

POLITECNICO DI TORINO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**Politecnico  
di Torino**

# **Optimization of a 3D Cancer Organoids Tracking Algorithm**

**Relatori:**

Prof. Kristen Mariko Meiburger  
Ing. Francesco Branciforti

**Candidata:**

Hafida Bouhou

2023/2024



# ABSTRACT

L'obiettivo di questa tesi è sviluppare un sistema efficace e robusto per tracciare organoidi tridimensionali nel tempo, estrapolando pattern biologici significativi in modo affidabile. Monitorare la crescita e l'evoluzione morfologica degli organoidi è cruciale per comprendere i meccanismi biologici sottostanti, ma la qualità delle immagini OCT utilizzate a questo scopo pone sfide tecniche considerevoli. Le immagini di tomografia a coerenza ottica (OCT), infatti, risultano rumorose, con livelli di disturbo che rendono difficile isolare i dettagli utili dagli artefatti di segmentazione. Inoltre, queste immagini risultano non registrate, causando discrepanze di orientamento o scala tra i vari volumi e complicando l'identificazione di pattern e cambiamenti degli organoidi.

Per rispondere a queste problematiche, la tesi presenta un'ottimizzazione avanzata di un algoritmo di tracking per monitorare la crescita degli organoidi utilizzando una pipeline che integra immagini OCT elaborate tramite segmentazione basata su deep learning. A partire dall'algoritmo iniziale, sono state introdotte tecniche di preprocessing mirate a migliorare la qualità delle immagini e a gestire i problemi di variazione dimensionale e disturbo. Tra queste, lo zero padding, che regolarizza le dimensioni delle immagini, e la trasformata Watershed, utilizzata per separare efficacemente gli organoidi vicini. Queste tecniche hanno migliorato la separazione spaziale delle singole strutture, riducendo fenomeni di sovrapposizione e aggregazione degli organoidi e facilitando il tracking di ogni singolo elemento.

Inoltre, per aumentare il numero di organoidi tracciati correttamente in ogni giorno di acquisizione (timepoint), sono state implementate strategie di ottimizzazione come il merging dei risultati ottenuti da esecuzioni con diversi set di iperparametri e la rilevazione automatica delle fusioni tra organoidi. Il processo di merging, in particolare, ha permesso di eliminare la dipendenza dell'algoritmo dagli iperparametri impostati, in particolare dal giorno di riferimento scelto.

Questi interventi non solo massimizzano l'affidabilità dell'algoritmo, ma migliorano anche la capacità del sistema di gestire le variazioni nella morfologia degli organoidi, aumentando la robustezza dell'algoritmo nel tempo.

Infine, è stata sviluppata una versione più leggera dell'algoritmo, caratterizzata dall'uso di volumi ridotti che permettono un significativo risparmio di memoria e tempi di elaborazione, pur mantenendo elevati standard di accuratezza. Questa versione, meno dispendiosa in termini computazionali, consente di eseguire l'analisi anche su sistemi con risorse limitate, aprendo nuove opportunità per applicazioni su larga scala e per studi condotti su piattaforme di calcolo meno potenti.

In conclusione, il lavoro svolto ha prodotto un algoritmo di tracking notevolmente potenziato, che rappresenta un valido strumento per il monitoraggio preciso e scalabile degli organoidi, gettando solide basi per studi futuri che necessitano di un'analisi quantitativa e qualitativa dei pattern biologici con un'elevata efficienza computazionale.





# Indice

Elenco delle figure.....	V
Elenco delle tabelle.....	VIII
Capitolo 1 Introduzione .....	2
1.1 Il progetto REAP.....	2
1.2 La pipeline originale .....	3
1.3 La nuova pipeline.....	5
Capitolo 2 Materiali.....	7
Capitolo 3 Metodi.....	11
3.1 Pre-processing.....	11
3.1.1 Watershed transform .....	11
3.1.2 Zero padding .....	14
3.1.3 Erosione, Dilatazione e Hole filling.....	15
3.2 L’algoritmo di tracking .....	16
3.2.1 Definizione dei parametri.....	16
3.2.2 Strategia di tracking a doppio ramo .....	19
3.2.3 Criteri di Matching .....	20
3.2.3 Output dell’algoritmo di tracking.....	23
3.3 Merging delle tabelle .....	26
3.4 Rilevazione delle fusioni.....	28
Capitolo 4 Risultati .....	32
4.2 Numero di organoidi completamente tracciati.....	32
4.2 Visualizzazione 3D degli organoidi rilevati .....	33
4.3 Andamento della crescita degli organoidi.....	34
4.4 Cellule DTP .....	37

