặc cùng với hình ảnh, ví dụ, trong cơ sở dữ liệu trong bộ nhớ 12. Bộ xử lý 11 còn có thể được bố trí để đánh giá ảnh để nhận diện các vùng đánh dấu ảnh theo tiêu chí lựa chọn xác định trước. Bộ xử lý 11 có thể còn được bố trí để so sánh hai hình ảnh và nhận diện các vùng đánh dấu ảnh có mặt ở một trong các hình ảnh này nhưng không ở trong các ảnh còn lại. Bộ xử lý 11 cũng có thể được bố trí để chèn các vùng đánh dấu ảnh mới có cùng hình dạng và vị trí với vùng đánh dấu ảnh đã được nhận diện vào trong ảnh khác, trong đó, các chất đánh dấu được chèn vào có thể nhận diện được trong hình ảnh khác này nhờ đặc điểm đơn nhất.

Theo một phương án, bộ phận chụp ảnh 13 được kết nối với thiết bị 10. Bộ phận chụp ảnh 13 là, ví dụ, là camera CCD số hoặc máy quét dạng số như bộ quét phim dương.

Theo cách khác, thay vì có bộ phận chụp ảnh 13 được kết nối tới thiết bị 10, các hình ảnh có thể được cung cấp cho thiết bị 10 bằng cách kết nối với vật ghi lưu trữ, như bộ nhớ USB, chứa các hình ảnh. Các hình ảnh được cung cấp có thể được lưu trong bộ nhớ 12.

Bộ phận đầu ra 14 có thể được kết nối tới thiết bị 10 để cung cấp đầu ra từ thiết bị 10 tới người sử dụng. Bộ phận đầu ra 14 nghĩa là, ví dụ, màn hình hiển thị như màn hình máy tính hoặc màn hình hiển thị điện thoại di động. Tốt hơn là đầu ra ở dạng giao diện phần mềm, nghĩa là giao diện đồ họa của người sử dụng để hiển thị hình ảnh. Tốt hơn là thiết bị 10 bao gồm bộ phận đầu vào 15 để nhận đầu vào của người sử dụng. Các ví dụ điển hình về bộ phận đầu vào 15 là bàn phím hoặc các phương tiện kết nối dữ liệu.

Fig.2a nói chung minh họa phương pháp theo sáng chế để phân biệt các vùng đánh dấu trong chuỗi các hình ảnh có thể được thực hiện trong thiết bị 10. Phương pháp này bao gồm các bước sau:

- Bước thứ nhất 211 đánh giá chuỗi các ảnh số sơ cấp để xác định các vùng đánh dấu ảnh theo tiêu chí lựa chọn xác định trước.

- Bước thứ hai 212 tạo ảnh mới, dựa trên chuỗi các hình ảnh này, bằng cách đưa vào các chất đánh dấu mới tương ứng với các vùng đánh dấu ảnh được xác định trong bước 211 trước đó, sao cho các chất đánh dấu này có thể nhận diện được.

Phương pháp này sẽ được mô tả chi tiết kèm theo các Fig.2b và Fig.1.

Bước 221 bao gồm tạo ra chuỗi N ảnh số sơ cấp, $I_1, I_2, \dots, I_N$ trong đó, N là số nguyên bằng hoặc lớn hơn 2. Các hình ảnh này được cung cấp bởi bộ phận chụp ảnh 13 hoặc bởi bộ phận lưu trữ (không được thể hiện) được kết nối tới thiết bị 10.

Chuỗi N ảnh số sơ cấp được cung cấp bằng cách chụp ảnh lát cắt mô theo quy trình phát hiện sau đây (cũng được mô tả ở trên và được minh họa bởi Fig.8):

- 1) cho lát cắt mô tiếp xúc với phương tiện phát hiện phân tử cụ thể gây ra sự liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào xác định trước này;

- 2) rửa lát cắt mô để loại bỏ phương tiện phát hiện phân tử không được liên kết với chất đánh dấu tế bào bất kỳ;

- 3) bổ sung cơ chất thích hợp gây ra sự tạo thành polyme có thể phát hiện được;

- 4) rửa lát cắt mô để loại bỏ cơ chất còn lại; và

5) quét/chụp ảnh lát cắt mô để tạo ra ảnh số sơ cấp có thể chứa một hoặc nhiều vùng đánh dấu chưa được xác định liên quan đến sự tạo thành polyme có thể phát hiện được.

Quy trình phát hiện được lặp lại một số lần mong muốn. Bước 5 (tương ứng với bước 817 trên Fig.8) tạo ra ảnh số sơ cấp trong mọi chu kỳ xử lý. Do đó, N chu kỳ tạo ra chuỗi N hình ảnh.

Quy trình này tạo ra các hình ảnh trong đó, hình ảnh I_{n+1} bao gồm ít nhất cùng số lượng vùng đánh dấu ảnh chưa được xác định với hình ảnh I_n với $2 \leq n \leq N$, trong đó, n là số nguyên. Do đó, chuỗi các hình ảnh bao gồm số lượng tăng dần của các vùng đánh dấu chưa được xác định trong đó, hình ảnh I_N bao gồm số lượng lớn nhất của các vùng đánh dấu chưa được xác định và I_1 bao gồm số lượng nhỏ nhất của các vùng đánh dấu chưa được xác định.

Tiếp theo, bước 222 bao gồm đánh giá mọi hình ảnh I_n với $1 \leq n \leq N$ theo tiêu chí lựa chọn xác định trước, và xác định các vùng đánh dấu ảnh. Cụ thể, các vùng đánh dấu chưa được xác định được đánh giá. Các vùng trong hình ảnh mà đáp ứng tiêu chí lựa chọn định trước được xác định là các vùng đánh dấu ảnh. Như đã được đề cập tới trong phần định nghĩa ở trên, có thể là tiêu chí kích thước, tiêu chí hình dạng và tiêu chí màu sắc. Tiêu chí lựa chọn ảnh hưởng lớn tới kết quả của quy trình đánh giá. Ví dụ, mức ngưỡng tương đối cao liên quan tới kích cỡ tạo ra các hình ảnh rõ hơn dễ dàng để đánh giá nhưng luôn có rủi ro là các cấu trúc liên quan có kích thước nhỏ hơn sẽ không được phát hiện. Do đó khi quyết định tiêu chí lựa chọn, tốt hơn nếu xem xét dữ liệu liên quan tới các tế bào và các cấu trúc tế bào thường có mặt trong lát cắt của loại mô sắp được nghiên cứu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có hiểu biết này.

Vùng bao gồm một hoặc nhiều điểm ảnh. Ngoài ra vùng này có thể được xác định là nhiều điểm ảnh liên kề trong hình ảnh. Cách mà vùng được xác định có thể là một phần của tiêu chí lựa chọn xác định trước. Tiêu chí này có thể, ví dụ, bao gồm tiêu chí là chỉ các vùng lớn hơn hai mươi điểm ảnh được xác định là các vùng đánh dấu ảnh. Tiêu chí khác có thể là các điểm ảnh tạo thành vùng này nên tương tự với một hình dạng cụ thể. Bước 222 tương ứng với bước 211 trên Fig.2a.

Bước 223 bao gồm tạo ra ảnh số thứ cấp mới I_{new} . Ảnh mới này có thể mô tả cùng một đối tượng với chuỗi các hình ảnh. Cụ thể, ảnh mới này có thể là bản sao của một trong số các ảnh số sơ cấp trong chuỗi các hình ảnh. Theo phương án thực hiện này, I_{new} có thể được tạo ra bằng cách sao chép một trong số các hình ảnh trong chuỗi các hình ảnh.

Thuận lợi là, ảnh mới này mô tả mẫu mô gần nhất với mẫu mô ban đầu, nghĩa là trước chu kỳ của quy trình phát hiện bất kỳ. Có thể đạt được điều này bằng cách chụp ảnh lát cắt mô, nhờ đó tạo ra ảnh I_0 , trước khi chu kỳ của quy trình phát hiện thứ nhất được thực hiện. Theo phương án thực hiện này, hình ảnh I_0 có thể được tạo ra trong bước trước bước 221 tạo ra chuỗi các hình ảnh.

Theo cách khác, ảnh mới này có thể là hình ảnh trắng, nghĩa là không có nội dung bất kỳ nào. Hình ảnh trắng có thể được tạo ra bởi bộ xử lý 11. Hình ảnh trắng nghĩa là, ví dụ, ảnh trong đó, tất cả các trị số điểm ảnh, ví dụ trị số RGB, được đặt bằng không.

Theo phương án thực hiện khác, ảnh mới này được tạo ra bằng cách chụp ảnh sau khi nhuộm ban đầu mẫu mô bằng phản chất nhuộm chuẩn như hematoxylin, hoặc chất nhuộm khác bất kỳ cung cấp thông tin giá trị về phần nền mô và không gây cản trở các bước hóa học mô miễn dịch và bước phát hiện tiếp theo.

Cũng cần hiểu rằng ảnh mới có thể được tạo ra từ, ví dụ, bộ phận chụp ảnh hoặc từ bộ nhớ và phương pháp này không bị hạn chế vào một trong các phương án thay thế.

Các vùng đánh dấu ảnh mới có thể được chèn vào trong I_{new} theo thứ tự bất kỳ.

Cũng cần hiểu rằng bước 223 tạo ra ảnh mới I_{new} có thể được thực hiện trước bước 222 đánh giá mọi hình ảnh hoặc trước bước 221 tạo ra chuỗi hình ảnh, nghĩa là bước tạo ra ảnh mới không phụ thuộc vào các bước trước đó.

Bước 224 bao gồm chèn các vùng đánh dấu ảnh mới, trong ảnh mới I_{new} - Với mọi hình ảnh I_n với $2 \leq n \leq N$, các vùng đánh dấu ảnh mới được chèn vào trong I_{new} với cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong ảnh I_n nhưng không ở trong ảnh I_{n-1} . Có thể đạt được điều này bằng cách so sánh mỗi hình ảnh I_n với hình ảnh I_{n-1} tiếp theo và nhận diện các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong I_n nhưng không ở trong I_{n-1} . Đánh giá này không nhất thiết phải được thực hiện cho n theo thứ tự cụ thể và thực tế có thể được thực hiện theo thứ tự bất kỳ được phát hiện ra là thích hợp. Tuy nhiên, điều quan

trọng là thứ tự của các hình ảnh nằm trong chuỗi được giữ nguyên và chỉ có các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong ảnh I_n nhưng không ở trong ảnh I_{n-1} được nhận diện.

Cách để so sánh và chèn các vùng đánh dấu ảnh có cùng hình dạng và vị trí vào trong ảnh mới có thể được thực hiện theo nhiều cách, như đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ là lưu các thông số hình dạng và/hoặc vị trí trong cơ sở dữ liệu và; sử dụng chức năng sao chép-dán trong phần mềm chỉnh sửa ảnh; v.v.. Bước 224 sẽ tiếp tục được giải thích liên quan tới các Fig.4-5.

Ngoài ra, các vùng đánh dấu ảnh được chèn vào trong I_{new} được làm cho có thể nhận diện được trong I_{new} nhờ đặc điểm đơn nhất, cụ thể là trị số đơn nhất của đặc điểm đơn nhất. Đặc điểm có thể nhận diện được là đặc điểm không có mặt từ đầu trong I_{new} và có thể, ví dụ, là màu sắc. Trong trường hợp này, trị số đơn nhất của màu sắc có thể là sắc thái riêng biệt và đơn nhất. Điều quan trọng là trị số này là đơn nhất cho phương tiện phát hiện phân tử cụ thể được sử dụng trong chu kỳ của quy trình phát hiện tạo ra hình ảnh I_n và tiếp theo là thành phần hoặc cấu trúc tương ứng. Mục đích của đặc điểm/trị số đơn nhất là chúng phân biệt chất đánh dấu hình ảnh khác nhau tạo thành từ các chu kỳ khác nhau của các quy trình phát hiện và do đó là, các phương tiện phát hiện phân tử khác nhau cho các thành phần/các tế bào sơ cấp khác nhau và các cấu trúc của lát cắt mô. Theo một phương án thực hiện, đặc điểm đơn nhất là các chất đánh dấu trực quan trong ảnh mới. Theo một phương án thực hiện, đặc điểm đơn nhất là màu chung và trị số đơn nhất của đặc điểm đơn nhất là màu cụ thể liên quan đến chất đánh dấu tế bào cụ thể.

Theo phương án thực hiện khác, đặc điểm đơn nhất cho các vùng đánh dấu ảnh tạo thành từ I_n là sự kết hợp/kết nối số hóa giữa các vùng đánh dấu ảnh và các thành phần và/hoặc các cấu trúc tương ứng nhằm đánh dấu trong chu kỳ n của quy trình phát hiện. Sự kết hợp/kết nối được lưu trong kết hợp/kết nối tới hình ảnh I_n , như trong cơ sở dữ liệu được kết hợp trong bộ nhớ 12.

Bước 211 đánh giá chuỗi các hình ảnh để xác định các vùng đánh dấu ảnh theo tiêu chí lựa chọn xác định trước sẽ được mô tả tham khảo tới Fig.3.

