



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica
Strumentazione Biomedica
A.a. 2023/2024
Dicembre 2023

***Sviluppo di un algoritmo automatico
di tracking per cellule in immagini
microscopiche***

Relatori:

Meiburger Kristen Mariko
Salvi Massimo

Candidati:

Vacca Lorenzo

Indice

Introduzione.....	2
1. Drug-Tolerant Persister (DTP)	4
2. Image Processing e Algoritmi Automatici.....	8
2.1 Immagini Digitali	10
2.2 Segmentazione.....	12
2.3 Tracking	15
3. Materiali e metodi	19
3.1 Pre-Processing	21
3.2 Object detection	22
3.3 Fase pre-tracking	25
3.4 Cell Tracking	29
3.4.1 Features extraction	30
3.4.2 Score	31
3.4.3 Meccanismo di assegnazione	32
3.4.4 Gestione degli output	33
4. Risultati e Discussione	36
5. Conclusioni.....	39
Bibliografia	41

Introduzione

Le cellule Drug-Tolerant Persister (DTP) sono una particolare sottopopolazione cellulare in grado di resistere ai trattamenti farmaceutici entrando in uno stato di dormienza o quiescenza detto appunto DTP state. In questo stato acquisiscono la capacità di rallentare il proprio metabolismo fino quasi a fermare la loro proliferazione, riuscendo così a evitare l'apoptosi indotta dai farmaci e a sviluppare talvolta una resistenza vera e propria al trattamento. Il concetto di DTP ha origini dalla microbiologia, dove un gruppo di batteri, inizialmente privo delle caratteristiche genetiche per resistere agli antibiotici, riesce a sopravvivere tramite l'ingresso in questo stato reversibile di inattività e di non-crescita e ad acquisire le mutazioni necessarie per una resistenza permanente agli antibiotici. Lo stesso comportamento è riconducibile ad alcuni sottogruppi di cellule cancerogene. Troviamo cellule o batteri DTP in infezioni croniche o tumori recidivanti, ovvero in quelle condizioni nelle quali malgrado il trattamento risulti inizialmente molto efficace nel contrastare la malattia non riesca a debellarla completamente, perciò dopo un periodo di tempo più o meno lungo, essa si ripresenta in forma più aggressiva e con una minore sensibilità alla terapia svolta in precedenza, sono responsabili della recidività della malattia. Nel cancro possono promuovere lo sviluppo di nuove metastasi in organi molto distanti dal tumore primario anche dopo vent'anni in pazienti considerati clinicamente liberi dalla malattia.

Malgrado la scoperta delle DTPs risalga a circa ottant'anni fa, ad oggi non si conosce con certezza il loro meccanismo di generazione né risultano chiari gli eventi molecolari chiave che consentono ad una cellula tumorale di bypassare la morte cellulare in seguito all'esposizione a terapie antitumorali pro-apoptotiche, in particolare dopo che il processo di apoptosi è già cominciato.

Risulta quindi chiara la necessità di ottenere il maggior numero di informazioni possibili in merito alle cellule DTP, non solo riguardanti la genomica ma anche la loro evoluzione e sviluppo durante la fase di quiescenza.

La loro identificazione specifica è una grande sfida tecnologica con un'elevata importanza clinica: individuando le cellule in stato di farmaco-resistenza persistente sarebbe possibile eliminarle prima che possano portare a una nuova insorgenza della malattia.

Il progetto REAP è un progetto multidisciplinare, finanziato dall'UE, con l'obiettivo di sviluppare un metodo innovativo per l'identificazione specifica delle DTP mediante l'utilizzo di diverse tecniche di image acquisition e image processing. Il presente lavoro di tesi si colloca all'interno di questo progetto con lo scopo di realizzare un algoritmo automatico di tracciamento cellulare per immagini microscopiche a contrasto di fase, che possa essere utilizzato per l'osservazione del comportamento specifico di ogni cellula su un lungo periodo di osservazione.

L'algoritmo, il cui codice è stato scritto in linguaggio Python, è in grado di individuare singolarmente ogni cellula dell'immagine e riconoscerla nel fotogramma successivo, per ogni cellula è assegnata una label la quale identifica la stessa in maniera univoca, per ognuna di esse vengono estratte informazioni quale lo spostamento totale all'interno del periodo di osservazione, l'area, l'eccentricità e la velocità media del suo nucleo. Tali informazioni vengono salvate in un foglio di lavoro Excel sottoforma di tabella insieme all'andamento dell'area e dell'eccentricità di alcune cellule selezionabili.

1. Drug-Tolerant Persister (DTP)

Le Drug-Tolerant Persister furono osservate per la prima volta nel 1944 da Joseph Warwick Bigger, un medico di origini Irlandesi, il quale mentre studiava gli effetti della recentemente scoperta penicillina su una colonia di batteri, si rese conto che una piccola parte di questi riusciva a sopravvivere all'antibiotico e a riprendere la crescita una volta sospeso. L'osservazione importante che Bigger fece fu che questa sottopopolazione poteva essere quasi eliminata del tutto tramite una nuova esposizione alla penicillina, fatta però eccezione per una piccola popolazione residua, questo perché gli organismi residui non erano mutanti resistenti agli antibiotici ma piuttosto una piccola popolazione batterica in grado di sopravvivere agli antibiotici che lui chiamò "persisters"[1].

Come già accennato nell'introduzione, lo stesso comportamento di farmaco-tolleranza persistente è stato osservato anche in sottopopolazioni di cellule cancerogene. Lo stato di DTP permette alle cellule cancerogene di sopravvivere abbastanza allungo alla terapia farmaceutica da sviluppare altri meccanismi di farmaco-resistenza, rendendo molto più complicato ottenere una remissione duratura o una cura completa. La capacità delle cellule tumorali di acquisire aberrazioni genomiche sempre più complesse nel loro fenotipo resistente ai farmaci, unita alla difficoltà nell'identificazione delle DTP con i metodi convenzionali, contribuiscono all'idea di incurabilità che è strettamente legata al cancro.

Per parlare di DTP è necessario prima fare una distinzione netta tra resistenza e tolleranza ai trattamenti farmaceutici. La resistenza si ha in seguito alla comparsa di mutazioni genetiche casuali e spontanee che si verificano in una cellula in fase di crescita, dovuta all'esposizione o meno ai farmaci. Queste mutazioni alterano la

struttura biochimica della cellula in modi spesso nocivi per l'organismo stesso, talvolta invece possono modificare i siti interessati dall'azione del farmaco, riducendo di conseguenza la sensibilità della cellula al trattamento specifico e le capacità curative dello stesso. La resistenza viene quindi ereditata dalle cellule figlie e diventa una caratteristica permanente di tutte le discendenti della cellula madre, è un meccanismo evolutivo utilizzato per garantire la sopravvivenza ed evitare l'estinzione. La tolleranza invece è un meccanismo di adattamento non genetico, ovvero in cui non è coinvolta alcuna mutazione, che per questo motivo non è ereditabile né permanente. È una condizione transitoria che permette la sopravvivenza di un piccolo gruppo di cellule esposte al farmaco, le quali possono sviluppare ma non necessariamente sviluppano una farmaco-resistenza. Pur essendo ben distinte tra loro, queste strategie di sopravvivenza non sono mutuamente esclusive all'interno della stessa popolazione cellulare, infatti si possono osservare nello stesso tumore adattamenti genetici e non genetici alla terapia[6]. L'inefficacia di un trattamento inizialmente ritenuto efficace è perciò dovuta alla presenza di cellule persister che riescono a sfuggire alla pressione terapeutica e che mutano diventando farmaco-resistenti.

Le modalità con la quale le DTP si formano non sono ancora completamente chiarite, esistono due ipotesi principali (figura 1) : la prima è che una piccola parte delle cellule cancerogene abbia, anche prima del trattamento stesso, le capacità proprie di una cellula DTP, cosa che ne consente la sopravvivenza e ne permette la proliferazione e riproduzione quando il trattamento viene sospeso. La seconda ipotesi è che sia la terapia farmaceutica stessa a indurre nelle cellule lo stato DTP, secondo questa ipotesi l'interazione tra cellule, inizialmente sensibili al farmaco, e antitumorali produrrebbe in alcune di esse lo stato di quiescenza caratteristico delle cellule DTP

In entrambi i casi, se il trattamento è prolungato, è possibile che le persister acquisiscano permanentemente diversi tipi di resistenza ai farmaci. Allo stesso tempo però mostrano un fenotipo reversibile che gli permette di riprendere la proliferazione e riacquisire la sensibilità al farmaco qualora la sua somministrazione fosse interrotta.

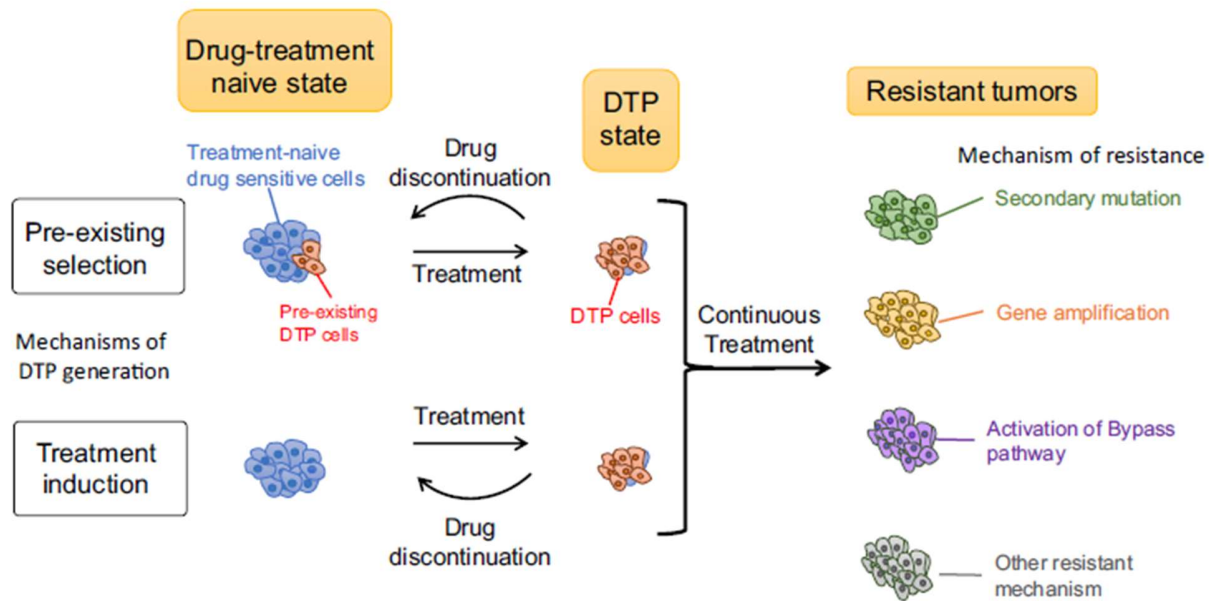


Figura 1 La figura mostra le due ipotesi di generazione delle DTP, in alto possiamo vedere il meccanismo di selezione di cellule DTP pre esistenti mentre in basso è raffigurato il meccanismo di generazione indotto dal trattamento stesso [2].

Le cellule DTP rappresentano una rara popolazione cellulare la quale rallenta o ferma del tutto il proprio ciclo cellulare in presenza di una concentrazione citotossica di farmaci terapeuticamente rilevanti, sono in grado di adattarsi alle alterazioni microambientali modificando il proprio fenotipo per entrare in una fase di diapausa.

