

High-throughput imaging platform for 3-dimensional cell cultures using light-sheet microscopy

Ákos Diószdi

Summary of the PhD Thesis

Supervisor: Péter Horváth, PhD, DSc

Doctoral School of Biology,
Faculty of Science and Informatics, University of Szeged

Department of Biochemistry,
HUN-REN Biological Research Centre, Szeged

**HUN
REN**



Szeged

2025

Introduction

In biomedical research, three-dimensional (3D) cell culture systems, collectively referred to as "-oids" such as spheroids, organoids, tumoroids, and assembloids, have emerged as physiologically relevant models. In contrast to traditional two-dimensional (2D) cultures, these systems more accurately mimic the spatial architecture and intercellular dynamics of native tissues. As such, they hold considerable promises for pharmacological screening and therapeutic evaluation. However, a significant obstacle to their potential is the limited options for non-invasive high-content screening (HCS) imaging methods. In order to broaden the applicability of complex 3D-oid models in clinical research, reliable HCS technologies and image analysis methods must be developed, enabling precise quantification of dynamic cellular behaviours and structural features.

Aims

Our objective was to propose a high-throughput light-sheet fluorescence microscopy (LSFM)-based imaging and single-cell level analysis platform for 3D-oids.

The platform starts with the generation of multicellular spheroid models that are prepared for imaging using a variety of treatments, such as optical clearing methods and commercial staining procedures. To ensure consistency and reproducibility, we introduced the SpheroidPicker system that uses automated pre-selection and transfer of morphologically homogeneous samples. A key innovation of the platform is the development of a custom multiwell plate, specifically designed to facilitate LSFM imaging of 3D-oids, optimising both throughput and image quality. Finally, the platform integrates advanced 3D data analysis tools capable of extracting detailed single-cell information, thereby enabling insights into cellular heterogeneity and spatial organisation within the spheroids.

Results

To address key limitations in 3D spheroid imaging and analysis, we developed HCS-3DX, a unified platform that integrates sample handling, imaging, and data processing. In this thesis, five closely connected aims were pursued to establish a reproducible and scalable workflow for high-resolution 3D screening.

First, we highlighted that in 3D research, standardising protocols for spheroid formation, imaging, and analysis significantly enhances reproducibility and methodological transparency. By requiring a minimum set of experimental parameters, ensuring protocol homogeneity, and promoting thorough metadata documentation, the MISpheroID crowdsourced knowledgebase contributes to improving reproducibility across laboratories.

Second, we developed a standardised methodology for the quantitative evaluation of optical clearing protocols tailored to 3D multicellular samples. Optical clearing protocols have traditionally lacked objective evaluation, making protocol optimisation difficult and comparisons

unreliable. To address this, we introduced the intensity variance metric that enabled the consistent and reproducible assessment of clearing efficacy. This approach facilitates protocol benchmarking and supports the selection of optimal clearing strategies for high-resolution imaging of complex 3D cell cultures.

Third, we integrated robotic automation into the sample handling workflow to enable precise and reproducible spheroid selection and transfer. Manual manipulation of 3D cultures often introduces variability and limits throughput, undermining experimental consistency. To overcome this, we developed the SpheroidPicker system, a deep learning-guided robotic platform capable of morphology-based spheroid selection and automated transfer between standard and high-throughput formats. This approach ensures controlled experimental conditions, reduces human bias, and significantly accelerates sample processing.

Fourth, we developed a HCS multiwell imaging plate specifically engineered for LSFM, enabling rapid

screening of multicellular 3D-oids at single-cell resolution. Conventional LSM systems are often limited in throughput and offers complicated sample pre-handling. The multiwell plate overcomes these limitations by integrating an optically optimised foil-based approach that supports automated imaging of intact 3D-oids. This design ensures high-resolution acquisition across wells whilst maintaining spatial fidelity, thereby facilitating scalable and reproducible 3D screening.

Lastly, to extract biologically meaningful features from large volumetric datasets, we implemented a robust image analysis pipeline. Existing tools often fall short in resolving cellular-level features within dense multicellular environments, limiting biological insight. Our pipeline combines AI-driven segmentation with 3D feature extraction algorithms to accurately quantify single-cell morphology, spatial distribution, and phenotypic diversity across large volumetric datasets. This capability enables accurate characterisation of complex 3D-oid architecture and cellular heterogeneity, supporting robust 3D high-content screening in biomedical research.

Összefoglalás

Ez a dolgozat a HCS-3DX platformot mutatja be, mint egy egységes megoldást a háromdimenziós (3D) sejt kultúrák egysejt szintű képképzésére és elemzésére. A dolgozat során öt szorosan összefüggő célkitűzést valósítottunk meg, amelyek együtt egy nagy áteresztőképességű, reprodukálható és automatizált munkafolyamatot eredményeztek. Habár számtalan protokoll és képképző eljárás létezik, a szferoidokkal végzett munkánk során számos, más laboratóriumokban is tapasztalt technikai problémával találkoztunk. Ezért a szferoidminták előállításától kezdve egészen az automatikus, egysejtszintű képfeldolgozásig olyan eljárásokat fejlesztettünk ki, amelyek képesek áthidalni ezeket a technikai kihívásokat. A tézis ezen fejlesztések összefoglalását tartalmazza, különös tekintettel a legújabb megoldásokra.

