

# Intelligens Mikroszkóp rendszerek fejlesztése

Ph.D. Tézisfüzet

**Grexa István**

BIOMAG group  
Biological image analysis and machine learning group

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezető  
Dr. Horváth Péter



Interdiszciplináris Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem  
Szeged, 2024

## Bevezető

A mikroszkópos kép elemzése vált alapvető fontosságúvá különböző területeken, mint például a patológia, a gyógyszerfelfedezés és a személyre szabott orvoslás. A gyógyszerkutatókban a high-content screening (HCS) módszerrel vizsgálják a sejtek reakcióját, akár több ezer különböző gyógyszerre, amely képfeldolgozás segítségével kvantifikálható. Az egysejt profilozás, mélyebb molekuláris és fenotípusos betekintést tesz lehetővé, olyan módszerekkel, mint Computer Assisted Microscopy isolation (CAMI) és a deep visual proteomics (DVP). Ezek a módszerek a mikroszkópos képalkotást, mesterséges intelligencia által segített sejtszegmentálást, a lézer mikrodiszekciót és az ultraszenzitív molekuláris elemzést foglalják magukban. A korrelatív mikroszkópiai kísérletek során mikron pontosságú navigációra van szükség a mikroszkópok között [1], [2]. Fizikai tulajdonságokból származó okokból, például a minta kiszáradása, a membrán hajlása a tárgylemezen vagy a motorvezérlő hibái miatt ez a probléma kihívást jelent. [3]. A legmodernebb regisztrációs módszerek megfelelő képzéshez manuális kép igazítást igényelnek [4], [5], ami időigényes, és az szakértői annotátorok száma korlátozott.

Az utóbbi időben egyre több kutatás fókuszál a 3D sejt kultúrákra, mint például a sferoid-ok, amelyek relevánsabb modelleket kínálnak a gyógyszeres teszteléshez és a rákkutatáshoz [6], [7], [8], [9], [10]. Azonban a standardizált protokollok hiánya és a sferoid-ok manuális kiválasztásának jellege kihívást jelent a high-content alkalmazások számára [11].

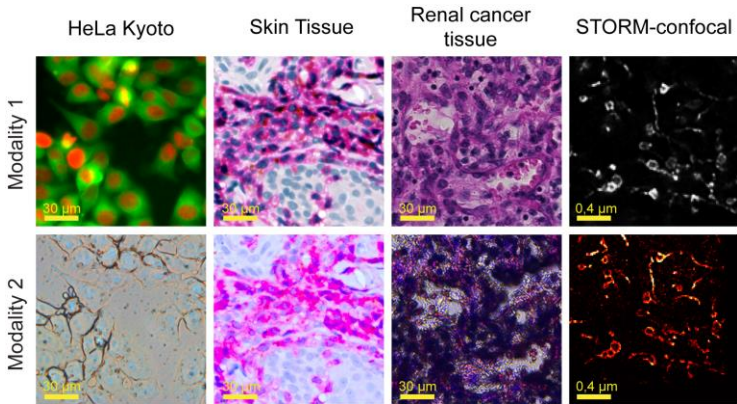
A gyógyszertervezés során standardizált környezet azért fontos, mert így egy adott hatóanyag koncentrációjának hatását sokkal precízebben lehet vizsgálni. Jelenleg a sferoid-ok válogatása manuális módszerrel történik: a

szakértő szemmel és egy pipetta segítségével próbálja mikroszkóp alatt kiválogatni az egyformának tűnő spheroidokat. A módszer szubjektív, a kiválasztás erősen függ a szakértő véleményétől. Mindazonáltal a sikeres spheroid kiválasztás lehetővé teszi a további analíziseket, mint például a gyógyszer screen-elés vagy a nagy felbontású 3D képalkotás.

## 1. Multimodális mikroszkópos kép regisztráció

Egy fejezet a korrelatív mikroszkópiából származó képek automatikus illesztését tárgyalja. A Deep Visual Proteomics módszer alkalmazásakor a kutatónak kézzel kell igazítania a sejtek kontúrjait, hogy azok precízen illeszkedjenek. Ez a folyamat különösen időigényes, ha a sejtek száma több ezerre nő. Ezért az automatizálás jelentősen csökkentené a manuális munka időigényét. A klasszikus kép regisztrációs algoritmusok (SIFT, fázis-keresztkorreláció) viszonylag jól működnek egymodális képeken, azonban a multimodális képek illesztése bizonyos esetekben nehézkes vagy lehetetlen feladat klasszikus módszerekkel.