Sono caratterizzate da un ridotto ciclo cellulare e da una proliferazione ristretta reversibile che le rende simili a cellule staminali cancerogene (CSC), entrambe sono in grado di entrare nello stato G0 detto di quiescenza, uno stato di attesa nel ciclo cellulare nel quale non avviene nessuna divisione. Un'altra importante similitudine tra queste due tipologie di cellule è la capacità di uscire dallo stato di senescenza, dovuto

alla fine del telomero e quindi al naturale invecchiamento cellulare, per rientrare nel ciclo cellulare, cosa che nelle DTP potrebbe essere la principale causa della tolleranza ai farmaci che le contraddistingue

Riescono a rallentare il proprio metabolismo riducendo la dipendenza dalla glicolisi per la produzione di energia affidandosi maggiormente alla fosforilazione ossidativa mitocondriale, provocando però un maggiore stress ossidativo. Inoltre vengono implementate strategie alternative per sostenere il proprio metabolismo nella maniera meno dispendiosa possibile, quali ad esempio l'autofagia o l'ossidazione degli acidi grassi. L'autofagia in particolare è un meccanismo di riciclo dei metaboliti derivanti dalla degradazione di macromolecole che insieme all'ossidazione degli acidi grassi sostiene la produzione di ATP nei mitocondri.

Inoltre, le cellule DTP sono in grado di modificare significativamente il loro ambiente extracellulare rendendolo più adatto per sviluppare una farmaco-resistenza e per lo sviluppo tumorale. È dimostrato che le CSCs come le DTP siano in grado di facilitare la selezione di un particolare tipo di cellule T, le quali regolano l'espressione di antigeni associati ai tumori e molecole coinvolte nella loro costruzione ed esposizione nella membrana cellulare cosa che facilita l'evasione immunitaria e rende più complicata la risposta immunitaria mediata dalle cellule T.

Infine queste cellule sono caratterizzate da un'aumentata plasticità cellulare che ne facilita l'evasione immunitaria e gli adattamenti non genetici grazie ai quali acquisiscono la tolleranza ai trattamenti farmaceutici, inoltre i cambiamenti nell'organizzazione della cromatina modulano i programmi di trascrizione cellulare per adattarsi allo stress dovuto all'esposizione ai farmaci.

2. Image Processing e Algoritmi Automatici

L'Image Processing è quella branca del Signal Processing che ha come oggetto di studio le immagini digitali, l'elaborazione avviene per mezzo di algoritmi automatici (e non) su sistemi informatici. Rispetto ad un segnale, il contenuto informativo di un'immagine è sicuramente maggiore a livello percettivo, anche se caratterizzato da una più elevata variabilità. Le applicazioni di quest'area di studio sono molteplici, alcune legate allo sviluppo del settore dell'intrattenimento come la computer grafica e gli effetti speciali cinematografici, altre alla ricerca scientifica, all'esplorazione dello spazio e alla ricerca medica.

La vista è infatti il più sviluppato dei nostri sensi e quindi non stupisce che abbia un'importanza così rilevante nella percezione umana. Malgrado questo, la nostra capacità visiva è limitata ad una piccola parte dello spettro elettromagnetico, a differenza dei sistemi meccanici di acquisizione delle immagini che invece coprono l'intero spettro, dalle onde radio alle gamma e possono quindi generare immagini da sorgenti che gli esseri umani non sono abituati ad associare a delle immagini.

L'elaborazione delle immagini digitali comprende i processi in cui sia l'input che l'output è costituito da immagini, ma include anche quelli che servono all'estrazione di particolari attributi e caratteristiche numeriche dell'immagine, o quegli algoritmi che sono in grado di individuare e tracciare la posizione di uno o più oggetti rappresentati nella stessa.

La storia dell'Image Processing è intimamente legata allo sviluppo tecnologico dei computer e di tutte le tecnologie ad essi correlate come display, sistemi di trasmissione e di archiviazione dati, in quanto le immagini digitali richiedono un ampio spazio di memoria e un grande potere computazionale. Bisognerà aspettare fino al 1960 per

avere dei computer in grado di soddisfare queste necessità e cominciare quindi a parlare di image processing. In campo medico una delle sue prime applicazioni risale al 1970 con l'invenzione della Tomografia Computerizzata (CT), segnando uno dei più importanti eventi dell'immagine processing nella diagnosi medica. Da allora c'è stata una crescita esponenziale di sistemi hardware e software per l'elaborazione di immagini in campo clinico, portando allo sviluppo di numerosi strumenti di supporto alla diagnosi, in grado di fornire dati numerici oggettivi che facilitassero le scelte del medico, ma anche sistemi in grado di costruire immagini tridimensionali o funzionali sfruttando l'interazione di diverse forme di energia con i tessuti biologici.



Figura 2 Godfrey Hounsfield, inventore del macchinario per la CT, affianco al primo EMI-Scanner nel 1972, quando riuscì per la prima volta a ottenere un'immagine del cervello umano <https://www.smithsonianmag.com/innovation/fifty-years-ago-the-first-ct-scan-let-doctors-see-inside-a-living-skull-180978792>

L'utilizzo di algoritmi automatici nell'immagine processing è dovuto al metodo con cui vengono rappresentate le immagini digitali, essi ne eseguono l'elaborazione per mezzo di strumenti matematici e statistici. Tra questi vedremo, nei paragrafi successivi, gli algoritmi di segmentazione e di tracking.

2.1 Immagini Digitali

Le immagini digitali sono essenzialmente matrici a due o tre dimensioni, i cui valori, indicati da indici di riga e colonna (per matrici 2D), rappresentano ognuno un pixel dell'immagine. Il pixel è l'entità minima dell'immagine, ad ognuno di essi è associato un valore numerico che ne indica l'intensità, dunque un solo colore. La codifica del colore è fatta da soli numeri interi ed è necessario stabilire quella che viene chiamata dinamica, ovvero il range di valori interi utilizzati per rappresentare il colore. La dinamica è condizionata dal numero di bit utilizzati per la codifica, solitamente si utilizza un byte ovvero 8 bit per un totale di 256 valori rappresentabili che vanno da 0 a 255. La colormap determina invece la corrispondenza di un valore numerico a un colore specifico, solitamente lo zero corrisponde al nero e 255 al bianco, in mezzo tutte le tonalità del grigio che variano in maniera lineare. Per le immagini a colori è invece necessario rappresentare uno spazio colore, le cui componenti cambiano a seconda della codifica scelta, la più comune è la codifica RGB. Con questa codifica il colore di ogni punto è dato dalla combinazione dei tre colori fondamentali che costituiscono lo spazio colore ossia verde, rosso e blu. La combinazione lineare di questi tre elementi permette di ottenere tutte le sfumature di colore. Ad ogni pixel si associa, non più un singolo valore ma una terna di numeri interi ognuno tra zero e 255 (per 8 bit). Le immagini a colori sono quindi costituite da una matrice tridimensionale composta da tre matrici bidimensionali ognuna rappresentante una scala monocromatica. Esistono anche immagini in cui la codifica è binaria, ossia ogni pixel è rappresentato da un singolo bit e può quindi assumere due soli valori, 0 o 1 che possono codificare rispettivamente solo il nero e il bianco. Per quanto semplici sono fondamentali perché permettono la creazione delle così dette maschere, immagini di supporto che indicano la presenza o meno di un elemento all'interno dell'immagine a cui fanno riferimento.

Vengono utilizzate per delineare il profilo di un oggetto di interesse e applicare gli algoritmi di elaborazione esclusivamente nel sito di interesse. In queste, il background è rappresentato in nero mentre l'oggetto in bianco.

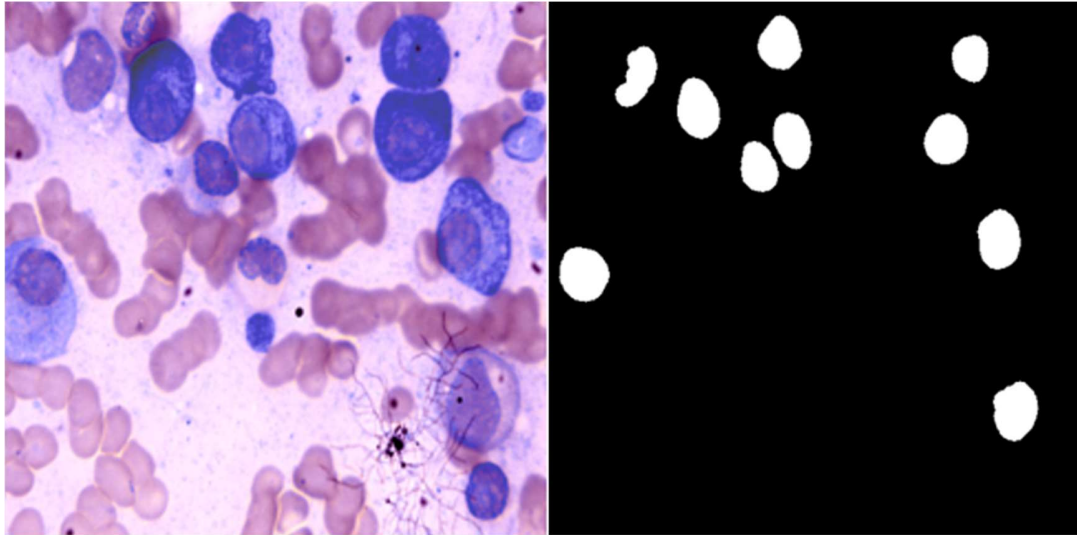


Figura 3 A sinistra un'immagine istologica di un insieme di cellule tra cui delle plasmacellule, a destra la maschera che rappresenta i nuclei delle sole plasmacellule

A differenza dei segnali digitali, nei quali per valutarne la qualità è sufficiente osservare il rapporto segnale-rumore (SNR), per le immagini non esiste un singolo indicatore numerico che ne indichi la qualità, ma vanno tenuti in considerazione più parametri. Uno di questi è la risoluzione, che ha tre diverse declinazioni: la risoluzione spaziale indica il più piccolo oggetto rappresentabile, coincide con la dimensione fisica del pixel, la risoluzione in dinamica o ampiezza che indica il range o il tono del colore rappresentabile sull'immagine che dipende dal numero di bit utilizzati e infine la risoluzione temporale ovvero il frame rate che un dispositivo garantisce. Oltre a questi, generici e comuni a tutte le immagini, ce ne sono altri utilizzati per caratterizzare la qualità di un immagine ovvero la luminosità e il contrasto. La luminosità è il valore numerico associato ad ogni pixel che ci dice quanto esso sia chiaro o scuro, può essere variato banalmente sommando o sottraendo un valore, l'operazione è reversibile a

meno di effetti di saturazione. Il contrasto è invece definito prendendo come riferimento un oggetto su uno sfondo e calcolando la differenza tra i valori medi dei pixel costituenti l'oggetto e di quelli che costituiscono lo sfondo. Si ottiene un valore adimensionato che è positivo se l'oggetto è più chiaro dello sfondo, negativo viceversa. Per modificarlo non basta una semplice operazione di somma o sottrazione, essendo calcolato in maniera relativa è necessaria un'operazione proporzionale: si calcola la luminanza, che è il valore medio dei pixel dell'immagine e si sceglie un fattore di variazione del contrasto espresso in percentuale, ogni pixel diventerà più chiaro o più scuro in base alla sua distanza dalla luminanza e al fattore di contrasto scelto.

2.2 Segmentazione

La segmentazione è il processo di suddivisione di un'immagine in zone significative o oggetti di interesse. Spesso, quando si utilizza un algoritmo di image processing per rispondere ad un quesito clinico, ci si trova di fronte ad un problema di segmentazione, questi algoritmi infatti sono quelli che trovano maggiori applicazioni nell'elaborazione di immagini mediche. Si tratta di un concetto molto ampio che racchiude in sé diverse definizioni, è sinonimo di riconoscimento di un oggetto, di classificazione e di individuazione delle discontinuità, in generale per segmentazione si intende l'operazione di suddividere l'immagine in regioni di interesse omogenee rispetto ad una o più caratteristiche dell'immagine. Perciò mentre l'operazione di suddivisione è comune a tutti gli algoritmi di segmentazione, lo scopo perseguito varia coprendo un vasto spettro di applicazioni, in quanto si tratta di un punto di partenza nell'interpretazione di un'immagine medica.