4.4.1 Trend normalizzati di crescita degli organoidi.....	39
Capitolo 5 Algoritmo di tracking: versione lite.....	43
5.1 I parametri modificati .....	44
5.2 Risultati.....	49
5.2.2 Andamento della crescita degli organoidi.....	50
5.2.3 Identificazione degli organoidi DTP .....	52
5.2.4 Trend normalizzati di crescita degli organoidi.....	53
Capitolo 6 Conclusioni .....	55
Appendice A .....	57
Appendice B .....	58
Appendice C .....	59
Appendice D .....	60
Appendice E .....	61
Bibliografia.....	62



# Elenco delle figure

<b>Figura 1.1:</b> Pipeline preesistente: (1) acquisizione delle immagini tramite OCT (2) pre-processing delle immagini OCT (3) segmentazione tramite rete neurale convoluzionale (4) tracking della crescita degli organoidi nel tempo .....	3
<b>Figura 1.2:</b> Nuova Pipeline complessiva .....	5
<b>Figura 1.3:</b> Schema riassuntivo della nuova pipeline del tracking degli organoidi a partire dai risultati della segmentazione .....	6
<b>Figura 2.1:</b> Esempio grafico di sferoide e organoide. A sinistra, lo sferoide, mostra una struttura più semplice rispetto all'organoide, a destra, che appare con struttura più complessa.....	7
<b>Figura 2.2:</b> Schema del funzionamento della Tomografia a Coerenza Ottica (OCT) .....	9
<b>Figura 3.1:</b> Esempio di volume prima (A) e dopo (B) l'applicazione dell'algoritmo di Watershed .....	14
<b>Figura 3.2:</b> Rappresentazione dell'approccio a doppio ramo dell'algoritmo di tracking	19
<b>Figura 3.3:</b> Workflow dei criteri di matching nell'algoritmo di tracking .....	22
<b>Figura 3.4:</b> Esempio di fusione tra due organoidi nel campione w4. (A) i due organoidi divisi al giorno 9 e (B) gli organoidi si sono fusi in uno solo al giorno 11 .....	29
<b>Figura 3.5:</b> Esempio tabella riepilogativa delle fusioni rilevate nel campione <i>p1_w6</i> ...	30
<b>Figura 3.6:</b> Esempio della correzione dei volumi degli organoidi coinvolti in fusioni evidenziati in verde. (A) Tabella prima della correzione e (B) tabella dopo la correzione. Campione <i>p1_w6</i> .....	31
<b>Figura 4.1:</b> Rappresentazione 3D dell'evoluzione degli organoidi FT del campione w5 .....	34
<b>Figura 4.2:</b> Andamento del volume dei singoli organoidi dei campioni Untreated nel tempo. Grafico prodotto utilizzando i dati ottenuti dalla pipeline di tracking ottimizzata .....	35
<b>Figura 4.3:</b> Andamento del volume dei singoli organoidi dei campioni Treated nel tempo. Grafico prodotto utilizzando i dati ottenuti dalla pipeline di tracking ottimizzata .....	36
<b>Figura 4.4:</b> Schema illustrativo dell'evoluzione delle cellule DTP .....	37