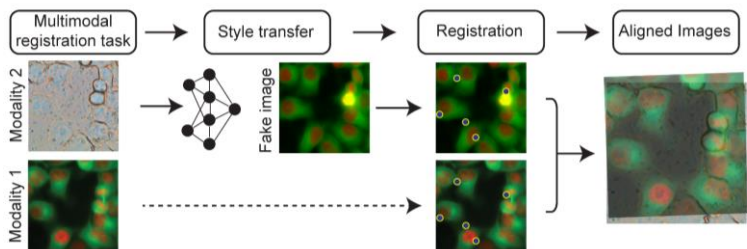
Fejlesztettünk egy olyan regisztrációs algoritmust, amely képes áthidalni a klasszikus képalgoritmusok korlátait.



Ábra 1. A multimodális adathalmazokból egy-egy reprezentatív képpár. [12]

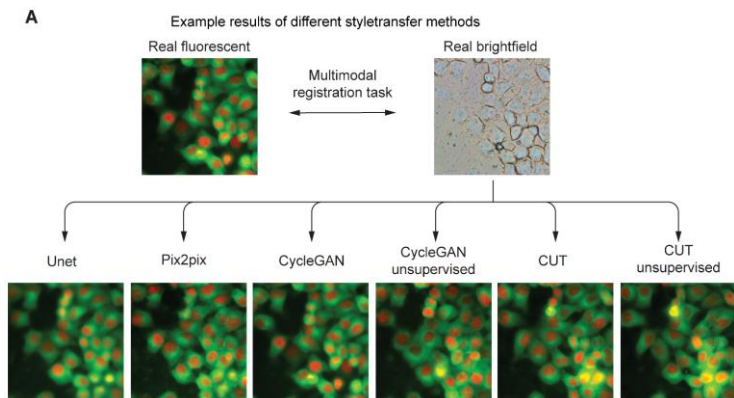
Négy különböző adathalmazt készítettünk, ahol az első sejtkultúrákról készült fluoreszcens és világos látóterű képekkel, a második H&E-vel festett vesetumor különböző képalkotási körülmények között, a harmadik Immun hisztokémiai módszerrel festett bőr minták, a negyedik pedig konfokális és szuper rezolúciós módszerrel készített képpárok (Ábra 1). A képek MATLAB Control Point Selection tool segítségével lettek felannotálva. Az képpárokból készítettünk egy az annotációk alapján illesztett és egy illesztés nélküli adathalmazt.

A különböző regisztrációs algoritmusok két lépésből állnak. Először stílus transzfer segítségével 1.-es Modalitású képpé transzformáltuk a 2. Modalitásút. Az így kapott transzformált és az 1. Modalitású képet regisztráltuk össze a következő módszerekkel: Scale-Invariant Feature Transform (SIFT), SuperPoint, és fázis-keresztcorreláció (Ábra 2).



Ábra 2. A regisztrációs algoritmus lépései.[12]

A következő style transzfer módszereket teszteltük a regisztrációs algoritmusban: U-Net [13], Pix2pix [14], [15], CycleGAN [14], Contrastive unpaired translation (CUT) [16] és Contrastive Multimodal Image Representation (CoMIR) [5] (Ábra 3). A CycleGAN és a CUT módszer felügyelt és felügyelet nélküli adathalmazon is tanítottuk, mivel ezek az algoritmusok párosítatlan adathalmazra lettek fejlesztve.

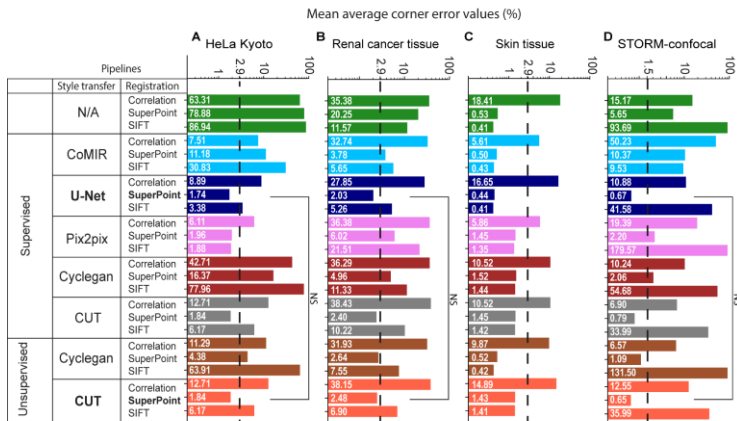


Ábra 3. A különböző style transzfer módszerek eredményeinek kvantitatív összehasonlítása. [12]

A kiértékelésekhez az “átlagos sarokpont hiba” metrikát alkalmaztuk.

$$\text{Average corner error} = \sum_i^4 \frac{|Corner_i^{\text{Ground truth}} - Corner_i^{\text{method}}|}{4}$$

Az összehasonlítás alapja három style transfer nélküli regisztráció volt. Az eredmények azt mutatják, hogy a legkisebb hibákat a felügyelt U-Net és a SuperPoint kombinációja adta. A klasszikus módszerek sok esetben meg sem tudták oldani a regisztrációs problémát, vagy csak nagyon magas hibával, mint például a fluoreszcens világoslátóterű képpárok. A felügyelet nélküli módszerek között a CUT és a SuperPoint algoritmus adta a legkisebb hibaértékeket (Ábra 4.).