Fig.3 minh họa ảnh số sơ cấp I_{1a} mô tả mẫu mô. Hình ảnh tạo ra từ chu kỳ của quy trình phát hiện được mô tả ở trên và như được minh họa bởi Fig.8. I_{1a} bao gồm các thành phần và các cấu trúc khác nhau tương ứng với các thành phần và các cấu trúc của lát cắt

mô. Với mục đích dễ hiểu hơn, các thành phần và các cấu trúc của mẫu mô được thể hiện bằng các dạng hình học được đơn giản hóa trên Fig.3. Thực tế là, hình ảnh này thường bao gồm hàng nghìn thành phần và cấu trúc.

Trong ví dụ này, quy trình phát hiện được chọn sao cho việc tạo ra polyme có thể phát hiện được dẫn tới sự thay đổi màu sắc trong vùng mà trong đó, polyme được tạo ra. Sự thay đổi màu sắc là sao cho các vùng này trở nên tối hơn. Khi bị tác động bởi quy trình phát hiện (bước 815 trên Fig.8), các vùng trong đó, sự tạo thành polyme có thể phát hiện được đã được tạo ra được gọi là các vùng đánh dấu chưa được xác định. Trên Fig.3, các vùng đánh dấu chưa được xác định được chỉ ra là 31a, 32a, 33a và 34a.

Do các vùng được tạo ra bởi polyme có thể phát hiện được, chúng có thể được nhận diện bằng cách phát hiện polyme này.

Theo ví dụ này, sự tạo thành polyme có thể phát hiện được nhiều hơn trong một vùng tạo ra vùng sẫm màu hơn. Trong quy trình phát hiện lý tưởng, sự tạo thành polyme có thể phát hiện được chỉ xuất hiện cùng với các thành phần được nhắm tới khi lựa chọn các phương tiện phát hiện phân tử cụ thể. Tuy nhiên, polyme có thể phát hiện được thường cũng sẽ được tạo ra trong các vùng khác do phản ứng chéo và liên kết không đặc hiệu của kháng thể phát hiện (hoặc các thành phần được sử dụng để phát hiện phân tử). Hình ảnh này có thể còn bao gồm các vùng đánh dấu chưa được xác định, mà không bị tác động bởi quy trình phát hiện. Mong muốn lọc ra các vùng hầu như tạo thành từ các thành phần và các cấu trúc “thực”, nghĩa là các thành phần và các cấu trúc được dự định được đánh dấu trong chu kỳ quy trình phát hiện cụ thể. Do đó, mỗi hình ảnh trong chuỗi các hình ảnh được đánh giá, như được minh họa bởi bước 310 trên Fig.3, theo tiêu chí lựa chọn xác định trước. Tiêu chí lựa chọn này được chọn để thích hợp với quy trình phát hiện cụ thể.

Tiêu chí lựa chọn có thể bao gồm nhiều tiêu chí phụ, như:

- Ngưỡng màu sắc
- Khoảng màu sắc
- Các đặc điểm hình học (các thông số hình dạng và kích thước)
- Bản chất của các mẫu nhuộm nằm trong vùng được đánh dấu (nghĩa là các thông số kết cấu; độ tạo hạt, độ thô, độ nhuộm màu trơn đều, nhuộm màu theo điểm, v.v.).

- Vị trí (ví dụ liên quan tới các cấu trúc mô có thể, ví dụ, đã được nhận diện trong lát cắt không được nhuộm màu hoặc sau khi nhuộm màu mô nền).

Việc đánh giá ảnh sử dụng các tiêu chí này hoặc tiêu chí tương tự là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm như ImageJ được cung cấp bởi Viện sức khỏe quốc gia (National Institute of Health - NIH), US; Image-Pro Plus bởi Media Cybernetica Inc, USA; Visiomorph bởi Visiopharm A/S Denmark; Definiens Tissue Studio bởi Definiens AG, Germany; Genie bởi Aperio Technologies, USA; MATLAB bởi Mathworks Inc, USA; Adobe Photoshop, v.v.

Ngưỡng màu nghĩa là ngưỡng trong thang màu, như thang màu HLS (hue-lightness-saturation – độ màu-độ sáng-độ bão hòa), trong đó, điểm ảnh với trị số màu sắc trên hoặc dưới ngưỡng của thang màu cụ thể đáp ứng tiêu chí chọn lọc phụ.

Khoảng màu nghĩa là khoảng nằm trong thang màu, như trị số R cho hình ảnh thang màu RGB nằm trong khoảng cụ thể, như 200-230. Các vùng với các điểm ảnh có các trị số điểm ảnh nằm trong khoảng này đáp ứng tiêu chí chọn lọc phụ.

Tiêu chí ngưỡng màu và khoảng màu là có thể áp dụng được với các thang màu khác, như thang màu HSB hoặc các thang màu HIS. Nhiều thang màu khác cũng tồn tại như được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các đặc tính hình học nghĩa là các thông số liên quan đến hình dạng và/hoặc kích thước của vùng. Các ví dụ là các thông số độ tròn, dáng tròn, chiều dài, tính bất thường v.v. Tiêu chí trị số hình dáng có thể được sử dụng để xác định các thành phần/các cấu trúc thực từ các thành phần/các cấu trúc không đúng bởi hình dạng của chúng. Ví dụ, các dây thần kinh có hình dạng dài do đó, các vùng đánh dấu chưa được xác định trong hình ảnh, tạo thành từ quy trình phát hiện các dây thần kinh, mà có các hình dạng khác với hình dạng kéo dài có thể được loại trừ khỏi việc được xác định là các vùng đánh dấu ảnh cho hình ảnh cụ thể.

Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, các loại tiêu chí lựa chọn thích hợp khác cũng có thể được sử dụng trong sáng chế này. Thích hợp nghĩa là tiêu chí lựa chọn này được làm cho thích hợp với việc lọc ra các vùng đánh dấu

chưa được xác định hầu như được tạo ra từ các thành phần và các cấu trúc được nhắm tới trong chu kỳ của quy trình phát hiện tương ứng cụ thể.

Theo một phương án thực hiện, tiêu chí lựa chọn bao gồm ngưỡng cho đặc điểm trực quan, như màu sắc, kết cấu, kích cỡ, hoặc độ tròn. Đặc điểm trực quan nghĩa là một số loại đặc điểm bên ngoài của vùng đánh dấu. Chú ý rằng tính chất này không nhất thiết phải quan sát được, ví dụ, trên bộ phận đầu ra để là đặc tính trực quan.

Tiêu chí lựa chọn có thể bao gồm một hoặc nhiều loại tiêu chí nêu trên. Sự kết hợp của các loại tiêu chí khác nhau cũng có thể được bao gồm, như sự kết hợp của tiêu chí ngưỡng màu và tiêu chí trị số hình dạng trong đó, cả hai tiêu chí này phải được đáp ứng bởi vùng đánh dấu chưa được xác định để được xác định là vùng đánh dấu ảnh.

Trong ví dụ này, tiêu chí lựa chọn bao gồm đặc điểm trực quan, cụ thể hơn là ngưỡng màu. Chỉ các vùng có màu sắc đủ đậm được xác định là các vùng đánh dấu ảnh và do đó được cho là tương quan với các thành phần và các cấu trúc “thực”. Do ví dụ này chỉ bao gồm các màu sắc thang xám nên ngưỡng màu có thể được đặt ở tất cả các điểm ảnh với cường độ của trị số riêng cao hơn trên thang xám này. Trong thang xám từ 0-1 trong đó, 0 tương ứng với màu đen và 1 tương ứng với màu trắng, trị số ngưỡng 0,75 có thể được đặt. Theo các phương án thực hiện khác bao gồm các hình ảnh của thang màu khác, ví dụ, thang màu RGB, ngưỡng có thể được đặt theo cách tương ứng như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Tiêu chí lựa chọn khác tạo ra các kết quả đánh giá khác và do đó, các hình ảnh thứ cấp khác. Trong ví dụ trên Fig.3, tiêu chí lựa chọn bao gồm các điểm ảnh của các vùng đánh dấu chưa được xác định phải ở trên ngưỡng màu thang độ xám. Nhờ việc đánh giá, thu được ảnh số thứ cấp I_{1b} với vùng đánh dấu ảnh 31b. Vùng đánh dấu ảnh 31b được xác định bằng cách đánh giá vùng đánh dấu chưa được xác định 31a đáp ứng tiêu chí lựa chọn. Các vùng đánh dấu ảnh chưa được xác định 32a, 33a, 34a khác không đáp ứng tiêu chí lựa chọn và do đó không được xác định là các vùng đánh dấu ảnh. Trong bước 311, bổ sung thông tin về việc đánh giá, bao gồm ví dụ các thông số không gian hình học (các hệ tọa độ) hoặc chỉ số hình dạng của vùng đánh dấu được đánh giá, được lưu trong hoặc liên kết/kết hợp với hình ảnh thứ cấp I_{1b} , như trong cơ sở dữ liệu kết hợp. Cơ sở dữ liệu này sau đó có thể được cập nhật với thông tin liên quan tới các vùng đánh dấu chưa được xác

định mà được xác định là các vùng đánh dấu ảnh. Thông tin này có thể được sử dụng để chèn các vùng đánh dấu ảnh mới vào trong ảnh mới trong bước 224.

Hình ảnh I_{1b} có thể chính xác là cùng một hình ảnh với I_{1a} hoặc nó có thể được sao chép và/hoặc chỉnh sửa bằng kỹ thuật số, như bằng cách chèn một dấu hiệu trực quan bởi các vùng đánh dấu ảnh. Tuy nhiên, ảnh số thứ cấp không bị giới hạn vào cùng một hình ảnh như ảnh số sơ cấp.

Khác biệt giữa ảnh số thứ cấp và ảnh số sơ cấp là ảnh số thứ cấp được đánh giá để xác định các vùng đánh dấu ảnh, khi đó ảnh số sơ cấp là dữ liệu thô chưa được chỉnh sửa và chưa được đánh giá. Ảnh số được chỉnh sửa hoặc được tạo ra trong phương pháp này được gọi là hình ảnh thứ cấp do nó không phải là các hình ảnh thô thu được một cách trực tiếp từ việc chụp ảnh hoặc quét dạng số. Do đó, các ảnh mới cũng được tạo ra trong, ví dụ, bước 212 và 224 của sáng chế này được gọi là các ảnh số thứ cấp.

Theo một phương án thực hiện, người sử dụng có thể đánh giá ảnh số sơ cấp bằng cách sử dụng phần mềm ảnh và xác định các vùng đánh dấu ảnh theo tiêu chí lựa chọn định trước, như cường độ màu sắc riêng, phần bao quanh và hoặc hình dạng. Các ví dụ về phần mềm hình ảnh hữu dụng cho việc đánh giá kiểu này là Image-Pro Plus bởi Media Cybernetica Inc, Mỹ; Visiomorph bởi Visiopharm A/S Đan Mạch; Definiens Tissue Studio bởi Definiens AG, Đức; và Matlab bởi Mathworks Inc, Mỹ.

Bước 212 tạo ảnh mới bằng cách chèn các chất đánh dấu mới có thể nhận diện được và phân loại được tương ứng với các vùng đánh dấu ảnh xác định được sẽ được mô tả có tham khảo tới Fig.4.

Fig.4 bộc lộ chuỗi hình ảnh theo một phương án thực hiện của sáng chế này. Các hình ảnh I_1, I_2, I_3, I_4 tạo thành chuỗi của N hình ảnh, trong đó, $N=4$. Đối tượng được mô tả trong mỗi hình ảnh là lát cắt mô (hoặc một phần của lát cắt mô). Mỗi hình ảnh bao gồm (cùng một phần của) cùng một lát cắt mô. Mỗi hình ảnh này được đánh giá theo bước 211 và bước 222.

Mỗi hình ảnh bao gồm các vùng đánh dấu ảnh: I_1 bao gồm vùng đánh dấu ảnh 411a; I_2 bao gồm các vùng đánh dấu ảnh 411b và 421a; I_3 bao gồm các vùng đánh dấu ảnh 411c, 421b, 431a, và 432a; và I_4 bao gồm các vùng đánh dấu ảnh 411d, 421c, 431b, 432b, 441a, và 442a. Thông tin liên quan tới các vùng đánh dấu ảnh, như thông số vị trí,

các thông số hình dạng, các trị số màu sắc, các trị số cường độ, v.v., tốt hơn, nếu được lưu trong hoặc liên kết/kết hợp với chính hình ảnh đó, như trong cơ sở dữ liệu được kết hợp với hình ảnh. Cơ sở dữ liệu này có thể được bố trí trong bộ nhớ 12. Các thông số, ví dụ, được lưu theo bước 311 trên Fig.3 (được mô tả ở trên).