Munkánk során foglalkoztunk a szferoidmodellek előállításával, dokumentálásával és adatfeldolgozásával kapcsolatos publikációs hiányosságokkal, amelyek gyakran nem tartalmaztak elegendő információt a

kísérletek reprodukálhatóságához. Ennek érdekében a MISpheroID konzorciummal közösen dolgoztunk egy nyilvános adatbázis létrehozásán, amelynek célja a protokollok standardizálása és átláthatósága, elősegítve a laboratóriumok közötti tudásmegosztást.

A 3D sejt kultúrák esetében a képpalkotás nehézségekbe ütközhet a fokozott fénytörés miatt. Bár számos optikai clearing protokoll foglalkozik a minták törésmutatójának javításával, ezek összehasonlítására és értékelésére eddig nem létezett kellően precíz és objektív módszer. Ezért szükségesnek éreztük egy kvantitatív kiértékelési rendszer kidolgozását az optikai clearing protokollok összehasonlítására, amelyet kifejezetten a 3D mintákhoz optimalizáltunk. Az általunk bevezetett intenzitás variancia-metrika lehetővé teszi a különböző clearing oldatok hatékonyságának objektív és reprodukálható kiértékelését, támogatva a legmegfelelőbb eljárások kiválasztását a jobb képminőség érdekében.

A szferoidok automatikus morfológia-alapú kiválogatásához fejlesztettük a SpheroidPicker pipettázó robotot, amely mesterséges intelligencia-alapú képanalízis

módszerek révén képes a szferoidok detektálására és morfológiai analízisére, majd áthelyezi azokat a sejttenyésztő edényből a képalkotásra használt mintatartóba. A SpheroidPicker használatával lehetővé vált a hasonló morfológiájú szferoidok szakértők teljesítményét meghaladó, automatikus kigyűjtése. A rendszer képes teljesen automatizált működésre, ugyanakkor van lehetőség felhasználó vezérelt működtetésre is.

A megfelelő képminőséget biztosító módszerek kidolgozását követően egy HCS képalkotó mintatartó lemez megtervezését valósítottuk meg, amely kompatibilis az általunk használt szelektív sík megvilágítású mikroszkóppal. 3D nyomtató és vákuum fóliázó technológiák használatával előállítottuk a prototípust, amely lehetővé tette, hogy akár több mintát vizsgáljunk meg egyetlen lemezen. A mintatartó számos kísérletben volt tesztelve, ahol megállapítottuk, hogy lehetővé teszi a minták gyorsabb detektálását megfelelő képminőség mellett.

A mintatartó alkalmasnak bizonyult nagy mennyiségű képi adathalmaz előállítására, ezért szükségessé vált egy 3D képfeldolgozó rendszer fejlesztése. Ennek érdekében mesterséges intelligencián alapuló képelemző szoftvert fejlesztettünk, amely képes nagy térfogatú 3D adathalmazokból sejtszintű morfológiai és fenotípusos jellemzők pontos kinyerésére 3D szegmentációs és klasszifikációs módszerek révén.

Összefoglalva, a HCS-3DX platform lehetővé tette az egysejtszintű, precíz és automatizált munkafolyamatokat, így nagy számú minta feldolgozására is alkalmas. A platform széleskörű alkalmazhatósága új lehetőségeket biztosít mind az alap-, mind az alkalmazott kutatásban.

Publications

MTMT ID: 10071366

The graduation procedure is based on the following publications:

Diosdi, A., Hirling, D., Kovacs, M., Toth, T., Harmati, M., Koos, K., Buzas, K., Piccinini, F., Horvath, P. (2021) A quantitative metric for the comparative evaluation of optical clearing protocols for 3D multicellular spheroids. Computational and Structural Biotechnology Journal 19, 1233-1243

IF: 6.155

Diosdi, A., Hirling, D., Kovacs, M., Toth, T., Harmati, M., Koos, K., Buzas, K., Piccinini, F., & Horvath, P. (2021) Cell lines and clearing approaches: a single-cell level 3D light-sheet fluorescence microscopy dataset of multicellular spheroids. Data in Brief 36, 107090

IF: 1.200

Grexa, I., **Diosdi, A.**, Harmati, M., Kriston, A., Moshkov, N., Buzas, K., ... & Horvath, P. (2021). SpheroidPicker for automated 3D cell culture manipulation using deep learning. *Scientific Reports*, 11(1), 14813.

IF: 4.997

Diosdi, A., Toth, T., Harmati, M., Grexa, I., Schrettner, B., Hapek, N., Kovacs, F., Kriston, A., Buzas, K., Pampaloni, F., Piccinini, F., & Horváth, P. (2025) HCS-3DX: a next-generation AI-driven automated 3D-oid high-content screening system. *Nature Communications*.