Il risultato di un'operazione di segmentazione è una maschera binaria nella quale l'oggetto o gli oggetti riconosciuti come appartenenti alla zona di interesse hanno valore uno mentre i non appartenenti hanno valore zero. L'operazione di

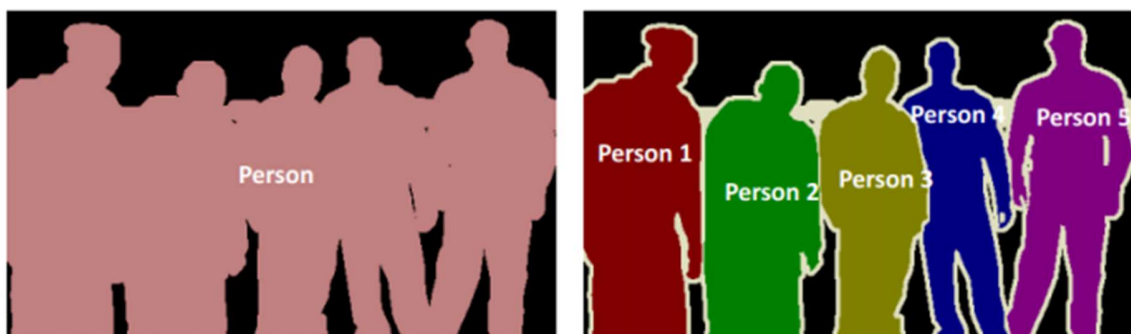
riconoscimento di qualcosa in image processing coinvolge sempre l'utilizzo di una maschera binaria. È importante che l'oggetto della segmentazione sia definito in maniera chiara e inequivocabile, la segmentazione presuppone una decisione sull'appartenenza di ogni pixel all'oggetto di interesse. Ogni pixel può essere classificato o come appartenente all'oggetto o allo sfondo, non ci sono vie di mezzo, se la segmentazione prevede l'esistenza di più classi queste devono essere mutuamente esclusive.

La pipeline di un algoritmo di segmentazione basilare prevede che dall'immagine originale, di cui bisogna conoscere la quantificazione, ovvero le dimensioni fisiche di ogni pixel, l'eventuale presenza di rumore e il tipo di informazione portata in modo da non alterarlo, si proceda con il riconoscimento mediante un filtraggio o un algoritmo specifico, per poi costruire di conseguenza la maschera binaria. Eventualmente, qualora lo scopo fosse una classificazione, si possono usare delle reti neurali o dei classificatori per l'assegnazione della classe di appartenenza.

Esistono svariati modi per effettuare il riconoscimento, alcuni molto semplici come ad esempio un Global Thresholding, altri più complessi quali gli algoritmi che sfruttano l'intelligenza artificiale. Il Global Thresholding è implementabile in immagini in cui è presente una distribuzione delle luminosità bimodale netta che renda possibile l'individuazione di una soglia di luminosità, al di sotto di questa soglia i pixel sono ritenuti appartenenti allo sfondo, al di sopra all'oggetto. Gli algoritmi di segmentazione basati sulle reti neurali sono invece molto più dinamici e performanti, utilizzano una serie di operazioni matematiche consecutive sull'immagine per assegnare ogni pixel alla classe di appartenenza. Alcuni di questi, basati sul deep learning, una sottocategoria del machine learning, non necessitano di un'estrazione preventiva di quelle che vengono chiamate features, ovvero delle caratteristiche specifiche dell'oggetto utilizzate per

effettuare la classificazione, ma sono in grado di estrarle automaticamente dall'immagine tramite una serie di convoluzioni e deconvoluzioni restituendo in output la segmentazione dell'immagine originale. Sono algoritmi supervisionati, ovvero nel loro training set sono presenti anche i risultati della segmentazione tramite il quale viene fatto l'aggiustamento dei pesi della rete, necessitano di un training set molto ampio ma sono in grado di raggiungere livelli di accuratezza molto elevati. Questi ultimi rappresentano sicuramente lo stato dell'arte della segmentazione in image processing, malgrado questo non esiste un algoritmo ottimale che possa essere utilizzato per ogni tipologia di immagine medica o per qualsiasi quesito clinico, questo perché il tipo di oggetto da individuare o classificare e le sue caratteristiche all'interno dell'immagine sono determinanti per l'esito dell'operazione.

Esistono due tipi di segmentazione, la segmentazione semantica e la segmentazione per istanze: la prima classifica ogni pixel come appartenente o meno ad una classe senza però distinguere diverse istanze della stessa classe, la seconda invece identifica separatamente ogni istanza della classe assegnandogli una label specifica.



Semantic Segmentation

Instance Segmentation

Figura 4 A sinistra un esempio di segmentazione semantica, è possibile notare che ogni istanza della classe "person" è riconosciuta come un unico oggetto, a destra un esempio di segmentazione per istanze dove al contrario ognuna di esse è identificata singolarmente
<https://api.andreaprovino.it/wp-content/uploads/2020/11/object-detection-vs-semantic-segmentation-vs-image-segmentation-deep-learning-italia-1024x290.png>

2.3 Tracking

Con il termine object tracking o tracking si indica quel processo che permette di tenere traccia della posizione di uno o più oggetti all'interno di un video o una serie di immagini temporalmente consecutive. Tale operazione presuppone sempre uno stadio preventivo di identificazione dell'oggetto, che può essere fatto tramite segmentazione, per automatizzare l'intero processo, oppure può essere richiesto all'utilizzatore di fornire la posizione iniziale dell'oggetto da tracciare. Una volta stabilita la posizione iniziale, gli algoritmi di tracking ne annotano la posizione, sfruttando meccanismi diversi a seconda delle caratteristiche del target, riescono a riconoscere l'oggetto di interesse nel frame successivo e ne aggiornano la posizione. Possiamo dividere questi algoritmi in base al numero di elementi di cui devono tenere traccia in single object tracking (SOT) o multiple object tracking (MOT), questi ultimi solitamente risultano più complessi e necessitano di un numero maggiore di informazioni per riuscire a discriminare i singoli oggetti tra loro.

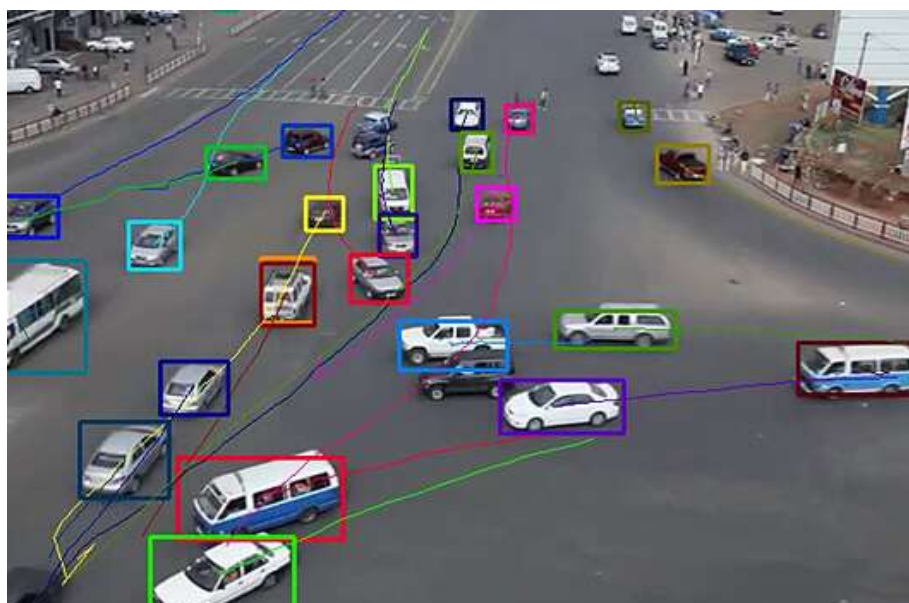


Figura 5 Un esempio di applicazione di un algoritmo di multi object tracking a sistemi di controllo del traffico, ogni oggetto tracciato e racchiuso in una bounding box e per ognuno viene stimata la traiettoria <https://aidetic.in/blog/2020/10/05/object-tracking-in-videos-introduction-and-common-techniques/>

Le difficoltà connesse a questo task sono molteplici e riconducibili a diversi fattori. La qualità delle immagini è sicuramente un fattore determinante per il tracciamento, la presenza di rumore o la bassa definizione incidono sul riconoscimento e possono indurre l'algoritmo in errore. Se durante l'acquisizione il target si trova in movimento questo sarà sfocato nell'immagine risultante, quello che in inglese viene chiamato motion blurring e che aumenta all'aumentare della velocità dell'oggetto, rendendo difficoltoso sia il riconoscimento che, di conseguenza, il tracciamento nei frame successivi. Stessa cosa si può dire per variazioni di illuminazione importanti o deformazioni, ad esempio nel tracciamento di una persona il passaggio dalla posizione seduta a in piedi potrebbe creare difficoltà e mismatch nell'algoritmo.

Per risolvere queste problematiche e riuscire a effettuare correttamente il tracciamento, i sistemi di tracking moderni implementano un apposito pre processing per eliminare o mitigare le caratteristiche non volute nell'immagine oppure, se basati su intelligenze artificiali queste vengono allenate con un dataset che comprenda tali caratteristiche in modo che l'algoritmo non ne sia influenzato.

L'occlusione è una delle più comuni sfide quando si parla di tracking, è quel fenomeno di interferenza che si verifica quando l'oggetto viene coperto da qualcosa, questo può confondere l'algoritmo che erroneamente individua come target l'oggetto interposto, con un conseguente mancato tracciamento. In generale uno sfondo densamente popolato introduce informazioni ridondanti o rumore aumentando la complessità del task. In questo caso una soluzione può essere quella di implementare un sistema di predizione della traiettoria tramite il quale l'algoritmo ipotizza la zona in cui il target potrebbe trovarsi e cerca di individuarlo lì.

Possiamo inoltre affermare che la difficoltà nel tracciamento del target è inversamente proporzionale all'unicità delle sue caratteristiche all'interno dell'immagine, risulta più

semplice tracciare un oggetto con una forma o un colore particolare, non ritrovabile in altri elementi, rispetto al tracciare un oggetto le cui caratteristiche risultano condivise con altri elementi.

Come visto per la segmentazione, anche per il tracking non esiste un algoritmo ottimale, come nel caso precedente, data la variabilità delle immagini e dell'oggetto non è possibile che lo stesso algoritmo sia in grado di tracciare qualsiasi tipo di oggetto in qualsiasi tipo di immagine. Malgrado questo ad oggi lo stato dell'arte è rappresentato dagli algoritmi di tracking basati sul deep learning, questi, appositamente allenati, sono in grado di tenere traccia di molteplici oggetti in diverse condizioni, possono predire la traiettoria del target e individuarlo anche quando nello sfondo è presente un gran numero di oggetti simili. Trovano applicazione in moltissimi ambiti, quali ad esempio nella robotica, nel monitoraggio del traffico, in sistemi di guida autonoma e in medicina.

In quest'ultimo ambito l'applicazione di sistemi di tracking ha permesso ad esempio di studiare il comportamento di alcune tipologie di cellule in maniera dinamica e per lunghi periodi di tempo.

Tracciare cellule in movimento in sequenze di immagini o video è sicuramente un'operazione stimolante ma complicata in quanto presenta molte delle problematiche viste in precedenza, inoltre le cellule cambiano forma, si duplicano e interagiscono in varia maniera con l'ambiente circostante, rendendo ancora più complicato il loro tracciamento. Per visualizzare la loro migrazione, la microscopia ottica rimane la modalità di imaging più appropriata, alcune di queste tecniche, come la phase contrast o la differential interference contrast (DIC), non necessitano di alcun tipo di marker ma si portano dietro le problematiche tipiche della microscopia, ossia il disallineamento delle immagini dovute alla difficoltà di posizionare il sistema di acquisizione sempre nella stessa posizione con precisione micrometrica. Malgrado questo, osservare le

interazioni tra le cellule e con l'ambiente che le circonda è la chiave per capire la meccanobiologia della migrazione cellulare e le sue implicazioni sia nei tessuti sani che in quelli patologici.

Proprio per l'importanza di questo task, dal 2012 è stata bandita la Cell Tracking Challenge, un'iniziativa internazionale nella quale vengono confrontate le tecniche di tracciamento cellulare che rappresentano lo stato dell'arte di questa area di studio. Tra queste spiccano anche in questo caso i sistemi di tracking basati sul deep learning o machine learning, ma a differenza della segmentazione anche algoritmi che non utilizzano reti neurali ottengono risultati confrontabili. È giusto dire che tra gli algoritmi che hanno partecipato alla challenge, malgrado le elevate performance raggiunte, nessuno di questi ha ottenuto una soluzione completamente corretta.