Như được bộc lộ ở trên, các hình ảnh trong chuỗi hình ảnh bao gồm ít nhất cùng một lượng hoặc thường là lượng tăng của các vùng đánh dấu ảnh. I_4 bao gồm lượng lớn nhất của các vùng đánh dấu ảnh và I_1 bao gồm lượng nhỏ nhất của các vùng đánh dấu ảnh. I_n bao gồm ít nhất cùng một lượng của các vùng đánh dấu ảnh với I_{n-1} với $n=2, 3$ hoặc 4 .

Bằng cách so sánh I_4 , I_3 và/hoặc thông tin liên quan tới chúng trong cơ sở dữ liệu được kết hợp, phát hiện ra rằng các vùng đánh dấu ảnh 441 và 442a là có mặt trong I_4 nhưng không ở trong I_3 . Do đó, các vùng đánh dấu ảnh mới có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh 441 và 442a được chèn vào trong I_{new} theo bước 224. Ngoài ra các vùng đánh dấu ảnh mới được làm cho có thể nhận diện được nhờ đặc điểm đơn nhất, cụ thể là trị số đơn nhất của đặc điểm đơn nhất.

Trên Fig.5a và 5b, các ví dụ về các ảnh mới được tạo ra. Chúng có thể thu được trong ví dụ này. Ảnh mới I_{new} trên Fig.5a được tạo ra bằng cách sao chép một trong các hình ảnh I_1 - I_4 , như ví dụ I_1 . Trên Fig.5b, ảnh mới I_{new} được tạo ra bằng cách tạo hình ảnh rỗng, nghĩa là không có thông tin bất kỳ nào.

Như được bộc lộ ở trên, các vùng đánh dấu ảnh mới có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh 441 và 442a được chèn vào. Trên các Fig.5a-5b, các vùng này được gọi là 541 và 542.

Trên các Fig.5a-5b, các đặc điểm đơn nhất là các dấu hiệu trực quan và bao gồm các mẫu đơn nhất cho các vùng đánh dấu ảnh được chèn vào của nhóm cụ thể. Các vùng đánh dấu ảnh 541 và 542 thuộc nhóm các vùng đang được đánh dấu trong chu kỳ của quy trình phát hiện giữa bước chụp ảnh I_3 và bước chụp ảnh I_4 . Đối với các vùng đánh dấu ảnh 541 và 542, dấu hiệu trực quan của đặc điểm đơn nhất là mẫu chấm chấm.

Để chèn các vùng đánh dấu ảnh 541 và 542 có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh 441 và 442a, cơ sở dữ liệu có thể bao gồm thông tin liên quan tới các vùng đánh dấu ảnh 441a và 442a. Như được bộc lộ ở trên, thông tin này có thể được lưu trong cơ sở dữ liệu trong bước bổ sung 311 trên Fig.3. Hơn nữa, phương pháp theo Fig.2b

có thể bao gồm bước bổ sung là bước ghi lại hình dạng và vị trí của mỗi vùng đánh dấu ảnh được nhận diện theo tiêu chí lựa chọn xác định trước. Nhờ hiểu biết về hình dạng và vị trí của các vùng đánh dấu ảnh 441a và 442b, các vùng đánh dấu ảnh mới 541 và 542 có thể được chèn vào. Như có thể được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, các vùng đánh dấu ảnh mới có thể được chèn vào trong ảnh mới bởi các quy trình khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Bằng cách so sánh I_3 với I_2 , các vùng đánh dấu ảnh 431a và 432a được xác định là có mặt trong I_3 nhưng không ở trong I_2 . Các vùng đánh dấu ảnh mới 531 và 532 có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh 431a và 432a được chèn vào trong I_{new} . Trên các Fig.5a-5b, dấu hiệu trực quan của đặc điểm đơn nhất của 531 và 532 là mẫu được tô kín.

Bằng cách so sánh I_2 với I_1 , vùng đánh dấu ảnh 421 được xác định là có mặt trong I_2 nhưng không ở trong I_1 . Vùng đánh dấu ảnh mới 521 có cùng hình dạng và vị trí với vùng đánh dấu ảnh 421a được chèn vào trong I_{new} - Trên Fig.5a và 5b, dấu hiệu trực quan của đặc điểm đơn nhất của 521 là mẫu được gạch chéo.

Do I_1 là kết quả của chu kỳ thứ nhất của quy trình phát hiện, I_1 không nhất thiết phải được so sánh với hình ảnh bất kỳ nào khác. Trong ví dụ này, vùng đánh dấu ảnh 411 được xác định là có mặt trong I_1 và do đó có nguồn gốc từ chu kỳ của quy trình phát hiện tạo ra I_1 . Vùng đánh dấu mới 511 được chèn vào trong I_{new} có cùng hình dạng và vị trí với 411a. Ngoài ra vùng đánh dấu ảnh 511 được làm cho có thể nhận diện được theo đặc điểm đơn nhất. Trên Fig.5a và 5b, dấu hiệu trực quan của đặc điểm đơn nhất của vùng đánh dấu ảnh 511 là mẫu được kẻ ô vuông.

Nhờ đó ảnh mới I_{new} được tạo ra bao gồm các vùng đánh dấu ảnh đã được phân loại theo chu kỳ phát hiện và do đó theo dấu hiệu tế bào và tế bào sơ cấp mà mỗi vùng đánh dấu ảnh thể hiện. Nhờ phương pháp theo sáng chế này, nhiều tế bào hoặc cấu trúc mô có thể được nhận diện và được phân loại bằng cách sử dụng kỹ thuật lặp lại cùng một loại quy trình phát hiện. Các chất đánh dấu được sử dụng, như các polyme có thể phát hiện được hoặc các thuốc nhuộm huỳnh quang, để đánh dấu các thành phần hoặc các cấu trúc mô không cần phải là đơn nhất. Một kiểu đơn nhất của polyme có thể phát hiện được hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang có bước sóng cụ thể có thể được sử dụng trong mọi chu

kỳ của quy trình phát hiện, và tạo ra các vùng đánh dấu có cùng một cường độ, màu sắc hoặc bước sóng phát xạ ánh sáng. Ưu điểm này được minh họa bởi hình ảnh I_4 trên Fig.4 và I_{new} trong ví dụ Fig.5a. Với các kỹ thuật đã biết, kết quả của nhiều quy trình phát hiện tạo ra hình ảnh I_4 . Ở đây, các vùng đánh dấu là không thể phân biệt với nhau, nghĩa là không thể quan sát thấy loại tế bào hoặc cấu trúc mô sơ cấp nào được thể hiện trong vùng hình ảnh trong I_4 . Tuy nhiên, theo sáng chế này trong đó, việc chụp nhiều lần được kết hợp với phương pháp phân tích hình ảnh đã được bộc lộ, ảnh bao gồm các vùng đánh dấu ảnh với phân loại có thể đạt được theo cách đơn giản và hiệu quả. Nhiều vấn đề với các kỹ thuật đã biết như hạn chế của việc phát hiện nhiều chất đánh dấu nằm trong cùng một lát cắt, có thể được khắc phục.

Các Fig.6a-6b minh họa các ví dụ về các đặc điểm trực quan đơn nhất cho các vùng đánh dấu ảnh được phân loại trong hình ảnh I_{new} theo sáng chế này. Các hình ảnh này mô tả mẫu mô với các thành phần và các cấu trúc. Các hình ảnh được tạo ra nhờ phương pháp của sáng chế này.

Trên Fig.6a, đặc điểm đơn nhất là các mẫu khác nhau.

Trên Fig.6b, đặc điểm đơn nhất là màu xám và các trị số đơn nhất là các cường độ của màu xám và cụ thể là các cường độ thang xám khác nhau. Ảnh mới có thể bao gồm nhiều đặc điểm, như các màu sắc khác nhau, và các màu sắc này có thể còn được chia nhỏ thành các trị số đơn nhất mà các trị số này có thể là các cường độ khác nhau của các màu sắc khác nhau.

Trên Fig.6c, đặc điểm đơn nhất là các ký hiệu khác nhau. Theo phương án thực hiện này, các ký hiệu là các ký tự, nhưng chúng cũng có thể là các số, các ký hiệu hình học, v.v. hoặc tổ hợp của chúng. Các ký hiệu được bố trí trong ảnh số I_{new} gần vùng đánh dấu ảnh mà nó thể hiện, sao cho rõ là nó được kết hợp với chất đánh dấu hình ảnh nào.

Như được đề cập trên đây, cũng cần hiểu rằng đặc điểm đơn nhất không nhất thiết phải là đặc điểm trực quan được bố trí trong ảnh mới. Thay vào đó, nó có thể, hoặc kết hợp với, dấu hiệu trực quan là thông tin dạng số, như trị số dạng số đơn nhất, trong đó các vùng đánh dấu ảnh của một nhóm được kết hợp với nhau. Thông tin này có thể được lưu

trong cơ sở dữ liệu, và ưu tiên là trong cơ sở dữ liệu nêu trên bao gồm thông tin về các đặc điểm vị trí, hình dạng, và nhuộm màu khác của của các vùng đánh dấu ảnh.

Fig.7 minh họa một phương án thực hiện của sáng chế này trong đó, giao diện đồ họa, được ký hiệu là 7, được sử dụng để cung cấp cho người sử dụng với thông tin liên quan tới phương pháp theo sáng chế này. Chương trình máy tính tạo ra giao diện đồ họa 7 có thể được lưu trong bộ nhớ 12 và được thực hiện bởi bộ xử lý 11. Theo cách khác, chương trình máy tính có thể được lưu trên bộ phận lưu trữ thích hợp bất kỳ, như thẻ USB hoặc CD-ROM. Chương trình máy tính còn có thể thực hiện phương pháp phân biệt các vùng đánh dấu trong chuỗi các hình ảnh theo sáng chế.

Giao diện đồ họa 7 bao gồm cửa sổ đồ họa 71 được cung cấp cho người sử dụng qua bộ phận đầu ra 14, như màn hình máy tính, liên quan tới thiết bị 10. Người sử dụng có thể cung cấp đầu vào cho chương trình máy tính, như lựa chọn, bằng bộ phận đầu vào 15, như chuột máy tính hoặc bàn phím, kết nối với thiết bị 10.

Cửa sổ đồ họa 71 bao gồm ảnh 72 tương ứng với ảnh mới I_{new} được tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế này. Theo phương án thực hiện này, hình ảnh 72 mô tả cùng một lát cắt mô như trên các Fig.4-5.

Cửa sổ đồ họa 71 còn bao gồm ít nhất một hộp 75 để làm tương thích cách quan sát hình ảnh 72. Hộp 75 có thể bao gồm hộp lựa chọn 76 để cung cấp lựa chọn giữa các phương án khác nhau. Theo phương án thực hiện này, hộp 75 cung cấp lựa chọn nhóm quần thể tế bào sơ cấp nào cần được làm nổi rõ trong hình ảnh 72. Bằng cách lựa chọn "các tế bào lympho B" trong hộp lựa chọn 76, các vùng đánh dấu ảnh 751 và 752 liên quan đến các tế bào sơ cấp tế bào lympho B được làm nổi rõ. Mỗi liên quan giữa vùng đánh dấu ảnh và tế bào sơ cấp có thể được lưu trong cơ sở dữ liệu, trong đó, thông tin về mỗi liên quan này có thể thu được bởi chương trình máy tính từ cơ sở dữ liệu. Cơ sở dữ liệu có thể thu được bởi phương pháp theo sáng chế này như được bộc lộ ở trên, cụ thể bởi bước 311. Các lựa chọn khác được cung cấp bởi hộp 75 không bị hạn chế vào việc chỉ bao gồm một loại tế bào, mà có thể còn bao gồm nhóm của nhiều loại tế bào.

Cửa sổ đồ họa 71 có thể còn bao gồm nhiều hộp lựa chọn hoặc các phương tiện làm tương thích thích hợp khác như các hộp đánh dấu, nhiều cửa sổ lựa chọn, v.v..

Cửa sổ đồ họa 71 còn bao gồm hộp 77 được kết hợp với hộp thông tin 79. Thông tin được cung cấp trong hộp thông tin liên quan đến các vùng đánh dấu ảnh của hình ảnh 72. Thông tin này có thể thu được bởi cơ sở dữ liệu bao gồm thông tin về các vùng đánh dấu ảnh của hình ảnh 72. Hộp lựa chọn 77 bao gồm hộp lựa chọn 78. Người sử dụng có thể chọn giữa các loại thông tin khác nhau để thể hiện thông tin cụ thể như vậy về các vùng đánh dấu ảnh trong hộp thông tin 79. Trong ví dụ được minh họa này, người sử dụng lựa chọn để thể hiện các tọa độ bằng cách chọn "hệ tọa độ X, Y" trong hộp lựa chọn 78. Thông tin về các tọa độ x và y của các vùng đánh dấu ảnh được làm nổi bật 751 và 752, được chọn bởi hộp lựa chọn 76, được cung cấp bởi hộp thông tin 79.