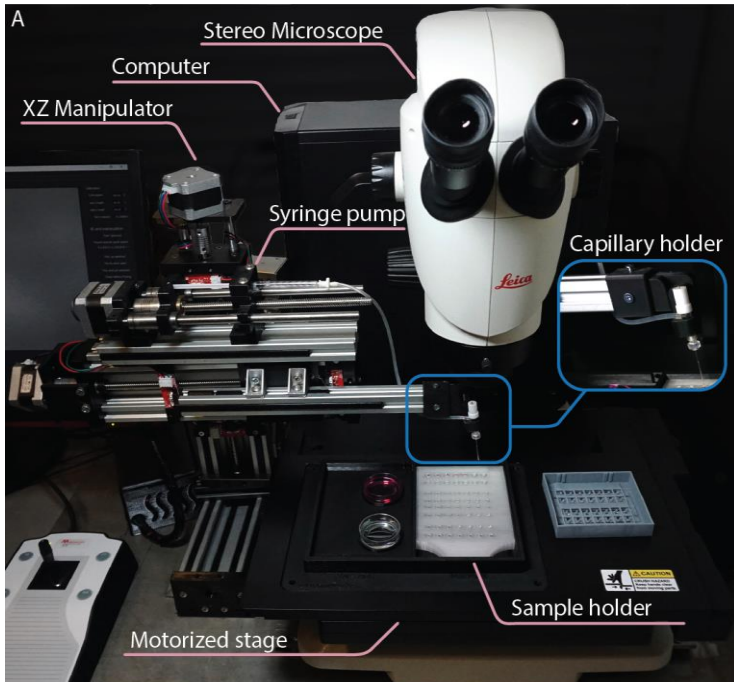
Ábra 4. A regisztrációs algoritmusok kvalitatív összehasonlítása. A-D oszlopokban a négy adathalmaz tesztjein vett eredmények láthatóak. Az elfogadott hibahatár szaggatott vonallal lett jelölve. [12] Wilcoxon teszt segítségével kimutattuk a legjobb felügyelt és felügyelet nélküli algoritmus között statisztikailag nincs szignifikáns különbség.

## 2. Automatikus 3D sejtkultúra válogató robot

A következő fejezet egy olyan mikroszkóp rendszer fejlesztését és vizsgálatát mutatja be, amely képes az automatikus 3D sejtkultúra válogatására.

A fejlesztett rendszer képes spheroid-okat, a felhasználót segítve félautomatikus válogatására, mindezt előre meghatározott kritériumok alapján. Módszerünkkel az előkészítési folyamatban kizárhatjuk az emberi szubjektivitást.

Az eszköz fő alkotóelemei egy sztereó mikroszkóp motorizált asztallal, egy mikromanipulátor, egy fecskendő pumpa, és egy számítógép (Ábra 5). Készítettünk egy C++ szoftvert, amely vezérli a hardvert, futtatja a szegmentációs algoritmust és lehetővé teszi, hogy könnyen válogatni lehessen a spheroid-ok közül.



Ábra 5. SpheroidPicker rendszer felépítése és főbb elemei.

A rendszer a piacon kapható well-platek és petricsészék jelentős részével kompatibilis. A mikromanipulátor mozgatja a pipettát a spheroid-hoz. Az első használat előtt egy egyszerű kalibrációs lépés szükséges, hogy kép koordináta rendszernek megfelelően tudja mozgatni a pipettát.

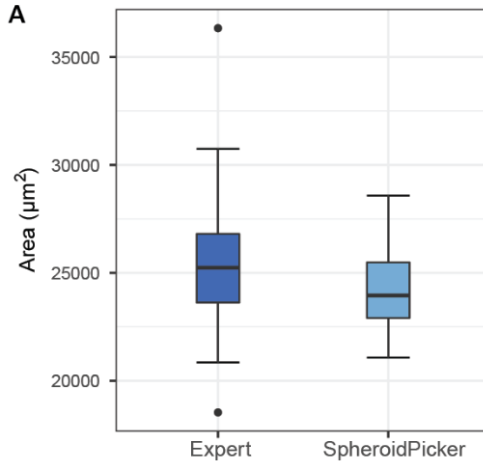
A szoftverben integrálva van egy Mask R-CNN [18] architektúrájú mélytanuló modell is, amely spheroid szegmentációra lett tanítva. Szegmentációs maszkok alapján kiszámítja a megtalált objektumok főbb tulajdonságait, mint terület, kerület, körszerűség és tömegközéppont.