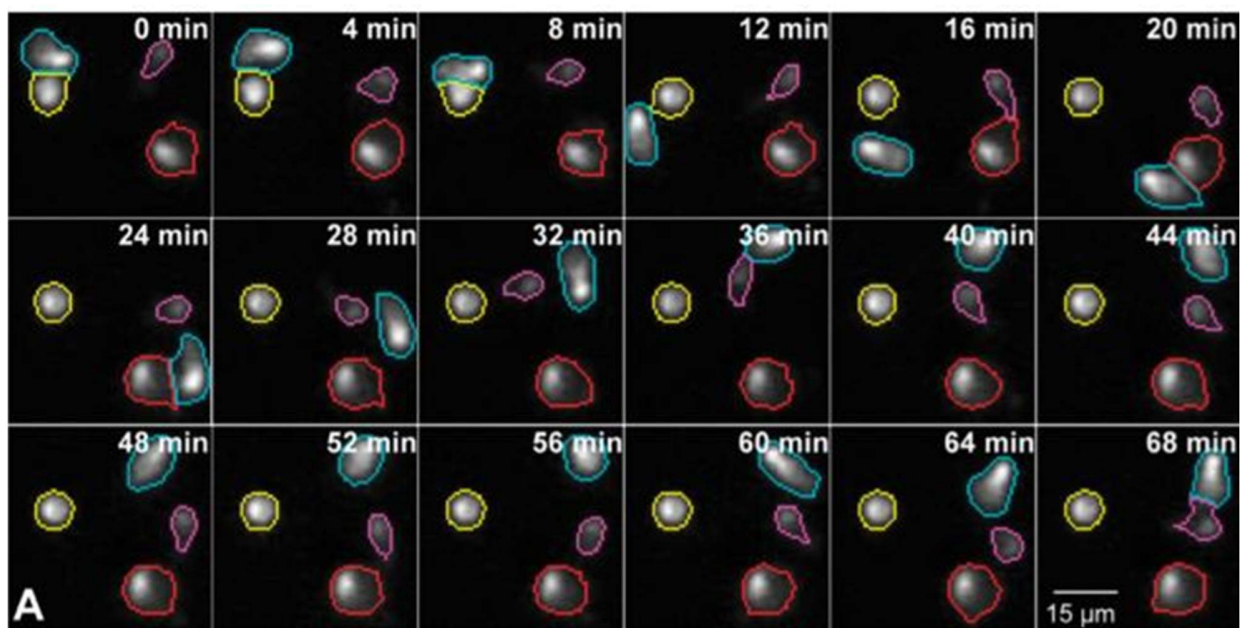


Figura 6 Esempio di tracciamento cellulare in immagini di microscopia acquisite ogni 4 minuti, ogni cellula viene identificata da un colore specifico. Merouane A, Rey-Villamizar N, Lu Y, Liadi I, Romain G, Lu J, Singh H, Cooper LJ, Varadarajan N, Roysam B. Automated profiling of individual cell-cell interactions from high-throughput time-lapse imaging microscopy in nanowell grids (TIMING). *Bioinformatics*. 2015 Oct 1;31(19):3189-97. doi: 10.1093/bioinformatics/btv355. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26059718; PMCID: PMC4693004.

3. Materiali e metodi

Come già accennato in precedenza, il presente lavoro di tesi fa parte del progetto REAP, un progetto multidisciplinare finanziato dall'unione europea che si pone l'obiettivo di sviluppare un metodo efficace per individuare in maniera specifica le cellule Drug-Tolerant Persister nel cancro al seno in un contesto preclinico.

Il cancro al seno è la seconda causa di morte correlata al cancro nelle donne. Mentre la malattia non metastatica in stadio iniziale è curabile in circa il 70-80% dei pazienti, nei casi di tumore avanzato e metastatico è considerato incurabile con le terapie attualmente disponibili. I trattamenti risultano efficaci per il 90% dei tumori primari al seno e per il 50% delle metastasi, se però l'intera popolazione di cellule cancerogene non viene eliminata è possibile che si verifichino delle recidive. Come visto nel capitolo dedicato, le DTP sono tra le cause principali di un nuovo insorgere della malattia, la quale rimane sensibile al trattamento iniziale fino a quando le cellule non sviluppano una resistenza permanente ai farmaci.

Con tale premessa risulta chiaro il perché questa tipologia di cellule susciti così grande interesse nel mondo scientifico.

L'obiettivo di questa tesi è quello di sviluppare un algoritmo automatico in grado di tracciare le cellule persister in immagini di microscopia a contrasto di fase in un periodo di osservazione di circa 20 giorni. Le cellule osservate sono della linea cellulare di carcinoma mammario MCF7, colorate utilizzando due proteine fluorescenti, una per evidenziare i nuclei, chiamata mCherry di colore rosso, l'altra per evidenziare i citoplasmi chiamata GFP di colore verde.

Le immagini sono state acquisite dalla Medical University of Vienna tramite Incucyte®, un dispositivo della Sartorius per l'analisi real-time di cellule vive, ogni 10 minuti circa.

Questo macchinario è sostanzialmente un incubatore con la capacità di acquisire immagini microscopiche, ogni coltura cellulare viene sistemata in un contenitore chiamato well e tenuta sotto osservazione, più colture vengono osservate in parallelo. Ogni well ha un'area di circa 943 mm^2 ed è stato suddiviso in 25 zone, per ognuna di esse viene acquisita un'immagine. Il nome dei file ottenuti contiene il nome dell'esperimento, seguito dal codice del well, dal numero della zona e dall'intervallo di acquisizione espresso in giorni, ore e minuti. L'immagine seguente chiarisce questa suddivisione. Nel presente lavoro sono state utilizzate solo le immagini del canale rosso (mCherry) che identificano i nuclei.

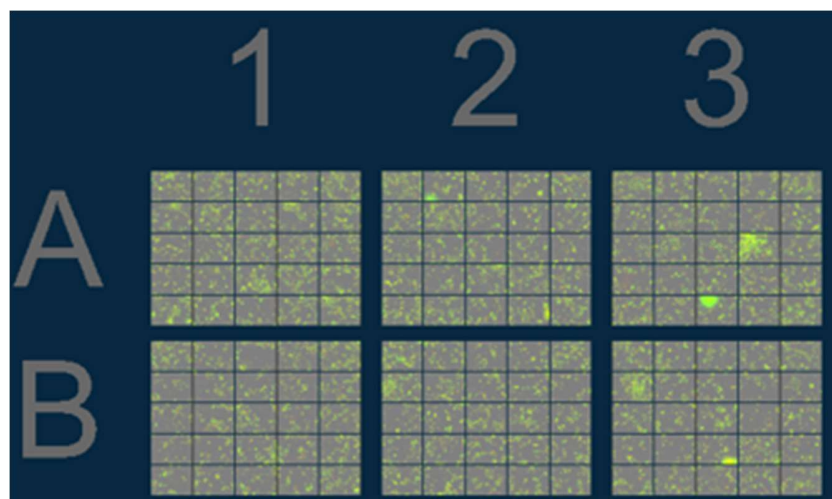


Figura 7 Nell'immagine è indicato in che modo sono stati chiamati e suddivisi i well, ad esempio le immagini prese nel primo quadratino in alto a sinistra avranno nel loro nome l'indicazione A1_1

In questo modo si è ottenuto un enorme numero di immagini grezze, le quali sono state poi pre-processate per migliorarne la qualità e permettere il riconoscimento dei nuclei. Tale riconoscimento è stato effettuato tramite un algoritmo di segmentazione apposito, da qui si è partiti con il lavoro di tracking vero e proprio.

Oltre al tracciamento, l'algoritmo è in grado di estrarre alcune caratteristiche morfologiche della singola cellula, le quali vengono inserite in un file Excel per ulteriori elaborazioni.

Ognuno di questi stadi di elaborazione verrà descritto in dettaglio nei paragrafi successivi.

3.1 Pre-Processing

Il pre-processing si è reso necessario in quanto le immagini originali risultavano molto scure e le cellule poco visibili, è stato quindi aumentato il contrasto tra i nuclei e lo sfondo per aumentare la visualizzazione generale dell'immagine. Le immagini sono state salvate in formato TIFF. Il primo step è stata la normalizzazione dei dati tramite minmax scaling e la loro conversione in un codifica uint8, ovvero in pixel a 8 bit di valore intero senza segno. Successivamente è stata svolta la modifica del contrasto tramite contrast limited adaptive histogram equalization (CLAHE), una tecnica di equalizzazione dell'istogramma delle luminosità adattiva e a contrasto limitato. Adattiva perché l'immagine è divisa in sezioni e per ognuna di esse viene svolta l'equalizzazione dell'istogramma, a contrasto limitato perché la sua amplificazione viene limitata per evitare di amplificare anche il rumore. L'amplificazione è stata limitata a due e ogni sezione ha dimensioni di 20x20 pixels. L'output di questo processo ha effettivamente migliorato la visibilità dei nuclei rispetto al background migliorando anche l'uniformità interna di ogni immagine e rendendo possibile una migliore discriminazione delle singole strutture. Il processo è riuscito a mettere in risalto le caratteristiche di interesse delle cellule per supportare un'analisi più accurata.

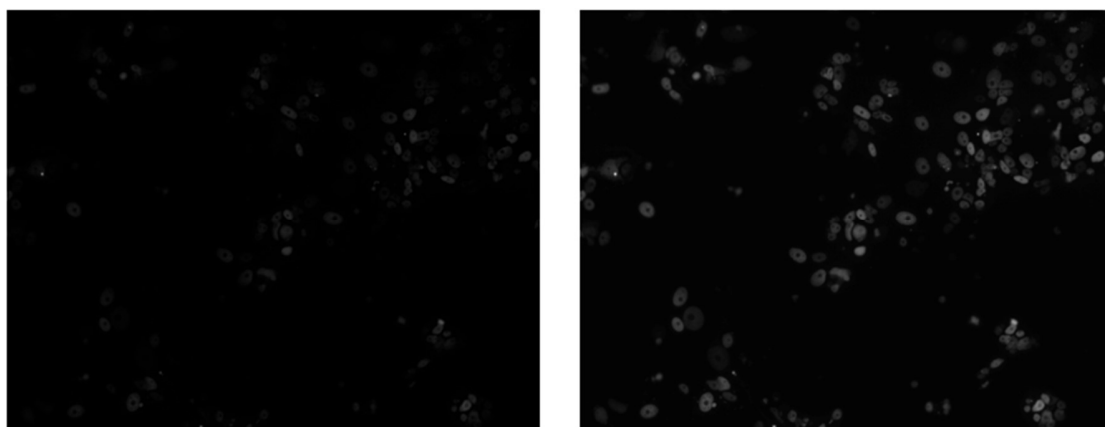


Figura 8 Si mostra un esempio di pre-processing: a sinistra l'immagine originale, a destra la stessa immagine in seguito a pre-processing

3.2 Object detection

Eseguito il pre-processing si è passati alla fase di identificazione dei nuclei all'interno delle immagini, operazione imprescindibile per dare inizio al processo di tracciamento. Per farlo, si è scelto di utilizzare un algoritmo di segmentazione a istanze basato sul deep learning, possiamo trovare infatti vari esempi in letteratura di utilizzo di questi algoritmi per l'operazione di object detection che necessariamente precede il tracciamento. La rete utilizzata è una ConvNeXt, una rete neurale convoluzionale (CNN) sviluppata appositamente per la segmentazione di immagini che si è rivelata particolarmente efficace in questo task, in grado di delineare accuratamente i confini degli oggetti per generare maschere di segmentazione molto precise. Combina il potere dei layer convoluzionali utilizzati per l'estrazione delle features ai layer di deconvoluzione per una precisa segmentazione in termini di pixel. La sua architettura è costituita da strati convoluzionali che si occupano dell'estrazione delle caratteristiche dell'immagine utili alla classificazione, da strati di pooling che riducono la dimensione spaziale e strati di upsampling o deconvoluzionali che ricostruiscono l'immagine segmentata, sfruttando le informazioni imparate dalle features precedentemente estratte e riportandola alle dimensioni originali.