Tất nhiên, giao diện đồ họa 7 có thể có nhiều dạng khác nhau và bao gồm nhiều chức năng khác nhau. Do đó, các thông tin về các vùng đánh dấu ảnh có thể được cung cấp tới người sử dụng bởi giao diện đồ họa 7 là không bị hạn chế vào ví dụ này. Nhờ phương pháp được yêu cầu bảo hộ, người sử dụng có thể được cung cấp thông tin như:

- diện tích, được thể hiện, ví dụ bằng μm^2 , cho vùng đánh dấu bất kỳ.
- các trị số hình dạng cho vùng đánh dấu ảnh, ví dụ, chu vi và độ tròn
- các trị số cường độ, ví dụ, mật độ trung bình của các điểm ảnh trong vùng đánh dấu ảnh
- các khoảng cách nằm trong hình ảnh, ví dụ, các khoảng cách giữa hai vùng đánh dấu ảnh
- các hệ số tương quan không gian giữa các vùng đánh dấu ảnh, hoặc các nhóm của các vùng đánh dấu; Ví dụ, bằng cách sử dụng các thuật toán thống kê trong phần mềm, người sử dụng có thể thu thông tin về quan hệ không gian giữa, ví dụ, các vùng đánh dấu tương ứng với các tế bào lympho B và các vùng đánh dấu trong cùng một vùng mô tương ứng với nhóm tế bào, ví dụ, các tế bào lympho T.

Cũng cần hiểu rằng khi áp dụng sáng chế này để cắt liên tục các lát cắt mô (ví dụ, 30 lát cắt liên tiếp, mỗi lát có độ dày cố định là, ví dụ $4\mu\text{m}^2$) giao diện đồ họa tương tự như được bộc lộ trên Fig.7 cũng có thể hiển thị phân bố ba chiều của các vùng đánh dấu ảnh dưới dạng hình ảnh 3D. Tương tự, sau đó người sử dụng có thể thu thông tin 3D về các vùng đánh dấu ảnh, như các tọa độ x, y, và z của chúng. Bằng cách sử dụng các thuật

toán đã biết để dựng hình 3D, người sử dụng có thể thu được các phép tính (hoặc các màn hiển thị đồ họa) về thể tích của tế bào hoặc cấu trúc mô được đánh dấu.

Chương trình máy tính và giao diện đồ họa 7 nên được coi là các phương tiện để cung cấp cho người sử dụng thông tin mà có thể được tách từ các hình ảnh của phương pháp theo sáng chế này. Cách để tách và lưu thông tin này trong, ví dụ, cơ sở dữ liệu là hiểu biết chung đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Cách để tạo ra chương trình máy tính để thực hiện các chức năng được mô tả trên đây cũng có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cũng cần hiểu rằng chương trình máy tính này không bị hạn chế vào các đặc điểm được mô tả trên đây, và có thể, ví dụ, bao gồm các chức năng đã biết rõ khác như việc chỉnh sửa và duyệt lại các ảnh số. Giao diện đồ họa 7 còn có thể bao gồm các chức năng để thực hiện việc đánh giá các ảnh số sơ cấp.

Tóm lại, sáng chế này bộc lộ phương pháp phân biệt các vùng trong chuỗi của các ảnh số, phương pháp này bao gồm các bước: tạo ra chuỗi của các hình ảnh bao gồm các vùng đánh dấu chưa được xác định; đánh giá mọi hình ảnh I_n với $1 \leq n \leq N$ theo tiêu chí lựa chọn xác định trước và xác định các vùng đánh dấu ảnh là các vùng đánh dấu chưa được xác định đáp ứng tiêu chí lựa chọn xác định trước; tạo ra ảnh mới I_{new} ; và chèn các vùng đánh dấu ảnh mới trong ảnh mới I_{new} , các vùng đánh dấu ảnh mới này có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong ảnh I_n nhưng không ở trong ảnh I_{n-1} , và các vùng đánh dấu ảnh mới này có thể nhận diện được trong I_{new} nhờ đặc điểm đơn nhất.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp hiển thị các nhóm tế bào trong các lát cắt mô của mẫu mô vi phẫu.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp hiển thị phân bố ba chiều của nhiều nhóm tế bào trong mẫu mô vi phẫu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế này sẽ được mô tả chi tiết hơn kèm theo các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1: Xử lý mô, chuẩn bị mẫu, và tạo ra các lát cắt.

Các mô của người dưới đây sẽ được đưa vào:

- Đại tràng xa của người: phẫu thuật cắt bỏ do viêm mạn tính và bị nghi ngờ viêm đại tràng không đặc hiệu.

- Mô phổi người từ các bệnh nhân mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (Chronic Obstructive Pulmonary Disease – COPD) và xơ hóa nang (Cystic Fibrosis): cắt bỏ phổi do bị nghi ngờ ung thư phổi, mô được phân tích không bị ảnh hưởng bởi bệnh ung thư và thu được ở xa khối u nhất có thể.

- Các hạch bạch huyết của người: các hạch bạch huyết thoát dịch lớn được lấy cùng với việc ghép phổi do COPD hoặc xơ hóa nang.

- Amidan của người: được lấy như một phần của việc cắt amidan thông thường do các đợt viêm amidan tái phát.

Các mẫu (nghĩa là các khối của mô) từ tất cả các loại mô được nhúng và đưa vào quá trình hãm thông thường bằng cách nhúng vào trong chất hãm thông thường (4% formaldehit được đệm, độ pH=7,6). Sau khi hãm qua đêm, các mẫu được khử nước trong một loạt các dung dịch có nồng độ rượu (EtOH) tăng dần và lần cuối được nhúng vào trong xylen. Việc khử nước được thực hiện trong máy khử nước tự động (Shandon Hypercenter XP tissue Processor, Shandon/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Các mẫu đã khử nước sau đó được vùi vào trong parafin tại nhiệt độ 60°C sử dụng máy vùi parafin. Các lát cắt parafin (4µm) được tạo ra với thiết bị vi phẫu cắt parafin thông thường (thiết bị vi phẫu parafin Microm HM360, Microm, Đức) và được gắn lên các phiến kính hiển vi tiêu chuẩn. Các lát cắt sau đó sẽ được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho tới khi sử dụng.

Ví dụ 2: Nhuộm hóa học mô miễn dịch nhiều lần và tạo chuỗi các ảnh số.

Nhuộm hóa học mô miễn dịch được thực hiện bằng cách sử dụng robot hóa học mô miễn dịch được tự động hóa (Autostainer CL-classic; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) với hệ thống phát hiện DAKO REAL EnVision), phương pháp tiêu chuẩn nhạy nhằm mục đích phát hiện các kháng thể chuột hoặc thỏ sơ cấp (IHC kit Code K5007, Dako Cytomation, Denmark; chi tiết xem thêm www.dako.com). Các kháng thể sơ cấp được sử dụng để phát hiện các kháng nguyên đặc hiệu tế bào (trước đây được gọi là "các chất đánh dấu tế bào") được liệt kê trong Bảng 2 và được sử dụng lên các lát cắt ở độ pha loãng được đề nghị bởi các nhà sản xuất thương mại để nhuộm hóa học mô miễn dịch cho các mô của người được chuẩn bị cho kiểm tra bệnh lý thông thường (nghĩa là, các lát cắt

từ các mẫu được hãm formalin và được vùi vào parafin). Các ví dụ về chuỗi các chất đánh dấu được sử dụng trong đánh giá của ESMS được liệt kê trên Bảng 3.

Bảng 2. Các ví dụ về các kháng thể được sử dụng để đánh giá hiệu lực thử nghiệm của kỹ thuật ESMS

Chất đánh dấu	Loại tế bào sơ cấp	Nhà cung cấp
CD20	Các tế bào lympho B	Dako
CD3	Các tế bào lympho T	Dako
CD8	Các tế bào lympho CD8 ⁺ T	Dako
ECP (EG2)	Các bạch cầu ưa oezin	Pharmacia
Tryptaza	Các tế bào khổng lồ MCt	Chemicon
Chymaza	Các tế bào khổng lồ MCtc	Chemikon
CD68	Các đại thực bào/các tế bào đơn nhân (cũng là các bạch cầu ưa bazơ, các tế bào lympho lớn)	Dako
MPO	Bạch cầu trung tính	Dako
CD163	Hầu hết các đại thực bào mô	Novocastra
CD123	DC tương bào (cũng là các tế bào đơn nhân, các bạch cầu ưa bazơ, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa oezin)	BD-Pharmingen
CD1a	Các tế bào tua trong biểu mô	Novocastra
CD11 c	Các tế bào dạng cây hàm dưới (cũng là các đại thực bào)	Novocastra
BDCA-3	Nhóm con của các tế bào tủy hình sao	Novus
CD21	Các tế bào tua có nang	Dako
Vimentin	Các nguyên bào sợi đầu tiên	Novocastra
Cytokeratin	Các tế bào biểu mô	Novocastra
Lyve-1	Các mạch bạch huyết	Dako
Caveolin-1	Các tế bào màng trong (các mạch máu)	Novocastra

Enolaza đặc hiệu neuron (Neuron-Specific Enolase - NSE)	Các tế bào thần kinh (và các tế bào thần kinh nội tiết biểu mô)	Novocastra
Actin cơ trơn alpha	Mô cơ trơn	Sigma-Aldrich

Trước bước hóa học mô miễn dịch, các lát cắt parafin được khử parafin hóa và đưa vào thu hồi kháng nguyên do nhiệt. Quy trình này được thực hiện sử dụng thiết bị thu hồi kháng nguyên thương mại và có thể lập trình được (PT Link từ Dako Cytomation, Đan Mạch) với nhiệt độ pic tại 95°C và Envision FLEX Target Retrieval Solution, độ pH=6,1 (Dako Cytomation).

Sau khi thu hồi được kháng nguyên, các phiến được đặt trong thiết bị Autostainer Robot. Giao thức hóa học miễn dịch được lập trình như sau:

- 1) Bước rửa với đệm rửa Envision FLEX (độ pH=7,6) trong 5 phút.
- 2) Phong bế peroxidaza nội sinh trong 0,3% H₂O₂ trong dH₂O (10 phút).
- 3) Ủ với các kháng thể sơ cấp được pha loãng một cách thích hợp (xem bảng 2) trong 60 phút. Các kháng thể được pha loãng trong chất đệm PBS được bổ sung với 01 % chất tẩy rửa Tween.
- 4) Bước rửa với chất đệm rửa Envision FLEX (độ pH=7,6) trong 5 phút.
- 5) Ủ trong 30 phút với chất phản ứng thứ cấp (các kháng thể kháng chuột và kháng thỏ được liên kết với polyme dextran với enzym phát hiện được gắn vào, HR Peroxidaza (HRP)).
- 6) Các bước rửa được lặp lại với đệm rửa Envision FLEX (độ pH=7,6) trong 5 phút.
- 7) Ủ với dung dịch cơ chất enzym HRP (diaminobenzidin, DAB) trong 10 phút.
- 8) Các bước rửa được lặp lại với chất đệm rửa Envision FLEX (độ pH=7,6) trong 5 phút.
- 9) Các lát cắt đã phát triển được gắn một cách nhẹ nhàng các lá che phủ chuẩn sử dụng chất đệm PBS được bổ sung 0,1% Tween làm môi trường gắn.

10) Thông tin tiếp theo về mẫu nhuộm trong mỗi lát cắt được số hóa. Phần kết tủa không tan màu nâu được tạo thành bởi enzym HRP ở vị trí của phản ứng miễn dịch được bắt giữ trên toàn bộ lát cắt sử dụng robot máy quét toàn bộ phiến đã có trên thị trường (Aperio Scanscope CS, Aperio Technology, USA). Việc số hóa được thực hiện sử dụng thấu kính hiển vi x20 và kích cỡ của hình ảnh có độ phân giải siêu cao được tạo ra cho mỗi lát cắt thường có kích cỡ là 2-5 GB (và ban đầu ở định dạng tệp hình ảnh SVS; các phần của hình ảnh SVS lớn cũng được xuất ra ở dạng các hình ảnh TIFF sử dụng chức năng xuất ra được cung cấp bởi phần mềm Imagescope được cung cấp bởi Aperio, xem bên dưới).

11) Theo cách khác, hoặc như là bước bổ sung cho việc số hóa toàn bộ phiến, các vùng được chọn từ các lát cắt cũng được chụp tại độ phóng đại cao hơn (x400 hoặc 600 ; các hình ảnh TIFF hoặc JPEG) sử dụng kính hiển vi trường sáng (Nikon 80i Research Microscope, Nikon, Nhật) được camera màu số hóa (Olympus DP-50, Olympus, Nhật) và phần mềm chụp ảnh (Viewfinder Lite, v1.0, 2000, Pixera Co).

12) Sau khi số hóa, các lá che được loại bỏ một cách nhẹ nhàng và các phiến kính được rửa trong chất đệm trước khi đi vào chu kỳ hóa học mô miễn dịch (bắt đầu tại bước 2 trong quá trình). Trong một số trường hợp, trước khi các lát cắt được đưa vào trong chu kỳ nhuộm tiếp theo chúng được nhúng vào trong dung dịch phong bế để làm cho các kháng thể sơ cấp trước đó không thể nhận biết được cho các kháng thể phát hiện thứ cấp trong chu kỳ nhuộm tiếp theo. Sự phá vỡ vị trí nhận diện kháng nguyên được thực hiện bằng biến đổi hóa học. Biến đổi hóa học này được thực hiện theo hai cách khác nhau. Vị trí nhận diện kháng nguyên bị phá vỡ do sự biến tính protein sử dụng dung dịch phong bế biến tính DNS001 H từ BioCARE, Concord, CA, US. Theo cách khác, các kháng thể có thể được cắt bằng enzym.