<b>Figura 4.5:</b> Diversi meccanismi di resistenza farmacologica. (A) Meccanismo genetico, (B) Meccanismo non genetico tipico delle cellule DTP, (C) Nascita di meccanismi genetici e non genetici a partire da popolazione di cellule DTP .....	38
<b>Figura 4.6:</b> Crescita degli organoidi normalizzata rispetto alla dimensione al giorno d3. Campioni Treated in (A) e campioni Untreated in (B).....	40
<b>Figura 4.7:</b> Evoluzione e crescita di tre organoidi DTP (rosa, giallo e blu) dal giorno d3 al giorno d21 nel sample <i>p1_w7</i> .....	42
<b>Figura 5.1:</b> Esempio della distorsione degli organoidi causata dalla riduzione delle dimensioni dei volumi. (A) dimensioni originali e (B) dimensioni ridotte. Vista del piano XZ del campione <i>w8</i> al giorno 13.....	44
<b>Figura 5.2:</b> Confronto tra i risultati del processo di Watershed sui volumi ridotti (B) e su quelli di dimensioni originali (A).....	45
<b>Figura 5.3:</b> Esempio di visualizzazione 3D degli organoidi FT nel volume <i>w8_d13</i> ridotto.....	50
<b>Figura 5.4:</b> Crescita degli organoidi relativi ai campioni Untreated: <i>w4</i> , <i>w5</i> , <i>w7</i> , e <i>w8</i> .50	
<b>Figura 5.5:</b> Crescita degli organoidi FT ottenuti dall'esecuzione con volumi ridotti. Campioni Treated: <i>p1_w6</i> , <i>p1_w7</i> e <i>p1_w8</i> .....	51
<b>Figura 5.6:</b> rappresentazione degli organoidi DTP identificati nel volume <i>p1_w7</i> . A sinistra il volume con dimensioni ridotte e a destra quello in dimensioni originali. ....	52
<b>Figura 5.7:</b> crescita dei volumi degli organoidi normalizzata rispetto al giorno d3. (A) campioni Treated e (B) campioni Untreated .....	53



## Elenco delle tabelle

<b>Tabella 2.1:</b> Elenco dei campioni del dataset utilizzato .....	10
<b>Tabella 2.2:</b> Elenco delle dimensioni dei volumi di $w5$ e $pl\_w6$ . Si notano variazioni in $w5\_d3$ , $w5\_d9$ e $pl\_w6\_d7$ . .....	10
<b>Tabella 3.1:</b> Elenco dei parametri modificabili nell'algoritmo di tracking .....	17
<b>Tabella 3.2:</b> Schema riassuntivo del numero di organoidi FT per ogni campione prima e dopo l'applicazione della procedura di Merging.....	28
<b>Tabella 4.1:</b> Confronto e aumento percentuale del totale di FT rilevati con la pipeline preesistente e con la nuova pipeline di tracking .....	32
<b>Tabella 4.2:</b> Numero di organoidi DTP rilevati con e senza la nuova pipeline .....	39
<b>Tabella 5.1:</b> Dimensioni dei campioni ridotti .....	43
<b>Tabella 5.2:</b> Dimensioni dei volumi appartenenti ai campioni $w5$ e $pl\_w6$ .....	46
<b>Tabella 5.3:</b> Elenco dei parametri nel codice di tracking riferito ai volumi ridotti. in grassetto i parametri riguardanti diametri e dimensioni che sono stati variati. ....	47
<b>Tabella 5.4:</b> Numero di organoidi FT rilevati con i volumi interi e con i volumi ridotti per ogni campione .....	49
<b>Tabella 5.5:</b> Numero di DTP rilevati nelle esecuzioni con i volumi interi e con i volumi dimezzati.....	52



# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Il progetto REAP

Il progetto europeo REAP ("Revealing drug tolerant persister cells in cancer using contrast enhanced optical coherence and photoacoustic tomography") si inserisce nell'ambito della ricerca oncologica avanzata, con l'obiettivo di migliorare la comprensione delle cellule tumorali tolleranti ai farmaci, note come drug tolerant persister (DTP) cells. Queste cellule rappresentano una delle maggiori sfide nel trattamento dei tumori, in quanto riescono a sopravvivere nonostante la terapia farmacologica, contribuendo alla recidiva del cancro e alla sua resistenza ai trattamenti convenzionali. L'identificazione e il monitoraggio di queste cellule sono essenziali per sviluppare nuove strategie terapeutiche che possano superare la tolleranza ai farmaci e migliorare i risultati clinici per i pazienti.