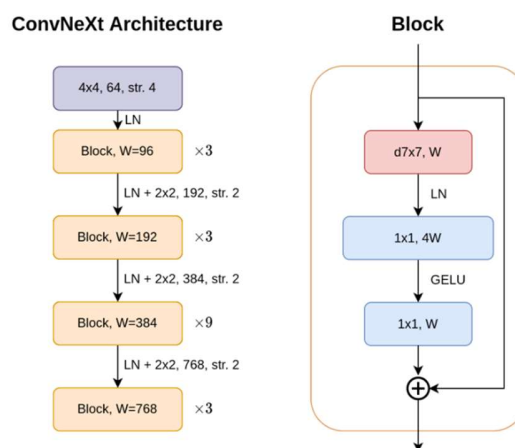


Figura 9 Architettura della ConvNetX nel dettaglio

La rete di segmentazione è stata allenata per un task a tre classi, che considera la segmentazione della parte interna del nucleo della cellula, del bordo e del background. Per l'allenamento si sono utilizzate delle patches delle immagini di 256x256 ed è stata implementata una tecnica di data augmentation real time che comprendeva anche traslazioni e rotazioni random delle immagini, questa operazione serve ad aumentare la variabilità dei dati in allenamento aumentando di conseguenza la capacità di generalizzazione della rete e rendendola più stabile.

La funzione di Focal Loss è stata utilizzata per migliorare le performance dell'algoritmo, è una modifica della più classica funzione di Cross-Entropy Loss che assegna pesi elevati ai campioni più difficili da classificare, cosa che aiuta ad alleviare il problema dello squilibrio delle classi comunemente riscontrato nei task di segmentazione. Il learning rate è stato impostato a 10^{-4} per controllare la velocità con cui la rete modifica i propri parametri durante l'addestramento, questo impedisce di rimanere bloccati in soluzioni subottimali e assicura una convergenza stabile.

Come strategia di post-processing è stato implementato un approccio a finestra scorrevole o sliding window, in modo da applicare la rete scorrendo sulle immagini e ricostruire la segmentazione di ognuna da quella delle singole patches. Inoltre è stata eseguita una sogliatura sull'area interna dei nuclei dilatando poi i bordi con un elemento strutturale delle dimensioni di due pixel. Questi passaggi hanno consentito il riconoscimento delle singole istanze senza che queste venissero fuse assieme, portando all'ottenimento di una segmentazione più precisa e raffinata. La rete è stata in grado di generare per ogni immagini due output, uno rappresentante la maschera di segmentazione dei nuclei e un'altra maschera con indicati i soli bordi di ogni elemento.

I risultati della segmentazione hanno dimostrato l'abilità di questa architettura nel delineare accuratamente il profilo dei nuclei, catturare con precisione i bordi e

identificare in maniera efficace ogni cellula presente nell'immagine, dimostrandosi per questo particolarmente adatta al compito di identificazione assegnatogli. Nell'immagine seguente possiamo vedere un esempio della segmentazione effettuata.

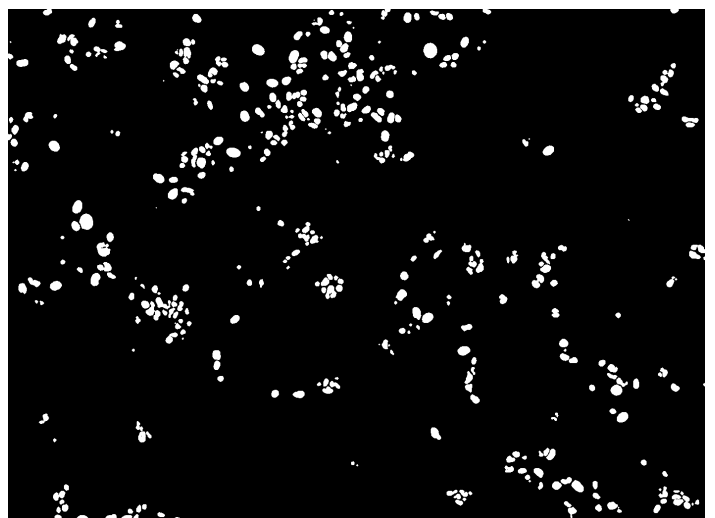
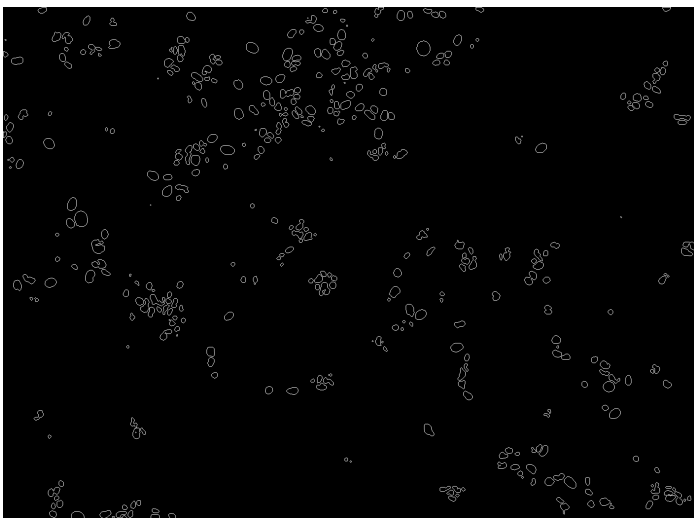
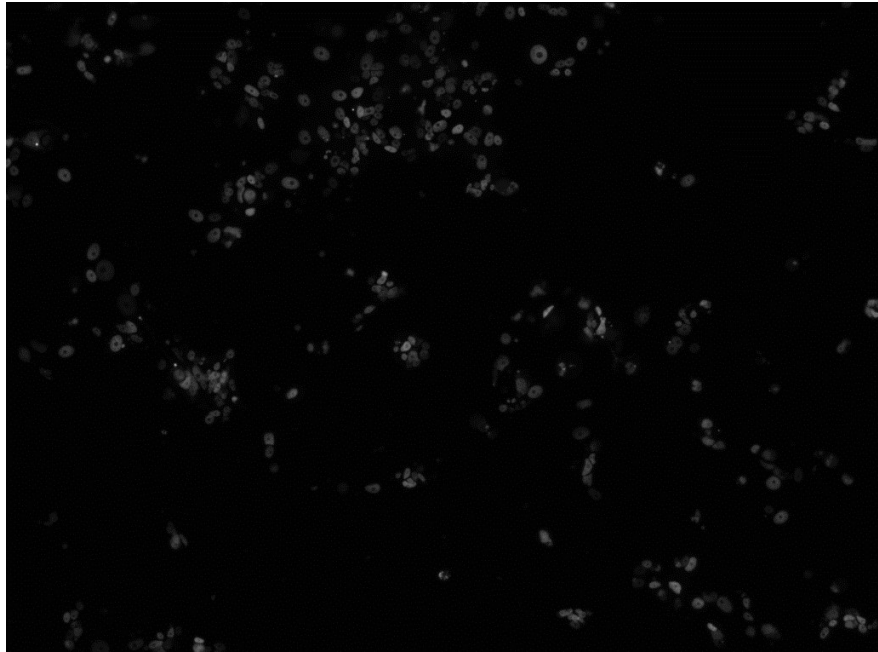


Figura 10 Risultati della segmentazione in alto l'immagine originale, in basso a destra la maschera dei nuclei e in basso a sinistra quella dei bordi

3.3 Fase pre-tracking

Ottenute le maschere di segmentazione e individuato ogni nucleo presente in ogni immagine si è passati alla fase precedente al tracciamento vero e proprio. Osservando gli output della segmentazione si è notato che alcune maschere erano completamente nere o che solo pochissime cellule erano state individuate, per questo motivo è stata implementata una funzione per eliminare automaticamente dal set le immagini con un numero di elementi individuati inferiore a dieci.

Si è inoltre notato che le immagini risultavano disallineate l'una rispetto all'altra, come se il sistema di acquisizione fosse stato riposizionato erroneamente dopo il primo scatto. Effettivamente possiamo affermare che questa è una problematica comune a molte serie di immagini acquisite in microscopia, a causa delle dimensioni micrometriche della scena anche un decentramento apparentemente trascurabile può portare ad un importante disallineamento tra le immagini risultanti. Per questo motivo si è resa necessaria l'applicazione di una registrazione rigida delle immagini, ovvero quel processo che permette di trasformare insiemi di dati che si trovano in sistemi di coordinate diverse in sistemi in cui c'è corrispondenza di coordinate spaziali. Viene fatto individuando lo spostamento relativo dei sistemi di riferimento di due immagini consecutive nel tempo per poi correggerlo tramite trasformazioni affini. Gli algoritmi che svolgono questa funzione possono essere classificati in base al principio su cui si basa il loro funzionamento o sul dominio nel quale operano. Possono riconoscere le caratteristiche dell'immagine quali linee, punti e contorni o individuare regolarità nell'intensità dei pixel e farlo in un dominio spaziale o nel dominio delle frequenze.

Nel nostro caso, dato l'utilizzo di maschere dove l'intensità è massima negli oggetti riconosciuti e zero altrove e date le caratteristiche dei nuclei i quali si muovono, cambiano forma e dimensioni, non è stato possibile sfruttare le corrispondenze tra le

immagini o l'intensità, inoltre per la mancanza di riferimenti spaziali è stato necessario operare nel dominio delle frequenze. Il rischio nell'operare nel dominio dello spazio è che non essendoci riferimenti fissi nell'immagine, venissero recepiti come disallineamenti i movimenti relativi dei nuclei. Dato il gran numero di immagini si è scelto un metodo di registrazione automatico, che calcolasse il disallineamento e operasse la correzione di conseguenza. Il metodo che si è rivelato più efficiente è stata la cross-correlazione di fase, un tipo di registrazione rigida nel dominio delle frequenze che risulta adatta a stimare la traslazione relativa tra due immagini simili. Tramite una Fast Fourier Transform (FFT) viene calcolata la rappresentazione nel dominio delle frequenze dei dati e ne viene stimato il picco di cross-correlazione, la posizione del picco indica lo shift tra le due immagini che viene corretta tramite trasformazione affine. È stata usata la funzione `phase_cross_correlation` della libreria Python `skimage.registration`. Questa funzione permette di selezionare l'immagine di riferimento e l'immagine bersaglio e calcolarne lo shift, tra i vari parametri utilizzabili è possibile selezionare un fattore di upsampling, fornire una maschera sia per il riferimento che per il bersaglio, indicare un valore di overlap e il tipo di normalizzazione. La fase di riallineamento delle immagini è stata senza alcun dubbio la più problematica, quella che ha comportato i maggiori errori di tracciamento nel risultato finale. Infatti non si è riusciti ad ottenere per tutta la serie di immagini elaborate un riallineamento perfetto. Buona parte del tempo impiegato per questo lavoro è stato utilizzato provando diverse combinazioni di parametri che portassero i migliori risultati nella registrazione delle immagini, malgrado questo non si è riuscito a trovarne una ottimale per l'intero set. Oltre ai parametri della funzione si è provato a mantenere fisso o variare il riferimento: inizialmente si è utilizzato come riferimento globale la prima immagine del set, questo non si è dimostrato efficace in quanto, seppur garantisse un ottimo allineamento sulle prime 150/200 immagini portava a

grandi errori di allineamento nelle successive, probabilmente perché la differenza tra la prima e la duecentesima immagine era troppo grande perché il riferimento garantisce un riallineamento perfetto. Si è tentato allora di usare un riferimento variabile, utilizzando come tale l'immagine precedente al bersaglio, in questo caso pur non portando ad alcun errore importante, l'allineamento non risultava efficace e dopo l'operazione il disallineamento seppur attenuato era ancora percepibile. La soluzione migliore è stata ottenuta utilizzando sempre un riferimento mobile, ma facendo in modo che esso variasse ogni 40 immagini, in questo modo si è riuscito a ottenere un allineamento stabile e si sono evitati gli errori dovuti alle differenze tra riferimento e bersaglio. Anche in questo caso però si notano talvolta disallineamenti che potrebbero indurre in errore il sistema di tracciamento.