A rendszer az asztal mozgatásának segítségével előre megadott területeket képes szkennelni és a Mask RCNN modell segítségével szegmentálni a spheroid-okat.



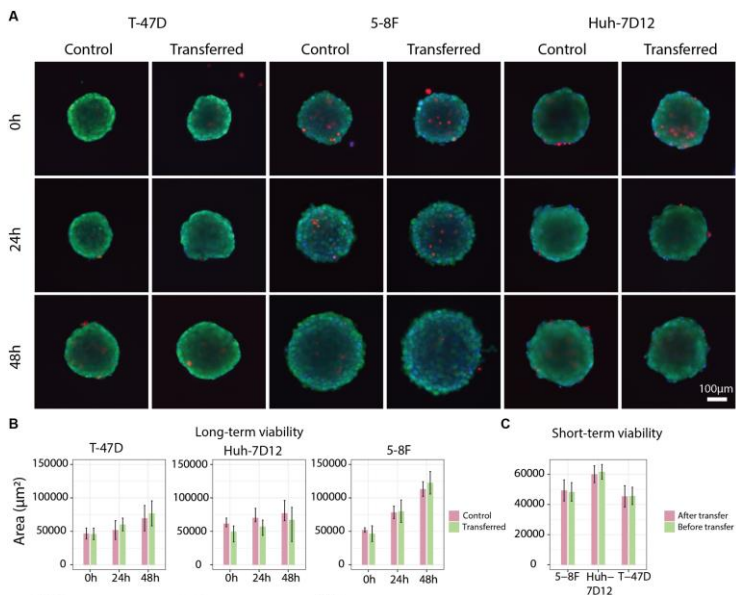
A felhasználó előre definiálhat kritériumokat, amelyek alapján a szűri a megtalált objektumokat. Ezután elindul a transzfer folyamat. A mikroszkóp asztala középre állítja az egyik kiválasztott objektumot. Az X-tengely pontosan felé mozgatja a pipettát, majd a Z tengely leengedi közel a plate aljához. A fecskendő pumpa 3-4  $\mu\text{m}$  folyadékkal felszívja a spheroid-ot. Ezután a Pipetta felemelkedik, majd az asztal a cél plate-t és well-jét középre állítja. Z tengely leereszkedik és megadott mennyiségű folyadékkal kiteszi a spheroid-ot. Z tengely ekkor újra felemelkedik és rendszer kezdi előlről a folyamatot a következő spheroid-dal, vagy ha nincs több kiveszi a pipettát a képből és befejezi a kísérletet.

Az automatikus spheroid gyűjtés minőségét összehasonlítottuk egy szakértőével. Feladat során olyan spheroid-okat kellett választani, amelyek 21000-29000  $\mu\text{m}^2$  (178 $\mu\text{m}$  átlagos átmérőnek felel meg) közötti területtel és 0.815-nél nagyobb körszerúséggel rendelkeznek. A SpheroidPicker és a szakértő is 42-42 spheroid-ot gyűjtött össze. Az eredmények alapján a SpheroidPicker ~1.6x kisebb szórással dolgozik (Ábra 6).



Ábra 6. A szakértő és a SpheroidPicker által gyűjtött spheroid-ok területeink összehasonlítása. [17]

A biológiai kompatibilitás is meg lett vizsgálva. 3 féle sejtvonalat vizsgáltunk meg T47D, 5-8F és Huh-7D12. Ezeket többféle festékkel jelöltük: Etidium-homodimer 1 az elhalt sejteket, Calcein AM az élő sejteket a Hoechst, pedig a sejtmagokat (Ábra 7A). Először megvizsgáltuk, hogy a spheroid-ok túlélnek a transzferálást. Majd hosszútávon 24 és 48 óra után is leellenőriztük. Kimutattuk, hogy a kirakást követően a sejtek nem károsodnak. (Ábra 7B) Háromból kettő sejtvonal szignifikánsan növekszik, 24 és 48 óra elteltével (Ábra 7C).