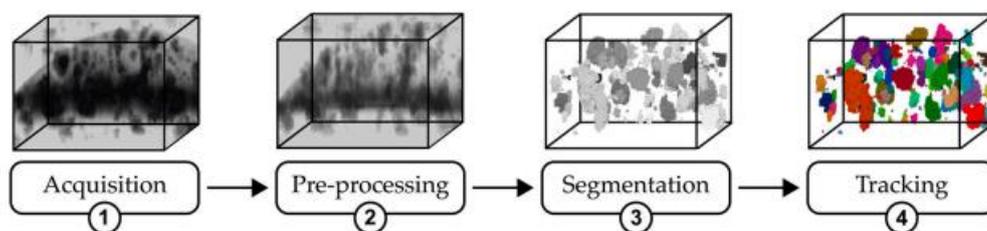
Il progetto REAP mira a sviluppare tecnologie innovative di imaging non invasivo, combinando due approcci all'avanguardia: microscopia fotoacustica a coerenza ottica a scansione laser multimodale a due fotoni (2PLS-OC-PAM, Multimodal Two-Photon Laser Scanning Optical Coherence Photoacoustic Microscopy) e la tomografia fotoacustica a coerenza ottica (OC-PAT, Optical Coherence Photoacoustic Tomography). Queste tecniche permettono di ottenere immagini ad alta risoluzione delle strutture cellulari e dei tessuti tumorali, rivelando caratteristiche altrimenti difficilmente osservabili con le tecniche di imaging tradizionali. In particolare, l'uso del contrasto permette di evidenziare le cellule DTP, che altrimenti sfuggirebbero all'identificazione, consentendo così di monitorarne la presenza e il comportamento in tempo reale. [1]

La presente tesi si colloca all'interno di questo progetto multidisciplinare, concentrandosi specificamente sull'algoritmo di tracking che viene utilizzato per monitorare la crescita degli organoidi e l'evoluzione delle cellule DTP nel corso del tempo. Il tracking cellulare è una componente cruciale per capire non solo la posizione delle cellule tumorali, ma anche come si evolvono in risposta alle terapie. Riuscire a seguire il comportamento di queste cellule consente di identificare cambiamenti critici nelle loro dinamiche, che potrebbero indicare l'insorgenza di resistenza ai trattamenti o la persistenza della malattia in forma latente.

Il seguente lavoro si focalizza quindi sull'ottimizzazione di un algoritmo di tracking in grado di monitorare con precisione la posizione e i movimenti degli organoidi durante i processi di imaging avanzato, come la tomografia ottica e fotoacustica. L'obiettivo è sviluppare un sistema che non solo segua le cellule in modo accurato, ma che sia anche capace di identificare cambiamenti nel comportamento cellulare che potrebbero essere indicatori precoci di tolleranza ai farmaci o di potenziale ricomparsa tumorale. L'integrazione di tecniche di elaborazione delle immagini e di intelligenza artificiale gioca un ruolo chiave nel migliorare la precisione e l'affidabilità dell'algoritmo.

## 1.2 La pipeline originale

La pipeline preesistente era basata su reti neurali profonde per la segmentazione e sul tracciamento di organoidi tumorali 3D a partire da immagini di tomografia a coerenza ottica (OCT). Il sistema proposto era composto da varie fasi, che comprendono la preelaborazione, la segmentazione con modelli di deep learning, la post-elaborazione delle immagini e un algoritmo di tracciamento multi-temporale.



**Figura 1.1:** Pipeline preesistente: (1) acquisizione delle immagini tramite OCT (2) pre-processing delle immagini OCT (3) segmentazione tramite rete neurale convoluzionale (4) tracking della crescita degli organoidi nel tempo

Le principali fasi che seguono l'acquisizione delle immagini tramite OCT sono descritte nel dettaglio di seguito:

### 1. Pre-processing delle immagini OCT:

La pipeline inizia con una fase di preelaborazione volta a migliorare la qualità delle immagini OCT. Questo include l'ottimizzazione del rapporto segnale-rumore e la riduzione del rumore visivo, che spesso rende difficile distinguere gli organoidi dallo

sfondo. Viene applicata una normalizzazione dell'istogramma, seguita da un filtro di riduzione del rumore e un potenziamento dei contrasti per migliorare la visibilità degli organoidi.