13) Tiếp theo, lát cắt được đưa vào trong chu kỳ nhuộm mới bắt đầu với bước 2 (phong bế H_2O_2 trong quá trình nêu trên).

14) Sau n chu kỳ và sự phát triển của phản ứng miễn dịch của chất đánh dấu cuối cùng, các lát cắt được rửa trong dd H_2O , được nhuộm tương phản với haematoxylin (Htx, Merck, Darmstadt, Đức), được khử nước qua một loạt các dung dịch rượu và xylene, và

cuối cùng được gắn với môi trường gắn Pertex (HistoLab, Gothenburg, Sweden) trước khi được số hóa như được mô tả ở trên.

Bảng 3. Các ví dụ về chuỗi chất đánh dấu được sử dụng trong việc đánh giá hiệu lực của kỹ thuật ESMS

	Chu kỳ 1	Chu kỳ 2	Chu kỳ 3	Chu kỳ 4	Chu kỳ 5	Chu kỳ 6	Chu kỳ 7	Chu kỳ 8
Polyp								
Lát cắt 1	CD20	CD8	ECP	Trypt	MPO	CD68	Cytok	Viement
Lát cắt 2	CD20	CD8	ECP	Trypt	NSE	Lyve-1	Cytok	
Lát cắt 3	CD8	EG2	MPO	SMA	NSE	Lyve-1	Cytok	
Đại tràng								
Lát cắt 1	CD20	CD8	ECP	Trypt	CD68	CD11c	Cytok	Viement
Lát cắt 2	CD20	CD8	ECP	Trypt	NSE	SMA	Cytok	CD68
Lát cắt 3	CD20	CD8	CD3	CD68	ECP	Chym	Trypt	MPO
Hạch bạch huyết								
Lát cắt 1	CD21	CD68	CD11c	BDCA-3	CD20	CD8	SMA	
Lát cắt 2	CD20	CD3	CD21	CD11c	Chym	Trypt		
Lát cắt 3	CD21	CD3	CD68	CD20	Chym	Trypt		
Phổi								
Phần cắt 1	CD20	CD8	CD3	CD68	ECP	Chym	Trypt	MPO
Lát cắt 2	CD20	CD8	CD3	CD68	CD11a	ECP	MPO	Trypt
Lát cắt 5	CD20	CD8	Trypt	NSE	Cytok	SMA	Lyve-1	CD68
Lát cắt 6	NSE	CD8	Trypt	Lyve-1	Cytok	SMA	CD68	Viement
Lát cắt 7	NSE	CD1a	CD68	BDCA-3	CD11c	SMA	Cytok	

SMA = actin cơ trơn alpha, Chym = Chymaza, Trypt = Tryptaza, Cytok = cytokeratin, NSE = Enolaza đặc hiệu neuron (Neuron Specific Enolase)

Ví dụ 3: Phân tích hình ảnh bằng máy tính và giải mã các mẫu nhuộm màu đặc hiệu cho chất đánh dấu.

Các lát cắt được số hóa từ máy quét phiên của Aperio, tương ứng với chuỗi các hình ảnh sơ cấp theo sáng chế này, được kiểm tra thủ công bằng cách sử dụng phần mềm

xem ảnh (Aperio Imagescope, version 10.0.35.1798, Aperio Technologies Inc). Trong đánh giá ban đầu, các vùng cần quan tâm trong mỗi lát cắt được lựa chọn để phân tích chi tiết hơn. Bằng cách sử dụng chức năng tách và xuất hình ảnh trong phần mềm Imagescope, các hình ảnh thô, nghĩa là các ảnh số sơ cấp, được xuất thành các tệp TIFF hoặc JPEG; một hình ảnh cho mỗi chu kỳ nhuộm. Các hình ảnh này cùng nhau tạo thành một chuỗi các hình ảnh cho mỗi vùng quan tâm.

Với một số hình ảnh, mẫu phân bố của kết tủa DAB màu nâu đã được chỉ ra trước khi xuất hình ảnh nhờ các chức năng phân đoạn màu (thuật toán “điểm ảnh dương”) được nằm trong phần mềm Imagescope sau khi chọn các trị số RGB và Hue đặc trưng của kết tủa DAB màu nâu.

Trong trường hợp nhuộm miễn dịch màu nâu, nghĩa là các vùng đánh dấu ảnh, chưa được chỉ ra trong Imagescope, bước này được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm sẵn có với các chức năng nhận diện màu sắc (nghĩa là ImageJ, version 1.44o, National Institute of Health (NIH), USA hoặc Adobe Photoshop® CS4 Extended, phiên bản 11.0.2, Adobe Systems Incorporated, USA). Nhờ phản hồi trực quan của các điểm được phát hiện, người có hiểu biết về mẫu nhuộm màu thông thường và hình thức nhuộm của mỗi loại tế bào tinh chỉnh các giá trị ngưỡng cho tới khi đạt được sự phát hiện tối ưu.

Tiếp theo, chuỗi các hình ảnh, có các vùng đánh dấu ảnh chưa được xác định đã tích tụ được tạo ra sau mỗi chu kỳ phát hiện phân tử, được đánh giá. Các vùng đánh dấu ảnh sau đó được cắt ở dạng số và được tạo màu sắc giả đơn nhất cho chu kỳ tương ứng của quá trình phát hiện. Sử dụng hình ảnh cuối cùng, nghĩa là hình ảnh N trong chuỗi N hình ảnh, làm khuôn, các điểm nhuộm đã tích tụ được mã hóa màu sắc, nghĩa là các vùng đánh dấu ảnh có màu, được sao chép-dán lên trên khuôn này theo thứ tự ngược lại (nếu cần, quá trình này được bắt đầu trước bởi bước sắp xếp thẳng hàng mà, bằng cách sử dụng đường viền mô làm các điểm tham chiếu, bước này hiệu chỉnh các khác biệt nhỏ không thường xuyên theo hướng vật lý giữa các hình ảnh nằm trong cùng một chuỗi).

Ví dụ, trong trường hợp chuỗi hình ảnh có bảy hình ảnh, nghĩa là tạo thành từ bảy chu kỳ của quy trình phát hiện, bản sao của hình ảnh cuối cùng (hình ảnh thứ bảy), với toàn bộ sự nhuộm màu đã tích tụ được sử dụng làm khuôn ảnh mới. Điều này trong một số phương án là có lợi cho việc sao chép ảnh cuối cùng do nó có hình thái tốt nhất do

phiên với lát cắt mô cuối cùng và tùy ý được gắn vào trong môi trường gần không có nước trước khi tạo ra ảnh số sơ cấp cuối cùng. Các vùng đánh dấu ảnh trong hình ảnh thứ sáu được sao chép-dán vào trong ảnh mới. Do đó, các vùng đánh dấu ảnh hiện đã có mặt trong ảnh mới sẽ được che lại, nghĩa là các vùng đánh dấu không được tạo ra trong chu kỳ phát hiện thứ bảy cũng sẽ được che lại. Tương tự, các vùng đánh dấu ảnh trong ảnh thứ năm che tất cả các vùng đánh dấu ảnh không được tạo ra trong chu kỳ của quy trình phát hiện thứ sáu.

Ảnh mới ghép lại được tạo ra cuối cùng hiển thị bảy màu sắc riêng biệt: một cho mỗi nhóm của các vùng đánh dấu ảnh tạo ra từ các chu kỳ nhuộm khác nhau, nghĩa là các chu kỳ của quy trình phát hiện.

Thông tin có thể được tách ra từ ảnh mới bằng cách chọn tự động màu sắc chất đánh dấu (sử dụng, ví dụ, phần mềm ImageJ hoặc MATLAB®) và sau đó sử dụng "thuật toán hạt phân tích", hoặc hoạt động tương tự, để tạo ra thông tin chi tiết về mỗi điểm được nhuộm màu (chu vi, diện tích, chỉ số hình dạng, các tọa độ x, y cho trọng tâm của điểm v.v.). Chức năng này cũng có thể nằm trong giao diện đồ họa người sử dụng đã mô tả (được minh họa bởi Fig.7).

Phương pháp khác để tạo ra các hình ảnh ghép bằng cách đánh giá các chuỗi hình ảnh là sử dụng các công cụ phân đoạn màu sắc và các công cụ hạt phân tích được cung cấp bởi ImageJ (v 1.44) và các trình cắm sẵn có, miễn phí cho ImageJ. Ngắn gọn là, mỗi hình ảnh trong chuỗi này được đưa vào quá trình sau:

- 1) Các điểm được nhuộm DAB màu nâu, nghĩa là các vùng đánh dấu ảnh, được cắt ra bằng phương pháp phân đoạn dựa trên màu sắc bằng cách đánh giá các hình ảnh với tiêu chí lựa chọn bao gồm các trị số ngưỡng HSB (độ màu, độ bão hòa, độ sáng) thích hợp;

- 2) Các hình ảnh được biến đổi thành hình ảnh đen/trắng nhị phân (tức được nhị phân hóa)

- 3) Các hình ảnh được biến đổi từ bước 2) được đánh giá bằng cách sử dụng công cụ hạt phân tích của ImageJ (version 1.44) với các giới hạn kích thước thích hợp và danh sách dữ liệu, nghĩa là cơ sở dữ liệu, của tất cả các vùng đánh dấu ảnh, nghĩa là tất cả các vùng đánh dấu được nhuộm màu, được tạo ra và được lưu trữ. Danh sách dữ liệu chứa các

tọa độ x, y , diện tích, chu vi, dáng tròn, độ tròn, mật độ nhuộm trung bình, v.v... cho tất cả các vùng đánh dấu ảnh đơn lẻ. Chương trình tự động tạo ra hình ảnh được đánh dấu trong đó, các vùng đánh dấu được chỉ ra cùng với số vùng đánh dấu tương ứng với cùng một điểm trong danh sách dữ liệu.

Tiếp theo, bằng cách so sánh các giá trị số của phân bố vùng đánh dấu (nghĩa là các tọa độ x, y) có thể tính toán các vùng hình ảnh nào có mặt trong, ví dụ, hình ảnh n nhưng không ở trong $n-1$. Cách tiếp cận này được thực hiện trên tất cả các cặp hình ảnh liên tiếp do đó cung cấp thông tin về chất đánh dấu hình ảnh nào được xuất hiện sau mỗi chu kỳ phát hiện phân tử mới. Cuối cùng, bằng cách sử dụng thông tin này, cùng với danh sách dữ liệu của tất cả các vùng đánh dấu đã tích lũy từ hình ảnh cuối cùng, có thể tạo ra hình ảnh ghép mới. Sau khi kích hoạt bộ quản lý vùng quan tâm (Region Of Interest - ROI) mỗi vùng đánh dấu thuộc chu kỳ phát hiện phân tử cụ thể được tạo màu cụ thể trong hình ảnh được đánh dấu tương ứng.

Để minh họa ưu điểm của thông tin có thể được tách, xem xét tình huống của mô bị viêm và nhuộm màu cho nhiều nhóm tế bào miễn dịch thâm nhiễm mô (các bạch cầu). Trong lát cắt thường, thường có hàng chục nghìn tế bào cho mỗi nhóm. Việc tách các tọa độ x, y cho từng tế bào nằm trong nhiều nhóm bạch cầu giúp có thể thực hiện một kiểu phân tích các mẫu tế bào hiệu lực. Ví dụ, trường phân tích không gian tương đối mới và đang phát triển (các thống kê không gian) và phân tích cụm có thể được thực hiện để thu thông tin về các tập hợp tế bào có thể đặc hiệu cho bệnh (các mẫu thâm nhiễm), các tế bào này thu hút nhau, hoặc bị thu hút vào các vị trí trong mô, hoặc một số tổ hợp cụ thể của các tế bào v.v.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp phân biệt các vùng trong chuỗi gồm N ảnh số sơ cấp trong đó, N là số nguyên >1 , nhờ đó tạo ra ảnh mới, phương pháp này bao gồm các bước:

a) tạo ra chuỗi gồm N ảnh số sơ cấp (221) bao gồm các vùng đánh dấu chưa được xác định, trong đó, ảnh I_{n+1} bao gồm ít nhất cùng một số lượng vùng đánh dấu chưa được xác định với ảnh số sơ cấp I_n với $2 \leq n \leq N$, trong đó, n là số nguyên;

b) đánh giá (211, 222, 310) tất cả ảnh số sơ cấp I_n với $1 \leq n \leq N$ theo tiêu chí lựa chọn xác định trước và xác định các vùng đánh dấu ảnh là vùng đánh dấu chưa được xác định thỏa mãn tiêu chí lựa chọn xác định trước, và lưu thông tin (311) về vùng đánh dấu ảnh bất kỳ này trong hoặc liên kết/kết hợp với ảnh số thứ cấp tạo thành tương ứng, nhờ đó thu được chuỗi gồm N ảnh số thứ cấp;

c) tạo ra (223) ảnh mới I_{new} ;

d) đối với mỗi n với $2 \leq n \leq N$ của chuỗi các ảnh số thứ cấp thu được trong bước b), chèn các vùng đánh dấu ảnh mới vào ảnh mới I_{new} , các vùng đánh dấu ảnh mới này có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong ảnh I_n nhưng không ở trong ảnh I_{n-1} , và các vùng đánh dấu ảnh mới này là có thể nhận diện được trong I_{new} nhờ đặc điểm đơn nhất;

e) chèn (212, 224) các vùng đánh dấu ảnh mới vào ảnh mới I_{new} , các vùng đánh dấu ảnh mới này có cùng hình dạng và vị trí với các vùng đánh dấu ảnh có mặt trong ảnh I_1 , và các vùng đánh dấu ảnh này là có thể nhận diện được trong I_{new} , nhờ đặc điểm đơn nhất.

2. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ bước tạo ra ảnh mới I_{new} bao gồm bước tạo ra ảnh của mẫu mô.

3. Phương pháp theo điểm 2, khác biệt ở chỗ ảnh mới I_{new} là bản sao của một trong các ảnh trong chuỗi các hình ảnh này.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ đặc điểm đơn nhất trong các bước d) và e) là đặc điểm có trị số đơn nhất cho mỗi n , $1 \leq n \leq N$.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, khác biệt ở chỗ đặc điểm đơn nhất này là màu sắc chung và trị số đơn nhất của đặc điểm đơn nhất này là màu sắc riêng được kết hợp với chất đánh dấu tế bào cụ thể.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, khác biệt ở chỗ tiêu chí lựa chọn xác định trước bao gồm ngưỡng cho đặc điểm trực quan của vùng đánh dấu chưa được xác định.

7. Phương pháp hiển thị nhóm tế bào nằm trong lát cắt mô vi phẫu, phương pháp này bao gồm các bước:

a) tạo ra (811) lát cắt mô đã được làm cho sẵn sàng cho việc nhuộm phân tử theo cách đã biết từ trước;

b) tạo ra (812) chuỗi gồm K phương tiện phát hiện phân tử cụ thể để liên kết đặc hiệu với và phát hiện ra các thành phần của chuỗi gồm K chất đánh dấu tế bào xác định trước mà có thể có mặt trong lát cắt mô của bước a), các phương tiện phát hiện phân tử này có khả năng tạo ra thông tin về đáp ứng có thể khởi động được và có thể phát hiện được, K là số nguyên > 2 ;

c) đối với mỗi phương tiện phát hiện phân tử cụ thể $k=1,2,..., K$ của bước b) thực hiện quá trình sau:

1) cho (813) lát cắt mô của bước a) tiếp xúc với các phương tiện phát hiện phân tử cụ thể gây ra sự liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào đã được xác định trước;

2) rửa (814) lát cắt mô này để loại bỏ các phương tiện phát hiện phân tử không được liên kết với chất đánh dấu tế bào bất kỳ;

3) khởi động đáp ứng (815) từ phương tiện phát hiện phân tử mà có thể đã liên kết với các chất đánh dấu tế bào của lát cắt mô nhờ đó cho phép phát hiện các phương tiện phát hiện phân tử này; và

4) khi các phương tiện phát hiện phân tử này có thể được phát hiện, thực hiện quét/chụp ảnh (817) lát cắt mô để tạo ra ảnh số sơ cấp I_k mà có thể chứa một hoặc nhiều

vùng đánh dấu chưa được xác định liên quan đến sự tạo thành polyme có thể phát hiện được;

nhờ đó, thu được chuỗi gồm K ảnh số sơ cấp I_k với $k=1, \dots, K$ chứa số lượng tăng dần của các vùng đánh dấu chưa được xác định;

d) thực hiện phương pháp theo điểm 1 trên chuỗi gồm K ảnh số sơ cấp I_k với $k=1, \dots, K$ thu được trong bước c), nhờ đó tạo ra ảnh I_{new} hiển thị các cấu trúc tế bào này.

8. Phương pháp theo điểm 7, khác biệt ở chỗ các phương tiện phát hiện phân tử này là tập hợp của các kháng thể, tốt hơn nếu là các kháng thể đơn dòng hoặc các đoạn kháng thể, trong đó mỗi kháng thể liên kết với chất đánh dấu tế bào đặc hiệu và trong đó enzym được liên hợp với mỗi kháng thể, enzym này có khả năng tạo ra thông tin về polyme có thể phát hiện được khi có mặt một hoặc nhiều cơ chất thích hợp,

trong đó, các bước 1) và 2) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho:

i) lát cắt mô của bước a) được cho tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào đã được xác định trước; kháng thể này được liên hợp với enzym, enzym này có khả năng tạo ra thông tin về polyme có thể phát hiện được khi có mặt một hoặc nhiều cơ chất thích hợp;

ii) sau bước i) trên đây, lát cắt mô được rửa để loại bỏ các kháng thể không được liên kết; và

trong đó, bước 3) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho:

iii) sau bước 2) lát cắt mô được tiếp xúc với một hoặc nhiều cơ chất thích hợp cho enzym này, dẫn đến sự tạo thành các polyme có thể phát hiện được trong trường hợp thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào đã xác định trước có mặt trong lát cắt mô này.

9. Phương pháp theo điểm 7, khác biệt ở chỗ phương tiện phát hiện phân tử này là tập hợp của các phức hợp phân tử, trong đó mỗi phức hợp bao gồm kháng thể thứ nhất, tốt hơn, nếu là kháng thể đơn dòng, liên kết với chất đánh dấu tế bào đặc hiệu, kháng thể thứ hai hoặc đoạn kháng thể, tốt hơn, nếu là kháng thể đơn dòng được liên kết đặc hiệu với kháng thể thứ nhất này, và enzym được liên hợp với kháng thể thứ hai này, enzym này có khả

năng tạo ra thông tin về polyme có thể phát hiện được khi có mặt một hoặc nhiều cơ chất thích hợp,

trong đó, các bước 1) và 2) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho:

- i) lát cắt mô của bước a) được cho tiếp xúc với kháng thể thứ nhất liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào đã được xác định trước;
- ii) sau bước i) trên đây, lát cắt mô được rửa để loại bỏ các kháng thể chưa được liên kết;
- iii) sau bước ii) trên đây, lát cắt mô được cho tiếp xúc với kháng thể thứ hai liên kết đặc hiệu với kháng thể thứ nhất, kháng thể thứ hai này được liên hợp với enzym, enzym này có khả năng tạo ra thông tin về polyme có thể phát hiện được khi có mặt một hoặc nhiều cơ chất thích hợp; và
- iv) sau bước iii) trên đây, lát cắt mô được rửa để loại bỏ các kháng thể không được liên kết; và

trong đó, bước 3) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho:

- v) sau bước 2) lát cắt mô được tiếp xúc với một hoặc nhiều cơ chất thích hợp cho enzym này, dẫn tới sự tạo thành các polyme có thể phát hiện được trong trường hợp thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào đã được xác định trước có mặt trong lát cắt mô này.

10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc điểm 9, khác biệt ở chỗ enzym này được chọn từ nhóm bao gồm photphataza kiềm và peroxidaza, như peroxidaza củ cải ngựa.

11. Phương pháp theo điểm 10, khác biệt ở chỗ cơ chất này được chọn từ nhóm bao gồm 3,3'-diaminobenzidin, xanh lam Ferangi, đỏ bền vững Vulcan, aminoetyl cacbazol (aminethyl carbazole - AEC), và xanh lá Vina.

12. Phương pháp theo điểm 7, khác biệt ở chỗ phương tiện phát hiện phân tử này là tập hợp của các thể liên hợp phân tử bao gồm phần nhận biết được liên kết với phần phát hiện, trong đó phần nhận biết này có khả năng liên kết đặc hiệu với thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào đã được xác định trước, phần nhận biết này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể như kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng và các đoạn của

chúng, và phân tử axit nucleic như phân tử ARN và phân tử ADN, phần phát hiện này là thuốc nhuộm huỳnh quang, thuốc nhuộm huỳnh quang này có khả năng phát bức xạ có bước sóng cụ thể sau khi tiếp xúc với bức xạ kích thích khác với bức xạ phát ra này trong đó, bước 3) của bước c) được thực hiện theo cách sao cho lát cắt mô và phương tiện phát hiện phân tử bất kỳ đã được liên kết vào đó được tiếp xúc với bức xạ kích thích dẫn tới phát ra bức xạ có bước sóng cụ thể trong trường hợp thành phần cụ thể của chuỗi các chất đánh dấu tế bào đã được xác định trước có mặt trong lát cắt mô này; và trong đó, bước 4) của bước c) được thực hiện khi bức xạ có bước sóng cụ thể này được phát ra.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 12, trong đó, cơ chất tạo ra các polyme hòa tan được ít nhất một phần, như xanh Vina hoặc aminoethyl cacbazol (AEC), được sử dụng làm cơ chất để tạo ra polyme có thể phát hiện được, phương pháp này còn bao gồm các bước ;

- e) rửa lát cắt mô này để loại bỏ polyme có thể phát hiện được; và
- f) lặp lại các bước b - d với chuỗi các phương tiện phát hiện phân tử mới.

14. Phương pháp hiển thị phân bố ba chiều của nhiều nhóm tế bào và cấu trúc tế bào nằm trong cùng một không gian ba chiều trong mẫu mô vi phẫu, bao gồm các bước:

- iv) tạo ra mẫu mô, và cắt mẫu này thành nhiều lát cắt mô được chồng chập ban đầu theo cách đã biết từ trước;
- v) thực hiện phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 13 cho tất cả các lát cắt mô thu được trong bước i); và
- vi) chồng các hình ảnh thu được trong bước ii) theo các nguyên tắc đã biết, nhờ đó thu được sự hiển thị ba chiều của phân bố ba chiều của nhiều nhóm tế bào và các cấu trúc tế bào nằm trong cùng một không gian ba chiều trong mẫu mô vi phẫu.