Ábra 7. Biológiai kompatibilitás tesztelése. A. A különböző sejtvonalakból egy-egy reprezentatív példa transzferálás előtt és után. Vizuálisan is látható a sejtek növekedése 24, illetve 48 óra elteltével. B. A sejtvonalak területének vizsgálata 24-48 óra elteltével. C. Sejtvonalak területének vizsgálata közvetlen az átrakás előtt és után. [17]

## References

- [1] R. Hollandi, Á. Diószdi, G. Hollandi, N. Moshkov, and P. Horváth, “AnnotatorJ: an ImageJ plugin to ease hand annotation of cellular compartments,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 31, no. 20, pp. 2179–2186, Sep. 2020.
- [2] V. Demichev, C. B. Messner, S. I. Vernardis, K. S. Lilley, and M. Ralser, “DIA-NN: neural networks and

- interference correction enable deep proteome coverage in high throughput,” *Nat. Methods*, vol. 17, no. 1, pp. 41–44, Jan. 2020.
- [3] H. H. Rashidi and M. Chen, “Preface: Artificial intelligence (AI), machine learning (ML) and digital pathology integration are the next major chapter in our diagnostic pathology and laboratory medicine arena,” *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 40, no. 2, pp. 69–70, Mar. 2023.
- [4] J. Lu, J. Öfverstedt, J. Lindblad, and N. Sladoje, “Is image-to-image translation the panacea for multimodal image registration? A comparative study,” *PLoS One*, vol. 17, no. 11, p. e0276196, Nov. 2022.
- [5] N. Pielawski *et al.*, “CoMIR: Contrastive Multimodal Image Representation for Registration,” *arXiv [cs.CV]*, Jun. 11, 2020. Available: <http://arxiv.org/abs/2006.06325>
- [6] L. G. Griffith and M. A. Swartz, “Capturing complex 3D tissue physiology in vitro,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 211–224, Mar. 2006.
- [7] S. Nath and G. R. Devi, “Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 163, pp. 94–108, Jul. 2016.
- [8] O. Habanjar, M. Diab-Assaf, F. Caldefie-Chezet, and L. Delort, “3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 22, Nov. 2021, doi: 10.3390/ijms222212200. Available: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212200>
- [9] A. Peirsman *et al.*, “MISpheroID: a knowledgebase and transparency tool for minimum information in spheroid identity,” *Nat. Methods*, vol. 18, no. 11, pp. 1294–1303, Nov. 2021.

- [10] Z. Cesarz and K. Tamama, “Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells,” *Stem Cells Int.*, vol. 2016, Nov. 2015, doi: 10.1155/2016/9176357. Available: <https://doi.org/10.1155/2016/9176357>. [Accessed: Apr. 09, 2024]
- [11] L. R. Cisneros Castillo, A.-D. Oancea, C. Stüllein, and A. Régnier-Vigouroux, “Evaluation of Consistency in Spheroid Invasion Assays,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 28375, Jun. 2016.
- [12] I. Grexa *et al.*, “SuperCUT, an unsupervised multimodal image registration with deep learning for biomedical microscopy,” *Brief. Bioinform.*, vol. 25, no. 2, Jan. 2024, doi: 10.1093/bib/bbae029. Available: <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbae029>
- [13] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, “U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation,” *Lecture Notes in Computer Science*. pp. 234–241, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-24574-4\_28. Available: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4\\_28](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28)
- [14] J.-Y. Zhu, T. Park, P. Isola, and A. A. Efros, “Unpaired Image-to-Image Translation Using Cycle-Consistent Adversarial Networks,” *2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)*. 2017. doi: 10.1109/iccv.2017.244. Available: <http://dx.doi.org/10.1109/iccv.2017.244>
- [15] P. Isola, J.-Y. Zhu, T. Zhou, and A. A. Efros, “Image-to-Image Translation with Conditional Adversarial Networks,” *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. 2017. doi: 10.1109/cvpr.2017.632. Available: <http://dx.doi.org/10.1109/cvpr.2017.632>
- [16] T. Park, A. A. Efros, R. Zhang, and J.-Y. Zhu, “Contrastive Learning for Unpaired Image-to-Image

Translation,” *Computer Vision – ECCV 2020*. pp. 319–345, 2020. doi: 10.1007/978-3-030-58545-7\_19.  
Available: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-58545-7\\_19](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-58545-7_19)

- [17] I. Grexa *et al.*, “SpheroidPicker for automated 3D cell culture manipulation using deep learning,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 14813, Jul. 2021.
- [18] K. He, G. Gkioxari, P. Dollar, and R. Girshick, “Mask R-CNN,” *2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)*. 2017. doi: 10.1109/iccv.2017.322. Available: <http://dx.doi.org/10.1109/iccv.2017.322>