## **2. Segmentazione Basata su Reti Neurali Convolutionali (CNN):**

La segmentazione delle immagini è realizzata attraverso una rete convoluzionale (CNN) di ultima generazione. Il modello di segmentazione utilizza una "K-Net" con un backbone Swin Transformer, un'architettura che permette di catturare le caratteristiche multi-scala delle immagini e le dipendenze a lungo raggio. Il modello è addestrato su immagini 2D estratte da volumi 3D di immagini OCT, e sfrutta strategie di data augmentation per migliorare la robustezza e la generalizzazione del modello. Durante l'inferenza, il modello predice la segmentazione per singola fetta dell'immagine, generando maschere binarie che distinguono gli organoidi dal resto del tessuto.

## **3. Post-Elaborazione delle Maschere Segmentate:**

Le maschere generate dal modello vengono sottoposte a un'ulteriore fase di post-elaborazione. Questa fase può essere considerata una sorta di preprocessing che precede l'algoritmo di tracking. Questa fase ha lo scopo di migliorare ulteriormente l'accuratezza della segmentazione, rimuovendo oggetti indesiderati e correggendo possibili errori. La dimensione e il volume degli organoidi segmentati vengono confrontati con volumi di riferimento sferici per eliminare false rilevazioni o oggetti troppo piccoli per essere considerati organoidi, tramite un processo di *Remove Small Objects*.

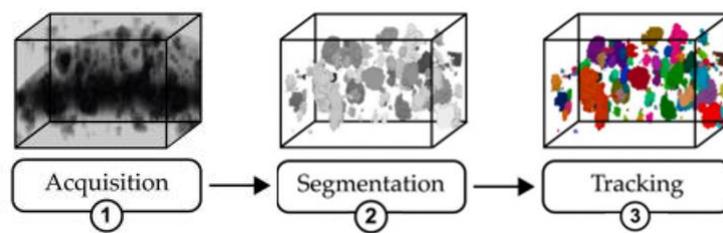
## **4. Algoritmo di Tracking:**

Il tracking degli organoidi nel tempo viene effettuato mediante un algoritmo appositamente sviluppato, che permette di seguire l'evoluzione di ciascun organoide in volumi di immagini acquisiti in più giorni (fino a 13 giorni). L'algoritmo adotta una strategia a doppio ramo: un ramo ascendente, che traccia l'evoluzione dell'organoide dal volume di riferimento verso i giorni successivi, e un ramo discendente, che traccia l'evoluzione dal volume di riferimento verso i giorni precedenti. La corrispondenza tra gli organoidi in volumi successivi viene determinata valutando attributi chiave come la posizione del centroide, il volume e i descrittori di forma, oltre a utilizzare metriche di

similarità come l'IoU Score. Le corrispondenze vengono valutate con un sistema di probabilità che assicura la robustezza del tracciamento. [2]

### 1.3 La nuova pipeline

La nuova pipeline sviluppata integra alcuni dei codici preesistenti, modificandoli e combinandoli con nuove strategie, al fine di ottimizzare il tracciamento del maggior numero possibile di organoidi. Il nuovo sistema continua a includere la segmentazione basata su reti neurali profonde; tuttavia, a differenza del precedente, utilizza le immagini originali derivate dall'OCT, eliminando così la fase di preprocessing. Il workflow completo si riduce quindi al seguente:



**Figura 1.2:** Nuova Pipeline complessiva

In particolare, il lavoro si è focalizzato sulla modifica e l'ottimizzazione della fase di tracking, arricchita con nuove fasi preliminari e di postprocessing. La pipeline relativa alla fase di tracking risulta composta dalle seguenti parti:

1. **Pre-processing:** comprende l'esecuzione di una trasformazione Watershed sui volumi e l'applicazione dello zero padding per ottenere volumi della stessa dimensione per ogni campione.
2. **Algoritmo di tracking:** in questa fase si esegue il tracking degli organoidi utilizzando il codice preesistente, leggermente modificato.
3. **Merging delle tabelle:** in questa fase si svolge un processo di merging degli organoidi rilevati in maniera continuativa in tutti i timepoint (organoidi FT, *fully tracked*) ottenuti eseguendo il codice al variare dei parametri di settaggio.