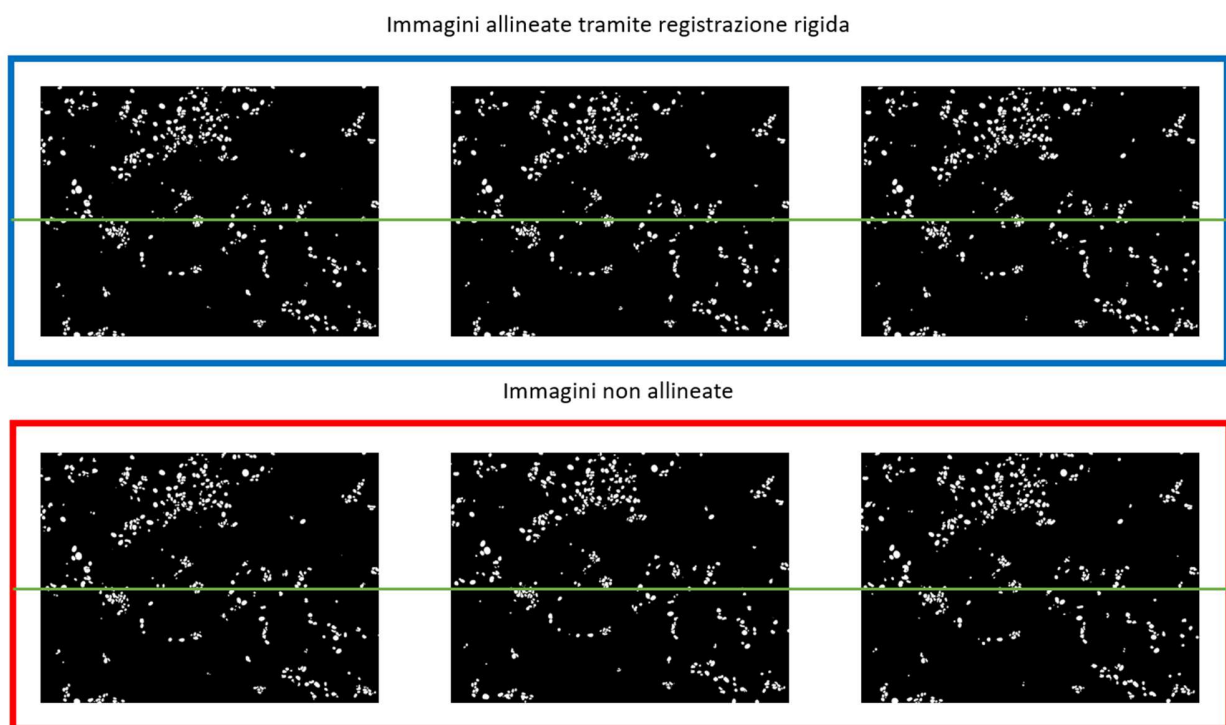


Figura 11 Nella figura è mostrato perché si è resa necessaria la registrazione rigida delle immagini, la linea verde serve a fornire un riferimento e a mettere in evidenza il disallineamento

È stato infine implementato un watershed con lo scopo di separare gli elementi riconosciuti erroneamente dalla segmentazione come facenti parte della stessa istanza. Il watershed è una tipologia di algoritmi che servono all'object detection di un'immagine, individuano le discontinuità e definiscono il profilo degli oggetti. Si è utilizzata nuovamente la libreria Python skimage con la funzione watershed, prima però è stata calcolata la distance transform e gli è stato applicato un filtro gaussiano. Questo processo si è dimostrato efficace, riuscendo a dividere nettamente i nuclei fusi dalla segmentazione.

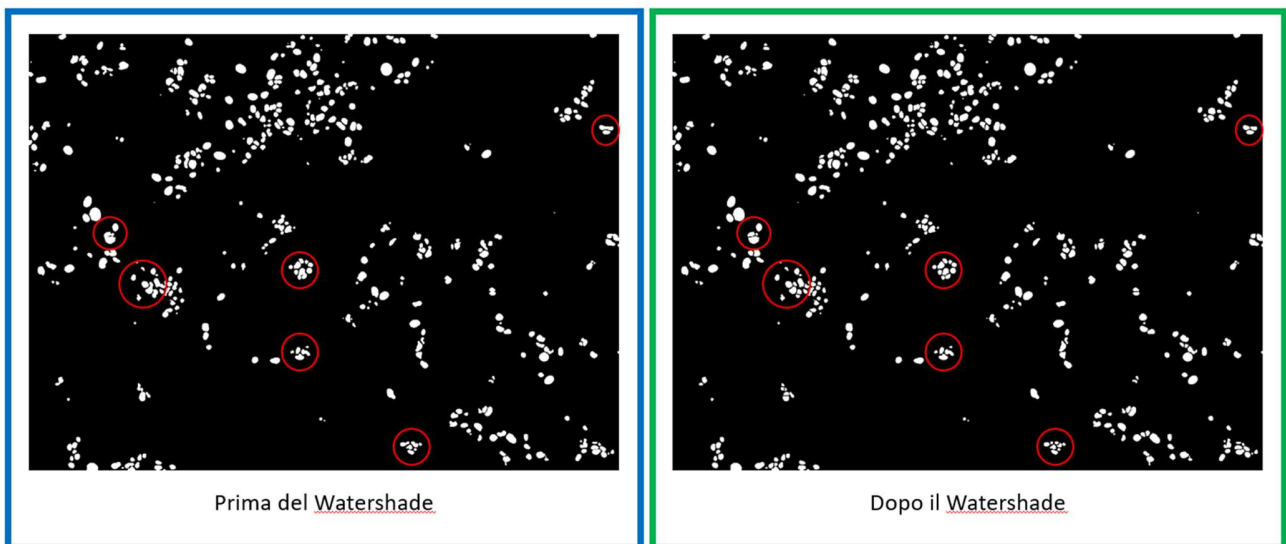


Figura 12 Risultato del processo di watershed, i cerchi rossi mettono in evidenza alcune delle zone in cui è percepibile l'efficacia dell'operazione

3.4 Cell Tracking

Terminate le fasi preparatorie si è passati all'operazione di tracciamento vera e propria. Nelle prime fasi dello sviluppo dell'algoritmo l'idea principale, data la grandissima quantità di immagini, era quella di basare il suo funzionamento su un architettura di deep learning in modo che, una volta allenato propriamente, l'algoritmo fosse in grado di estrarre da solo le proprie features e potesse essere utilizzato anche per applicazioni real time. Purtroppo la necessità di dover costruire da zero un ground truth con cui supervisionare il training della rete e il fatto che un transfer learning non fosse possibile a causa della natura data based delle architetture di intelligenza artificiale e dell'unicità dei data, è stato necessario accantonare questa idea e realizzare un algoritmo più tradizionale.

Il linguaggio utilizzato per la scrittura del suo codice, come precedentemente anticipato è Python. È stato scelto per la presenza di libreria specifiche per l'immagine processing, la grande quantità di materiale presente in rete e per la sua natura multiplatform e opensource.

L'algoritmo lavora con due immagini per volta, capovolgendo l'ordine del set in modo da far partire il tracciamento dall'ultimo frame cioè dalle cellule che sopravviveranno alla fine dell'osservazione. Si basa su un ipotesi fondamentale: guardando le immagini acquisite ci si rende conto che per la maggior parte dei nuclei, tra un'immagine e la successiva, non si verificano spostamenti di grandi entità né cambiamenti morfologici considerevoli. Partendo da questa considerazione si è cercato di estrarre tutte le caratteristiche morfologiche e posizionali possibili per ogni nucleo e di stabilire una misura di dissimilarità basata su queste features. Nella pratica, due cellule in frame successivi vengono riconosciute come la stessa quando la loro dissimilarità è minima. In tal caso alla cellula riconosciuta viene assegnata la stessa label che aveva nel frame

precedente. Il processo di assegnazione è automatico e svolto tramite l’Hungarian Algorithm. Il risultato del tracciamento è una serie di annotazioni, una per ogni immagine, nelle quali è indicata la posizione di ogni nucleo e la label associata. Viene generato inoltre un file Excel nel quale sono inserite le caratteristiche di interesse di ogni nucleo, in modo da poter effettuare una successiva elaborazione dei dati estratti.

3.4.1 Features extraction

L’estrazione delle features di ogni nucleo è stata effettuata tramite la funzione regionprops della libreria skimage.measure, questa funzione estrae un totale di 30 caratteristiche metriche delle regioni dell’immagine a cui è assegnata una label. Di queste 30 sono state selezionate le 18 features che risultavano più significative per l’identificazione. Quasi tutte forniscono informazioni morfologiche sulla cellula, sono riportate nella tabella sottostante.

1. Area	7. Diametro equivalente	13. Lunghezza asse min
2. Bounding Box (bbox)	8. Extent	14. Orientazione
3. Area bbox	9. Massimo diametro di Feret	15. Perimetro
4. Coordinate dei centroidi	10. Autovalori tensore di inerzia	16. Perimetro di Crofton
5. Area_convex	11. Centroidi locali	17. Solidity
6. Eccentricità	12. Lunghezza asse maggiore	18. Label

Con queste features, per ogni nucleo individuato è stato costruito un vettore in modo da avere una rappresentazione numerica caratteristica di ognuno di essi, nel quale non compaiono però le coordinate della Bounding Box (feature 2 in tabella) e la label (feature 18). Quest’ultima viene associata alla posizione del centroide corrispondente e inserita in un dizionario, il file risultante è l’annotazione e sarà il punto di partenza delle fasi successive.

3.4.2 Score

Ottenuti i vettori di features sono stati utilizzati per il calcolo di una misura di dissimilarità. Tale misura o score è ottenuta dal contributo di due fattori, uno che rappresenta la morfologia della cellula e uno la sua posizione, secondo le ipotesi di base, per la stessa cellula in frame diversi, entrambi i fattori devono essere molto piccoli, perciò ci sarà il riconoscimento per il minimo score.

Il primo fattore viene calcolato dal vettore ottenuto precedentemente, per ogni vettore di features della prima immagine viene calcolata la distanza euclidea con tutti i vettori appartenenti ai nuclei del frame seguente, il valore ottenuto indica numericamente le differenze morfologiche tra le due cellule a confronto. Questo viene normalizzato per il suo massimo in modo da poter essere utilizzato in combinazione col secondo.

Il secondo fattore rappresenta la posizione della cellula e si ottiene come uno meno l'Intersection Over Union (IOU) delle Bounding Box dei nuclei nei due frame, si avrà perciò un valore vicino a uno per cellule molto lontane e un valore vicino allo zero quando la stessa cellula si è mossa di poco.

Questi due fattori sono poi sommati tra loro in modo che il loro peso sia equipollente. Per maggiore chiarezza la formula con cui è stato ottenuto lo score è riportata sotto.

$$SCORE = \frac{Euclidean_dist}{MAX(Euclidean_dist)} + (1 - IOU)$$

3.4.3 Meccanismo di assegnazione

Con gli score calcolati per ogni coppia di nuclei tra i due frame in esame, viene costruita una matrice di costo, questa avrà un numero di righe pari al numero delle cellule presenti nella prima immagine e un numero di colonne pari al numero di cellule nel secondo frame. In questo modo gli indici dei valori della matrice rappresentano le label iniziali e indicano tra quali cellule è stato calcolato lo score.

L'assegnazione è fatta tramite l'Hungarian Algorithm, un algoritmo di ottimizzazione combinatoria che permette di trovare l'accoppiamento perfetto tra due oggetti in un set finito di oggetti cercando di minimizzare il costo totale associato all'operazione. Nel nostro caso il costo associato ad ogni assegnazione è lo score calcolato in precedenza. Talvolta è possibile che l'algoritmo di assegnazione per minimizzare il costo totale, assegni le label in modo errato, per aumentare il controllo su tali errori viene stabilito un costo massimo oltre il quale l'operazione di assegnazione non è ritenuta valida. Quando questo accade, l'assegnazione viene ripetuta con le stesse modalità ma coinvolgendo solo gli elementi il cui costo di assegnazione superava il costo massimo accettabile che è stato impostato a 1.05.