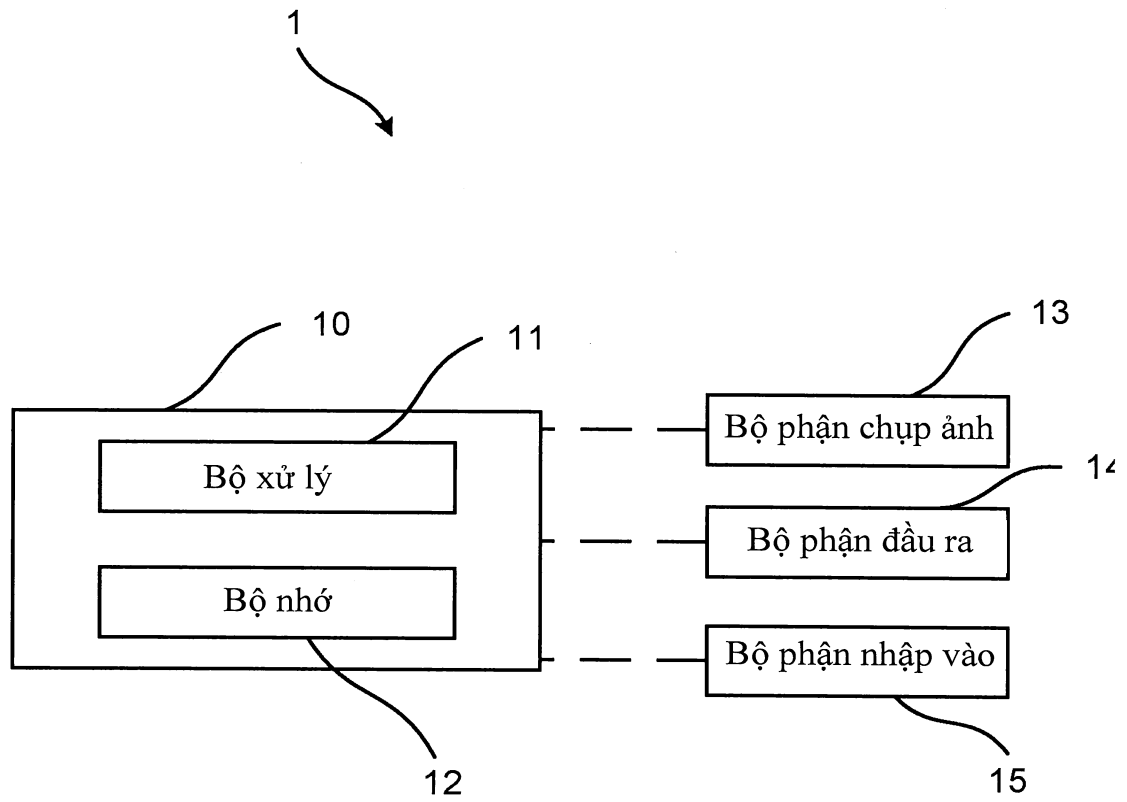
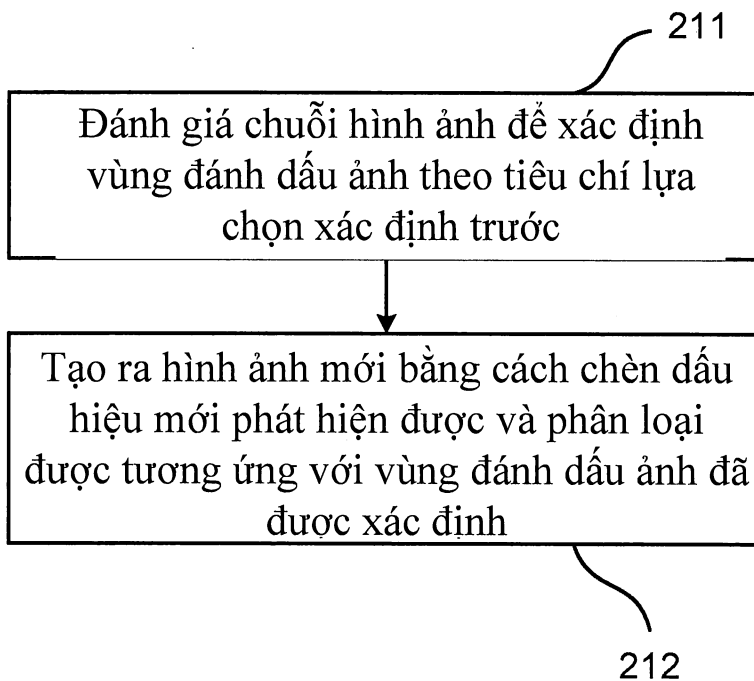
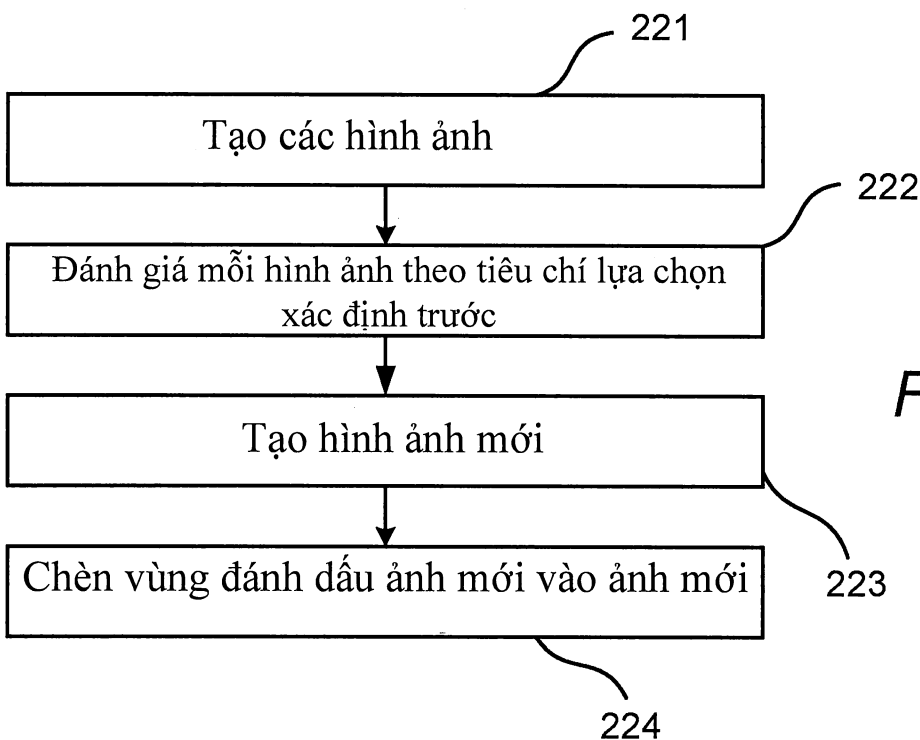
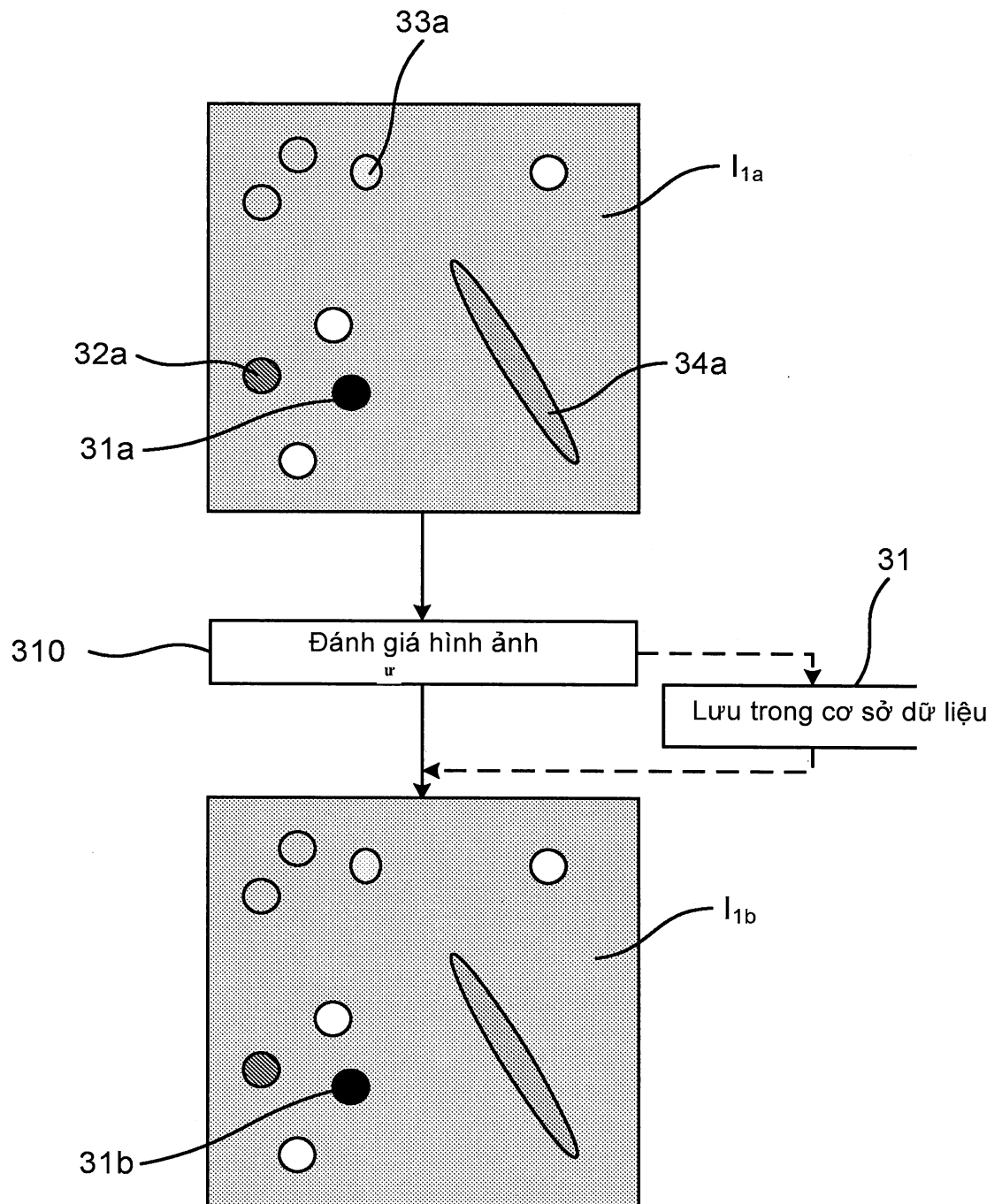
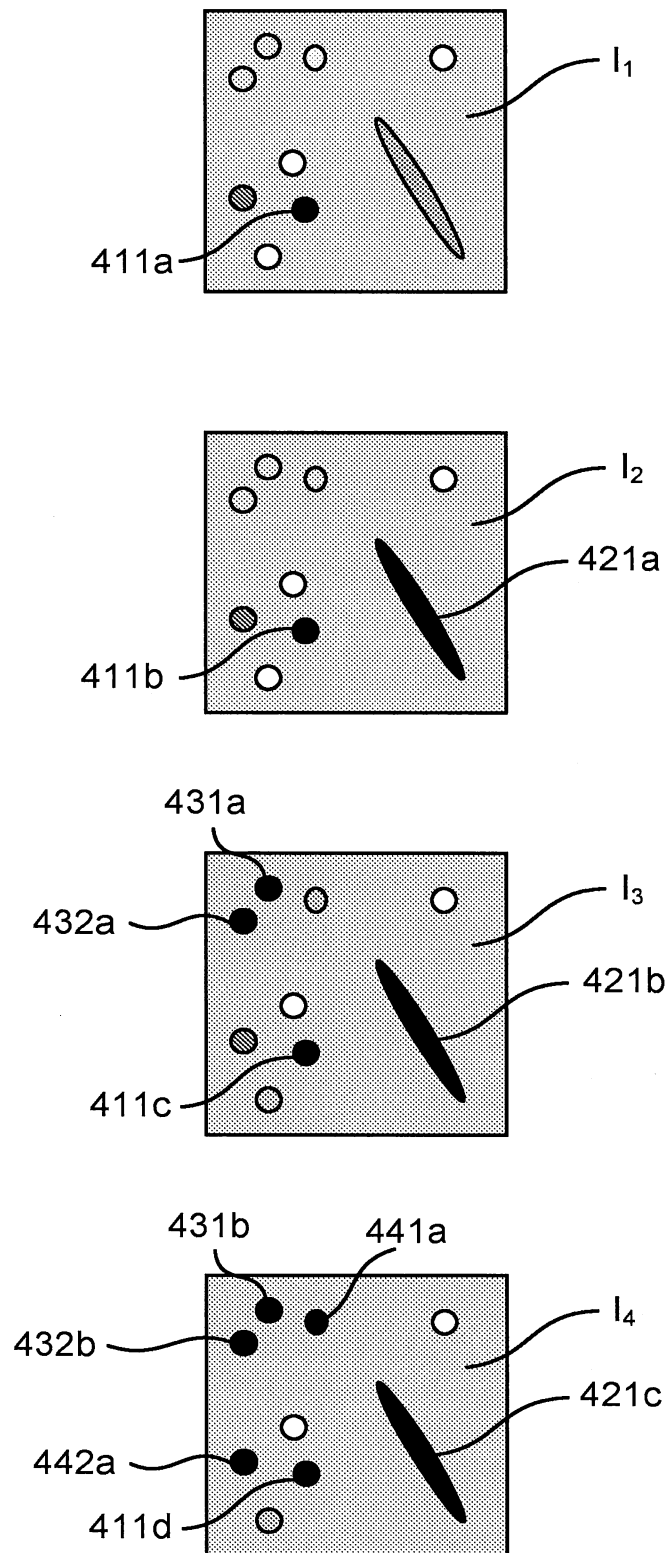
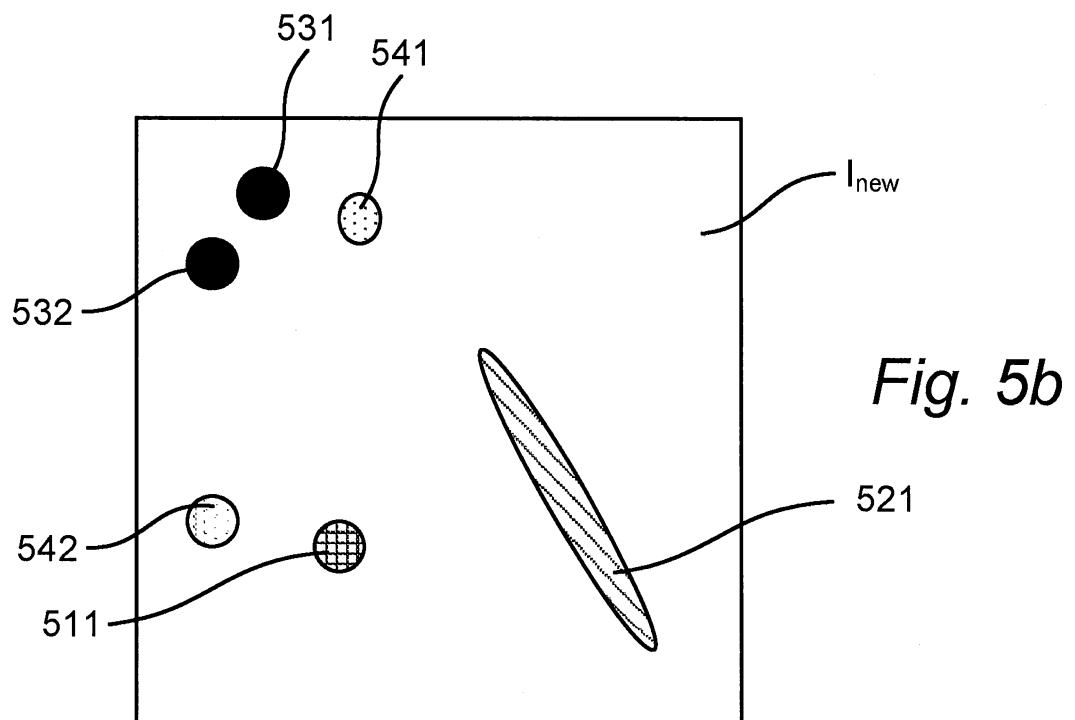
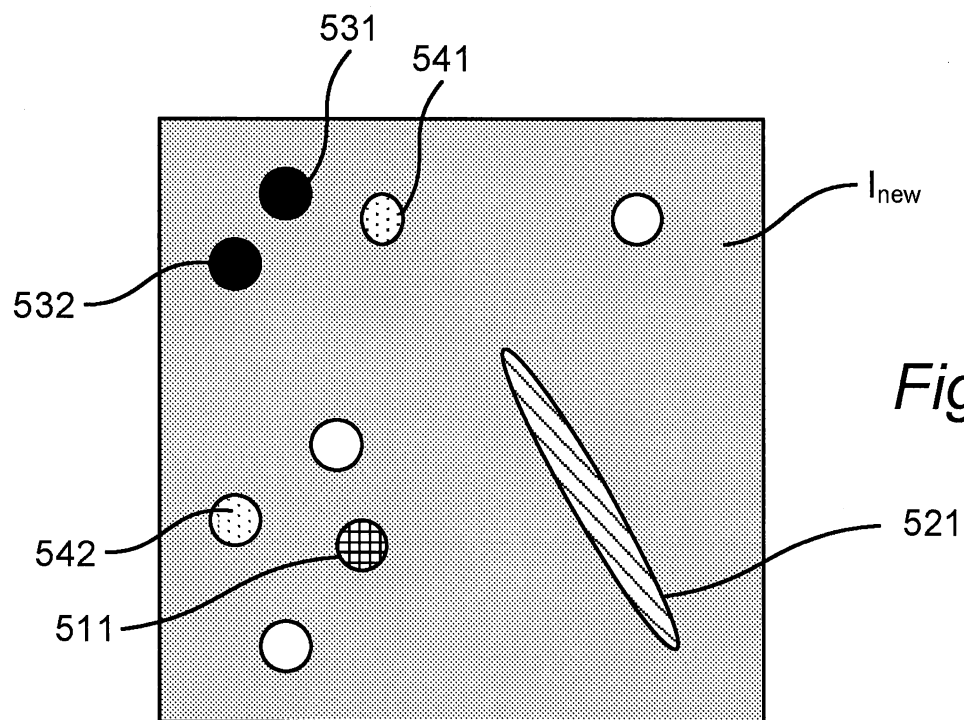