4. **Rilevazione delle fusioni:** la rilevazione delle fusioni ha lo scopo di correggere i valori dei volumi degli organoidi FT interessati, al fine di garantire la massima coerenza dei risultati.
5. **Generazione dei grafici per la valutazione del tracking:** l'ultima fase comprende la creazione di grafici per il monitoraggio della crescita degli organoidi e la rilevazione degli organoidi DTP tra quelli tracciati.



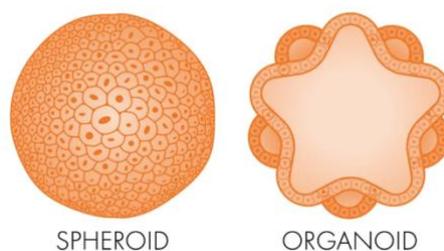
**Figura 1.3:** Schema riassuntivo della nuova pipeline del tracking degli organoidi a partire dai risultati della segmentazione

## Capitolo 2

### Materiali

I volumi utilizzati per l'acquisizione tramite OCT derivano da colture 3D di organoidi tumorali. I sistemi di coltura cellulare 3D replicano il microambiente naturale delle cellule, un aspetto fondamentale nella ricerca farmacologica e in altri studi che analizzano le risposte cellulari a fattori esterni. Questi sistemi rivestono un ruolo chiave nella ricerca biomedica, poiché offrono un ambiente standardizzato e riproducibile, ideale per studiare il comportamento cellulare e le reazioni delle cellule a diversi stimoli ambientali [11]. Nel caso in analisi questi sistemi di coltura 3D contengono organoidi: le colture di organoidi riproducono la struttura e le funzioni di organi reali, come polmoni o cuore. Esse si formano guidando le cellule staminali a differenziarsi in specifici tipi cellulari, i quali possono successivamente organizzarsi in strutture tridimensionali. Gli organoidi sono in grado di sviluppare interazioni complesse tra cellule e includere diversi tipi cellulari che cooperano per svolgere funzioni simili a quelle degli organi, avvicinandosi ulteriormente alla loro struttura reale. Tuttavia, gli organoidi rimangono meno complessi rispetto agli organi veri, poiché privi di componenti come vasi sanguigni e nervi. Le applicazioni degli organoidi sono molteplici e spaziano dallo screening farmacologico alla medicina personalizzata, fino alla ricerca sul cancro [11].

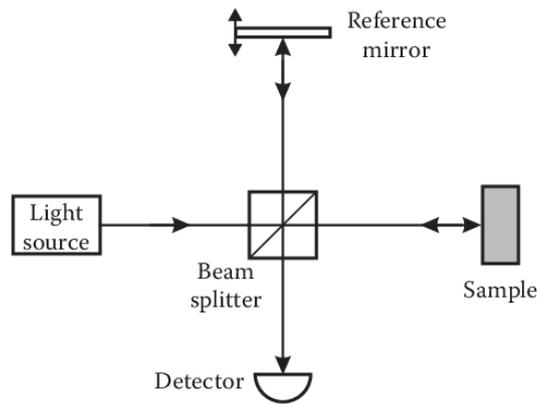
Gli organoidi non sono da confondersi con gli sferoidi, un ulteriore tipo di coltura 3D anch'essa utilizzata nella ricerca oncologica, queste colture di sferoidi sono più semplici rispetto agli organoidi e agli organi reali. Si presentano come strutture cellulari tridimensionali compatte e arrotondate più semplici rispetto agli organoidi e costituite generalmente da un unico tipo cellulare [11].



**Figura 2.1:** Esempio grafico di sferoide e organoide. A sinistra, lo sferoide, mostra una struttura più semplice rispetto all'organoide, a destra, che appare con struttura più complessa

I volumi utilizzati nella fase di tracking sono il risultato della segmentazione delle immagini dei volumi 3D, contenenti gli organoidi da tracciare, ottenute mediante la tecnica di OCT (Optical Coherence Tomography).