Il numero di cellule tra frame successivi raramente corrisponde, a causa principalmente della loro morte o duplicazione, ma anche di un mancato riconoscimento da parte dell'algoritmo, in questi casi vengono generate label nuove a partire da quelle già utilizzate e segnate in un'apposita lista. Alla fine del processo vengono aggiornate le label nelle annotazioni e viene tenuta traccia dei cambiamenti di label avvenuti in modo da poterli utilizzare per l'iterazione successiva.

3.4.4 Gestione degli output

Da questo processo vengono generati due output: le annotazioni e il file Excel. Le annotazioni finali vengono utilizzate per ottenere una rappresentazione del meccanismo di tracking avvenuto, ad ogni label viene associato un colore in codifica RGB univoco generato automaticamente e con esso viene colorata l'area del nucleo corrispondente, con le immagini così ottenute viene generato un video. I colori assegnati a ogni nucleo vengono anch'essi annotati e salvati.

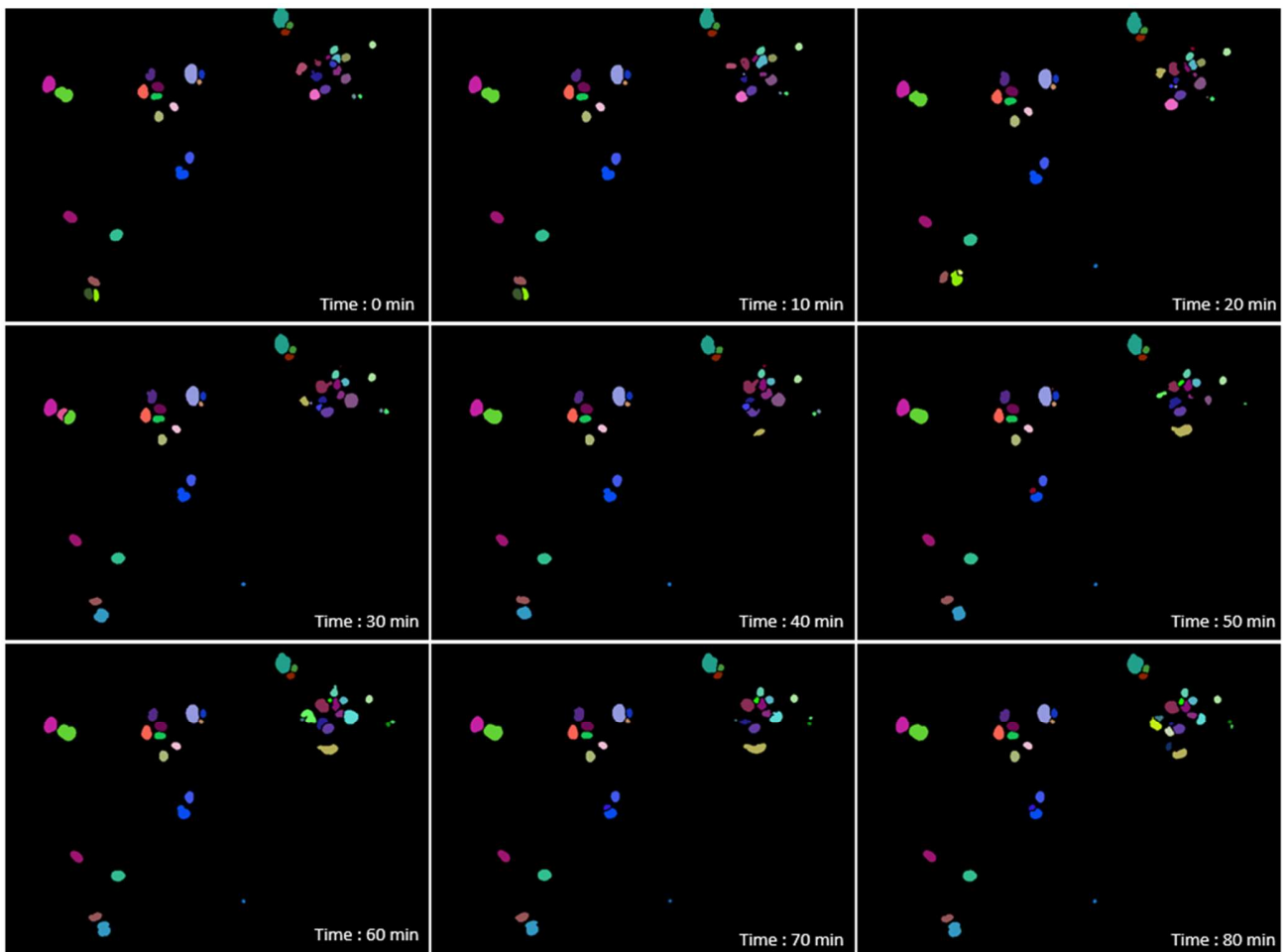


Figura 13 In figura si mostra un esempio di output dell'algoritmo di tracciamento su un periodo di 80 minuti circa, è un ingrandimento raffigurante il quarto in alto a sinistra delle immagini

Il file Excel contiene tre fogli di lavoro, nel primo è presente una tabella nel quale sono riportati, per ogni cellula riconosciuta, la label, il colore assegnato in codifica RGB, l'area media in pixel, l'eccentricità media, la velocità media in pixel al minuto, il periodo di tracciamento in minuti e lo spostamento totale della cellula espresso in pixel. Mentre label, area e eccentricità sono estratte come features da regionprops, il periodo di tracciamento è ottenuto dal numero di fotogrammi nei quali il nucleo è presente, considerando circa dieci minuti a fotogramma, lo spostamento totale è la somma degli spostamenti del centroide tra frame consecutivi e la velocità è ottenuta dal rapporto tra lo spostamento totale e il periodo di tracciamento, tutti i valori sono mediati per il periodo di tracciamento.

Label	Color	Average Area	Average Eccentricity	Average Speed [pixel/min]	Life Period [min]	Cell Movement
675	(253, 26, 7)	68,273	0,767	10,436	110	1147,998
701	(213, 42, 244)	63,833	0,839	20,171	60	1210,247
660	(184, 119, 224)	113,8	0,705	7,366	150	1104,944
661	(169, 80, 234)	122,429	0,48	0,314	140	44,024
272	(165, 59, 116)	138,129	0,677	0,255	1010	257,382
398	(46, 220, 45)	143,562	0,779	0,351	730	256
273	(247, 234, 102)	225,436	0,708	0,314	1010	317,452
10	(224, 154, 149)	561,173	0,727	0,171	1500	256,831
634	(61, 85, 33)	296,3	0,752	0,371	200	74,236
212	(203, 29, 19)	289,696	0,632	0,197	1150	226,805
530	(134, 233, 7)	385,222	0,704	0,3	450	135,2
654	(71, 54, 72)	133,25	0,7	0,256	160	40,936
18	(103, 140, 199)	110,907	0,54	0,174	1500	261,201
651	(180, 144, 185)	122,059	0,457	0,255	170	43,271
211	(135, 14, 244)	57,957	0,501	0,193	1150	222,07
667	(212, 34, 159)	154,308	0,637	0,407	130	52,876
707	(167, 46, 61)	27,25	0,77	0,394	40	15,745
26	(84, 99, 251)	408,2	0,578	0,187	1500	280,256
445	(99, 227, 138)	132,645	0,545	0,244	620	151,037
30	(86, 199, 23)	250,707	0,701	0,163	1500	244,333

Figura 14 In figura una parte della tabella contenente i dati relativi a ogni cellula tracciata presente nel primo sheet del file Excel

Nel secondo e terzo foglio sono invece riportati rispettivamente gli andamenti di area e eccentricità durante tutto il periodo di osservazione di alcune cellule selezionabili, in questo modo è possibile scegliere alcune cellule di interesse e focalizzare solo su di esse l'attenzione, analizzandone nel dettaglio le caratteristiche principali.

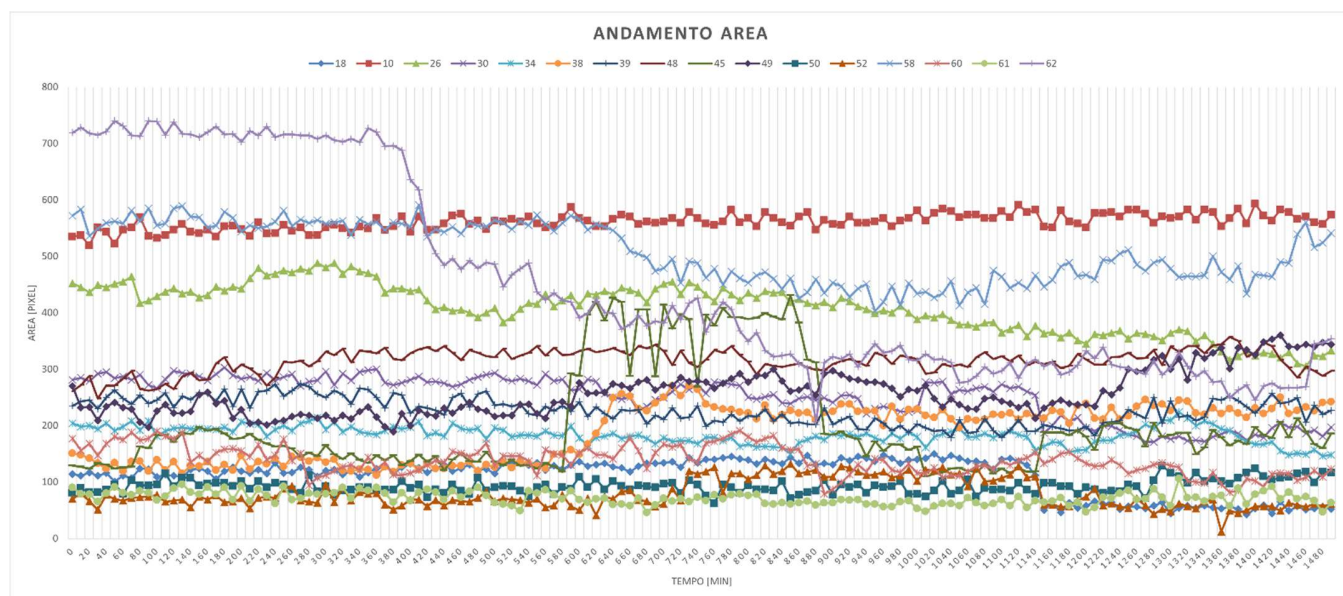


Figura 15 Esempio di grafico ottenibile dall'andamento dell'area nel secondo sheet del file Excel, per realizzarlo sono state selezionate le cellule sopravvissute a tutto il periodo di osservazione di questa prova, ovvero più di un giorno.

4. Risultati e Discussione

La valutazione dell'algoritmo sviluppato è stata fatta utilizzando un campione significativo di circa 150 immagini, corrispondenti a pressappoco un giorno di osservazione, eseguendo un tracciamento manuale e prendendo nota degli errori commessi dall'algoritmo nell'assegnazione delle label di ogni cellula tra ogni coppia di frame consecutivi. Per ogni coppia di immagini si è tenuto conto, oltre che degli errori commessi, anche del numero di nuclei presenti nel frame corrente e nel successivo, delle nuove cellule nate o entrate nel campo di acquisizione e delle cellule morte o uscite dal campo nell'intervallo di tempo che separa un'acquisizione dalla successiva.