Fig. 1

*Fig. 2a**Fig. 2b*

*Fig. 3*

*Fig. 4*



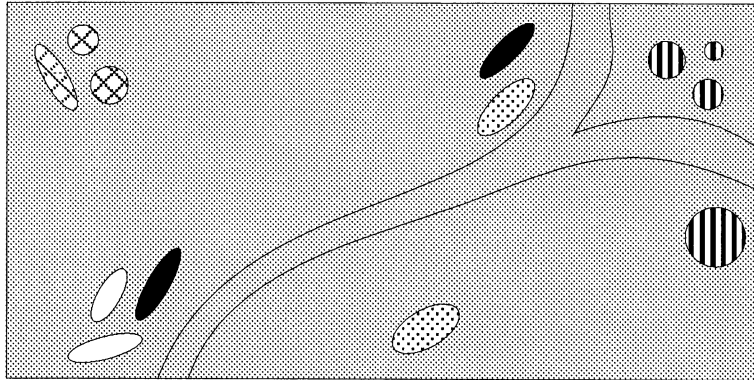


Fig. 6a

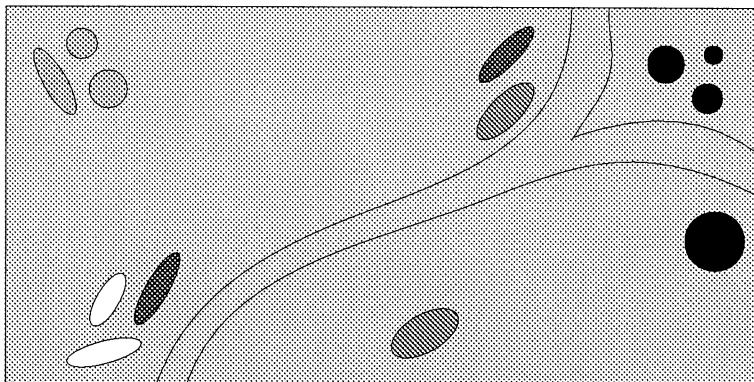


Fig. 6b

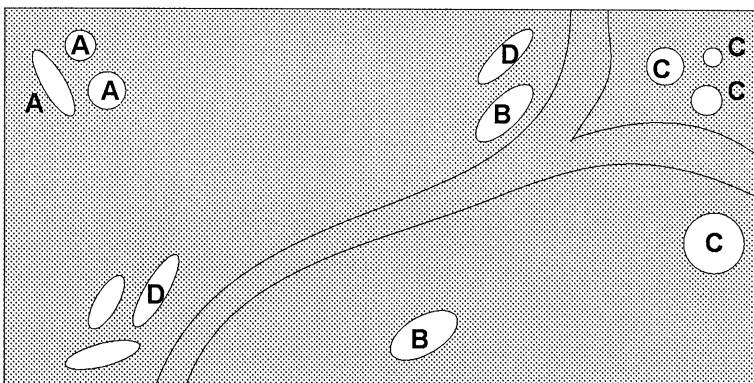
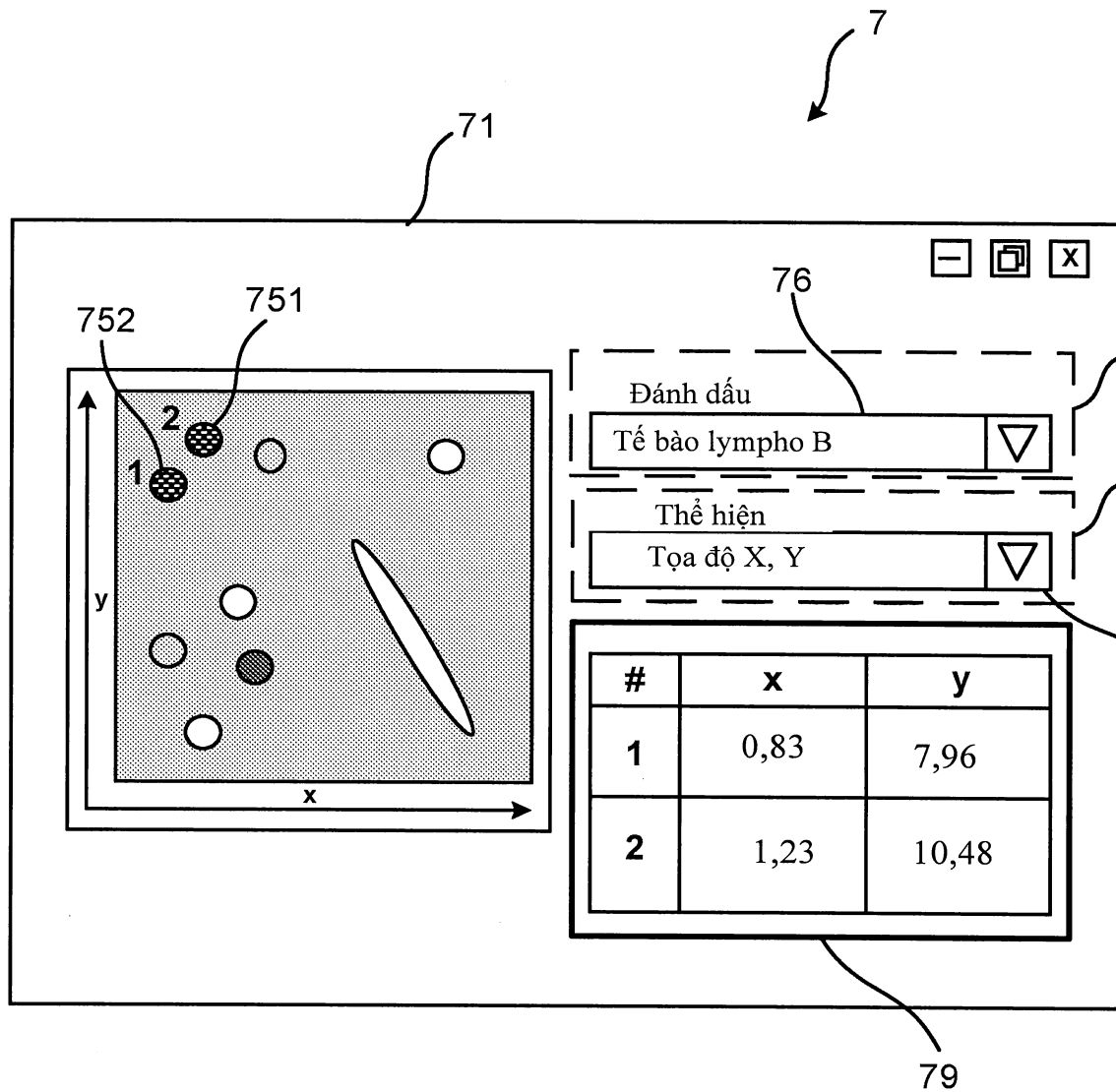
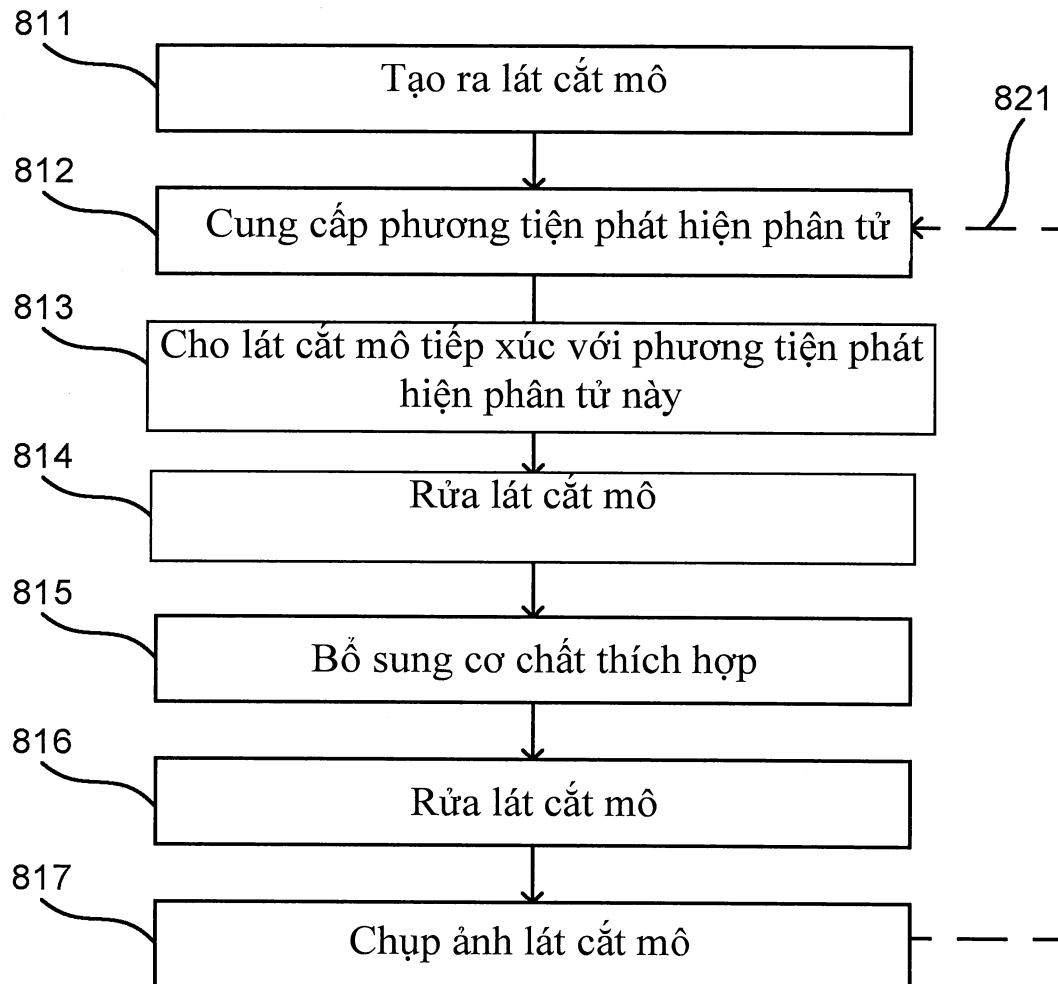


Fig. 6c

*Fig. 7*

*Fig. 8*