IF: 15.700

Other publications related to the subject of this thesis:

Hollandi, R., **Diósdi, Á.**, Hollandi, G., Moshkov, N., & Horváth, P. (2020). AnnotatorJ: an ImageJ plugin to ease hand annotation of cellular compartments. *Molecular biology of the cell*, 31(20), 2179-2186.

IF: 4.138

Piccinini, F., Balassa, T., Carbonaro, A., **Diosdi, A.**, Toth, T., Moshkov, N., ... & Horvath, P. (2020). Software tools for 3D nuclei segmentation and quantitative analysis in multicellular aggregates. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 1287-1300.

IF: 7.271

Tasnadi, E. A., Toth, T., Kovacs, M., **Diosdi, A.**, Pampaloni, F., Molnar, J., ... & Horvath, P. (2020). 3D-Cell-Annotator: an open-source active surface tool for single cell segmentation in 3D microscopy images. *Bioinformatics*, 36(9), 2948-2949.

IF: 6.937

Peirsman, A., Blondeel, E., Ahmed, T., Anckaert, J., Audenaert, D., Boterberg, T., ... **Diosdi, A.**, ... & De Wever, O. (2021). MISpheroID: a knowledgebase and transparency tool for minimum information in spheroid identity. *Nature methods*, 18(11), 1294-1303.

IF: 47.990

Pietiäinen, V., Polso, M., Migh, E., Guckelsberger, C., Harmati, M., **Diosdi, A.**, ... & Hepojoki, J. (2023). Image-based and machine learning-guided multiplexed serology test for SARS-CoV-2. *Cell Reports Methods*, 3(8).

IF: 3.900

Diosdi, A., Piccinini, F., Boroczky, T., Dobra, G., Castellani, G., Buzas, K., Horvath, P., & Harmati, M. (2025) Single-cell light-sheet fluorescence 3D images of tumour-stroma spheroid multicultures. *Sci Data* 12, 492.

IF: 5.800

Blondeel, E., Ernst, S., De Vuyst, F., **Diósdí, Á.**, ... & De Wever, O. (2025) Sequential orthogonal assays for longitudinal and endpoint characterization of three dimensional spheroids. *Nat Protoc*.

IF: 13.100

Hollandi, R., Bauer, D., **Diosdi, A.**, Schrettner, B., Toth, T., Hirling, D., Hollandi, G., Harmati, M., Molnár, J., & Horváth, P. (2024) When the pen is mightier than the

sword: semi-automatic 2 and 3D image labelling. bioRxiv
2024.01.15.575658;

IF: not applicable

Cumulative IF: 117.188

Patents:

Diósdí, Á., & Horváth, P. (2022). Lemezösszeállítás minták gyors, automatikus, nagy behatolási mélységgel való vizsgálatára light-sheet mikroszkóppal (Hungarian Utility Model No. U2200088). Hungarian Intellectual Property Office.

Diósdí, Á., & Horváth, P. (2022). Plate assembly for rapid, automatic, high penetration depth examination of samples with a light-sheet microscope, and procedure for its application (Hungarian Patent Application No. P2200213). Hungarian Intellectual Property Office.

Nyilatkozat

Alulírott Dr. Horváth Péter a jelölt (Diósdí Ákos) témavezetőjeként kijelentem, hogy a „High-throughput imaging platform for 3-dimensional cell cultures using light-sheet microscopy” című disszertáció a jelölt saját munkája, melyet a témavezetésem mellett önállóan készített el. Kijelentem, hogy a disszertáció megfelel az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola követelményeinek. Felelős szerzőként kijelentem, hogy Diósdí Ákos jelentősen hozzájárult az alább felsorolt, a doktori eljárás alapjául szolgáló tudományos publikációk eredményéhez.

Diosdi, A., Hirling, D., Kovacs, M., Toth, T., Harmati, M., Koos, K., Buzas, K., Piccinini, F., Horvath, P. (2021) A quantitative metric for the comparative evaluation of optical clearing protocols for 3D multicellular spheroids. Computational and Structural Biotechnology Journal 19, 1233-1243

IF: 6.155

Diosdi, A., Hirling, D., Kovacs, M., Toth, T., Harmati, M., Koos, K., Buzas, K., Piccinini, F., & Horvath, P. (2021) Cell lines and clearing approaches: a single-cell level 3D light-sheet fluorescence microscopy dataset of multicellular spheroids. Data in Brief 36, 107090

IF: 1.200

Grexa, I., **Diosdi, A.**, Harmati, M., Kriston, A., Moshkov, N., Buzas, K., ... & Horvath, P. (2021). SpheroidPicker for automated 3D cell culture manipulation using deep learning. Scientific Reports, 11(1), 14813.

IF: 4.997

Diosdi, A., Toth, T., Harmati, M., Grexa, I., Schrettner, B., Hapek, N., Kovacs, F., Kriston, A., Buzas, K., Pampaloni, F., Piccinini, F., & Horváth, P. (2025) HCS-3DX: a next-generation AI-driven automated 3D-oid high-content screening system. Nature Communications.

IF: 15.700

Igazolom továbbá, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket más PhD dolgozat nem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2025. augusztus 28.

.....

Dr. Horváth Péter

Szegedi Biológiai Kutatóközpont