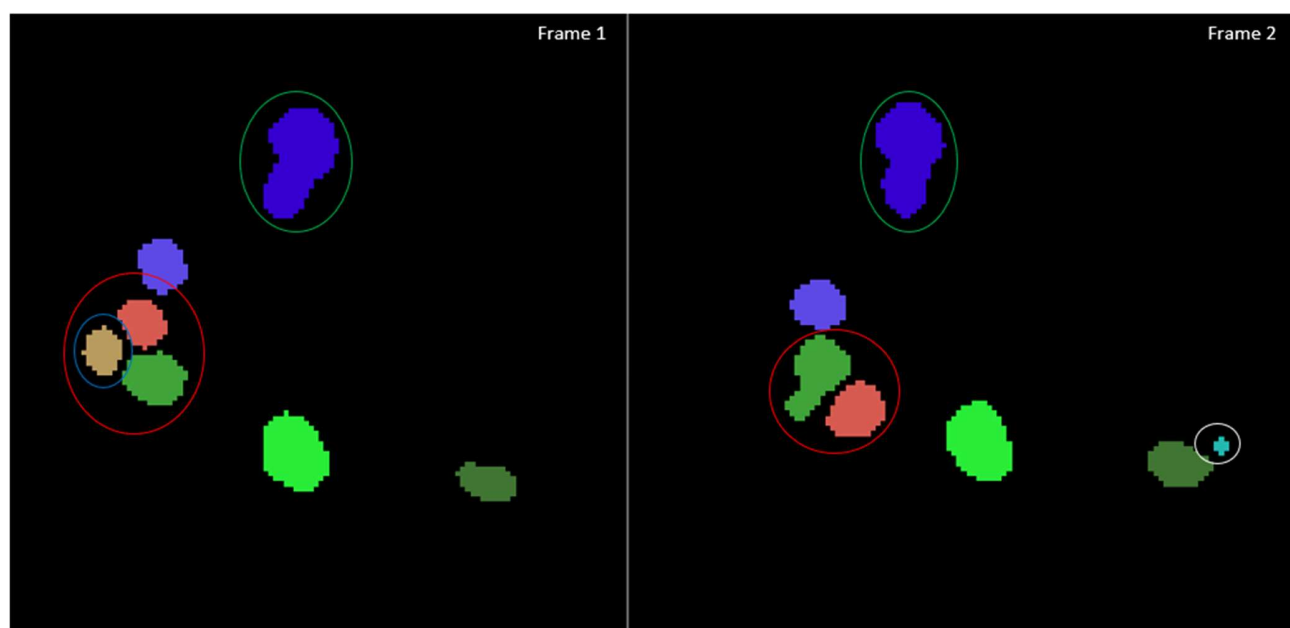


Figura 16 Esempio di come è avvenuta la valutazione dell'algoritmo, in questa immagine troviamo quattro cellule riconosciute correttamente (una delle quali all'interno del cerchio verde), una nuova cellula (cerchio bianco), due errori di tracciamento (cerchio rosso) e una cellula morta (cerchio blu)

In Figura 16 troviamo un esempio di come è stata eseguita la valutazione: all'interno del cerchio verde abbiamo un esempio di nucleo tracciato in maniera corretta, nel cerchio rosso invece abbiamo ciò che è stato considerato un doppio errore di tracciamento in quanto la cellula color salmone è stata probabilmente confusa con la

cellula verde portando quindi a uno scambio di label erroneo, nel cerchio bianco possiamo vedere una nuova cellula, non presente nel frame precedente, infine nel cerchio blu abbiamo quello che è stato considerato un nucleo morto perché presente nel frame 1 ma non presente nel successivo.

Con una media di 79.5 cellule, 3.12 nuove cellule e 3.24 cellule morte per ogni immagine del set l'algoritmo è stato in grado di eseguire 77.8 riconoscimenti corretti con un numero medio di 1.65 errori per frame raggiungendo il 97.96% di accuratezza nel tracking di frame consecutivi.

Seppur questo numero possa sembrare esorbitante è necessario fare alcune precisazioni: la percentuale di accuratezza è stata calcolata solo tra un frame e il successivo non per il processo nella sua interezza, bisogna quindi tenere conto della propagazione degli errori. Per come è stato strutturato l'algoritmo è un meccanismo a catena, partendo dal primo frame riconosce le cellule nel secondo, riassegna le label e aggiorna le annotazioni per poi continuare con il terzo, i cambiamenti di label vengono annotati e utilizzati come punto di partenza per l'iterazione successiva, in questo modo ogni errore commesso verrà "trascinato" da un frame all'altro compromettendo necessariamente il risultato finale del tracciamento. Bisogna inoltre far presente che la valutazione è stata effettuata da un utente non esperto, che a causa della propria inesperienza nell'analisi di immagini istologiche di microscopia potrebbe aver categorizzato come errore un tracciamento corretto o viceversa un tracciamento errato come corretto, è quindi necessario considerare una certa percentuale di incertezza nei numeri forniti.

Malgrado i risultati numerici siano fondamentali per una valutazione oggettiva del sistema di tracking è ugualmente importante capire quali siano le cause dietro a questi numeri.

Gli errori commessi dall'algoritmo sono in larga parte dovuti alla presenza di cellule vicine di dimensioni pressoché identiche, cosa che risulta critica a causa delle continue mutazioni morfologiche e dei continui cambi di posizione. Questo fa oscillare lo score, il quale risulterà più o meno simile per tutte queste cellule, aumentando la probabilità che possano essere confuse tra loro. Inoltre il fatto che queste muoiono e si duplicano continuamente aggrava ulteriormente la situazione. Un'altra causa di errori è sicuramente il disallineamento residuo di alcune immagini, infatti malgrado il lavoro svolto non si è riusciti a riallinearle in maniera perfetta ed è possibile notare in alcune di esse un decentramento che altera la posizione relativa dei centroidi dei nuclei inducendo in questo modo l'algoritmo in errore. In queste immagini l'algoritmo registra le sue prestazioni peggiori, con una percentuale di accuratezza al di sotto del 80% compromettendo l'intera catena di tracciamento. Un allineamento perfetto porterebbe sicuramente ad un miglioramento delle prestazioni complessive e frame-by-frame.

La presenza di immagini completamente nere o contenenti un numero irrealistico di cellule, dovute o ad una cattiva segmentazione o ad acquisizioni errate, ha reso necessaria la loro eliminazione, questo ha però alterato l'intervallo temporale presente tra un frame e il successivo portando di conseguenza a considerare consecutive immagini che in realtà non lo sono.

Infine è opportuno dire che l'algoritmo ha un costo computazionale elevato che compromette la velocità di elaborazione dei dati e non permette il suo utilizzo in real-time.

5. Conclusioni

In conclusione possiamo affermare che l'algoritmo sviluppato è effettivamente in grado di effettuare un buon tracciamento frame-by-frame delle cellule in immagini di microscopia. Esso rappresenta un ottimo punto di partenza per la realizzazione di un sistema in grado di individuare in maniera specifica le cellule Drug-Tolerant Persister, la possibilità di estrarre informazioni morfologiche e caratteristiche cinematiche di tutti i nuclei e di poter focalizzare l'attenzione su specifiche cellule per valutarne l'andamento nel corso dell'osservazione è un grande punto di forza dell'algoritmo. Oltre all'osservazione del comportamento delle singole cellule cancerogene eseguita tramite il tracciamento, il monitoraggio di questi dati da parte di utenti esperti potrebbe portare a individuare una potenziale differenziazione tra le cellule osservate e quindi ad una individuazione specifica delle DTP, che è il vero scopo sia di questo lavoro di tesi che del progetto REAP. Ovviamente prima di poter arrivare a questo risultato sono necessari diversi miglioramenti, primo tra tutti è sicuramente l'implementazione di una registrazione rigida delle immagini più efficace, che garantisca un riallineamento perfetto dell'intero set e di conseguenza una migliore performance di tracciamento. Un altro miglioramento possibile potrebbe riguardare lo score, aggiungendo informazioni più specifiche della sola morfologia e posizione si potrebbe migliorare la capacità di discernimento dell'algoritmo e ridurre le situazioni critiche date da cellule molto simili vicine tra loro. Inoltre lo sviluppo di un sistema basato sull'intelligenza artificiale potrebbe permettere di passare da un tracciamento frame-by-frame ad uno che consideri l'intero set di immagini.

Così com'è l'algoritmo potrebbe essere utilizzato per la realizzazione di un ground truth per l'allenamento di un algoritmo basato sul deep learning, per farlo servirebbe apportare delle correzioni manuali alle annotazioni finali, cosa che sicuramente

richiederebbe un tempo minore rispetto a produrle manualmente da zero, si potrebbe così ottenere un sistema stabile in grado di un tracciamento più preciso e anche più veloce. Il gran numero di immagini fornite dalla Medical University di Vienna si presta alla perfezione per la costruzione di un training set ampio e caratterizzato da una buona variabilità dei dati che potrebbe portare alla realizzazione di un algoritmo con ottime capacità di generalizzazione e competitivo con i sistemi attualmente inseriti nella classifica della Cell Tracking Challenge.

Possiamo infine concludere dicendo che lo scopo del lavoro di tesi è stato raggiunto, l'algoritmo si è rivelato capace di un tracciamento tra un frame e il successivo, apportando il proprio contributo alla causa del progetto REAP. Ulteriori sviluppi sono sicuramente necessari ma questo lavoro è un primo passo nell'individuazione specifica delle Drug-Tolerant Persister.

Bibliografia

1. Joseph W. Bigger, M D, SC D DUBL., F R C P, F R C P I TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION Published : October 14,1944 DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
2. Mikubo M, Inoue Y, Liu G, Tsao MS. Mechanism of Drug Tolerant Persister Cancer Cells: The Landscape and Clinical Implication for Therapy. J Thorac Oncol. 2021 Nov;16(11):1798-1809. doi: 10.1016/j.jtho.2021.07.017. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34352380.
3. Kalkavan H, Chen MJ, Crawford JC, Quarato G, Fitzgerald P, Tait SWG, Goding CR, Green DR. Sublethal cytochrome c release generates drug-tolerant persister cells. Cell. 2022 Sep 1;185(18):3356-3374.e22. doi: 10.1016/j.cell.2022.07.025. PMID: 36055199; PMCID: PMC9450215.
4. François M Vallette, Christophe Olivier, Frederic Lezot, Lisa Oliver, Denis Cochonneau, et al.. Dormant, quiescent, tolerant and persister cells: Four synonyms for the same target in cancer. Biochemical Pharmacology, 2018, Epub ahead of print. 10.1016/j.bcp.2018.11.004. inserm-01947474
5. Miller D, Kerkhofs K, Abbas-Aghababazadeh F, Madahar SS, Minden MD, Hébert J, Haibe-Kains B, Bayfield MA, Benchimol S. Heterogeneity in leukemia cells that escape drug-induced senescence-like state. Cell Death Dis. 2023 Aug 5;14(8):503. doi: 10.1038/s41419-023-06015-4. PMID: 37543610; PMCID: PMC10404232.
6. De Conti G, Dias MH, Bernardes R. Fighting Drug Resistance through the Targeting of Drug-Tolerant Persister Cells. Cancers (Basel). 2021 Mar 5;13(5):1118. doi: 10.3390/cancers13051118. PMID: 33807785; PMCID: PMC7961328.

7. Gonzalez, Rafael (2018). Digital image processing. New York, NY: Pearson. ISBN 978-0-13-335672-4. OCLC 966609831.
8. Ulman V, Maška M, Magnusson KEG, Ronneberger O, Haubold C, Harder N, Matula P, Matula P, Svoboda D, Radojevic M, Smal I, Rohr K, Jaldén J, Blau HM, Dzyubachyk O, Lelieveldt B, Xiao P, Li Y, Cho SY, Dufour AC, Olivo-Marin JC, Reyes-Aldasoro CC, Solis-Lemus JA, Bensch R, Brox T, Stegmaier J, Mikut R, Wolf S, Hamprecht FA, Esteves T, Quelhas P, Demirel Ö, Malmström L, Jug F, Tomancak P, Meijering E, Muñoz-Barrutia A, Kozubek M, Ortiz-de-Solorzano C. An objective comparison of cell-tracking algorithms. *Nat Methods*. 2017 Dec;14(12):1141-1152. doi: 10.1038/nmeth.4473. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29083403; PMCID: PMC5777536.
9. Gergely Szabó, Paolo Bonaiuti, Andrea Ciliberto, András Horváth Enhancing Cell Tracking with a Time-Symmetric Deep Learning Approach, arXiv:2308.03887 doi: <https://doi.org/10.48550/arXiv.2308.03887> Fri, 4 Aug 2023