La tomografia a coerenza ottica (OCT) rappresenta uno strumento fondamentale per il monitoraggio della risposta terapeutica nelle colture tridimensionali di tessuti. Questa metodologia ottica di imaging funziona in modo simile all'ecografia, ma utilizza la luce anziché gli ultrasuoni, permettendo l'acquisizione rapida di immagini tridimensionali dei campioni. I dispositivi OCT sono progettati per penetrare fino a pochi millimetri all'interno dei tessuti, offrendo una risoluzione spaziale a livello micrometrico che consente un'analisi dettagliata delle strutture cellulari in tutta la coltura in vitro. Il contrasto nelle immagini OCT deriva dalla riflessione della luce sui componenti dei campioni, permettendo così una visualizzazione precisa delle caratteristiche interne [9]. L'OCT è spesso paragonata all'ecografia per la similarità nei principi operativi. Entrambe le tecniche di imaging trasmettono onde verso il tessuto da esaminare, che vengono poi riflesse in base alla struttura interna del tessuto stesso. Le onde riflesse vengono analizzate per misurare il ritardo, così da determinare la profondità alla quale si è verificata la riflessione. A differenza dell'ecografia, che si basa su onde sonore, l'OCT utilizza onde luminose nel vicino infrarosso, caratterizzate da una velocità di propagazione molto più elevata. Poiché i ritardi delle onde luminose riflesse non possono essere misurati direttamente, si impiega un sistema di misurazione di riferimento. Utilizzando un interferometro, una parte della luce viene diretta verso il campione e un'altra verso un braccio di riferimento, la cui lunghezza è nota, consentendo così una misurazione precisa della posizione e delle caratteristiche del tessuto [10].



**Figura 2.2:** Schema del funzionamento della Tomografia a Coerenza Ottica (OCT)

Le immagini dei volumi ottenute con questa tecnica vengono poi sottoposte alla segmentazione. Le maschere risultanti dalla segmentazione compongono il dataset da cui parte la pipeline descritta in questa tesi.

Per lo svolgimento di questo studio si è utilizzato un dataset composto da sette campioni. Questo dataset può essere diviso in due gruppi:

- **Campioni trattati:** sono i campioni il cui nome inizia per “p1” e che rappresentano i volumi a cui è stata somministrata la terapia antitumorale. Tali campioni sono quelli utilizzati per studiare l’originarsi e l’evoluzione delle cellule DTP (*Drug Tolerant Persister*) caratterizzate dalla loro resistenza ai farmaci antitumorali. Le acquisizioni delle immagini OCT dei campioni trattati sono state svolte ogni due giorni per un lasso temporale di 21 giorni, per cui ogni campione è composto da 10 volumi (d3, d5, d7, d9, d11, d13, d15, d17, d19, d21).
- **Campioni non trattati:** compongono il gruppo di controllo e mostrano la libera degli organoidi senza l’amministrazione del farmaco. Questi campioni sono stati valutati per un periodo di 13 giorni, per cui ad ogni sample corrispondono 6 volumi (d3, d5, d7, d9, d11, d13).

La tabella 2.1 mostra l’elenco dei sample del dataset e la loro dimensione.

Day	Size w5	Size p1_w6
d3	839x1200x698	800x1200x698
d5	811x1200x698	800x1200x698
d7	811x1200x698	800x1200x697
d9	811x1200x696	800x1200x698
d11	811x1200x698	800x1200x698
d13	811x1200x698	800x1200x698
d15	-	800x1200x698
d17	-	800x1200x698
d19	-	800x1200x698
d21	-	800x1200x698

**Tabella 2.1:** Elenco dei campioni del dataset utilizzato

Alcuni campioni, tuttavia, all'uscita dalla rete di segmentazione, presentano delle variazioni nelle dimensioni dei volumi relativi ad alcuni giorni. Nella tabella 2.2 sono specificate le dimensioni dei singoli volumi relativi ai due campioni che subiscono queste variazioni:  $p1\_w6$  e  $w5$ .

Sample	Label	Size
p1_w6	Treated	800x1200x698
p1_w7	Treated	880x1200x698
p1_w8	Treated	830x1200x698
w4	Untreated	857x1200x698
w5	Untreated	811x1200x698
w7	Untreated	840x1200x698
w8	Untreated	850x1200x698

**Tabella 2.2:** Elenco delle dimensioni dei volumi di  $w5$  e  $p1\_w6$ . Si notano variazioni in  $w5\_d3$ ,  $w5\_d9$  e  $p1\_w6\_d7$ .

# Capitolo 3

## Metodi

L'intera pipeline successiva alla segmentazione e relativa al tracking degli organoidi nel tempo è svolta utilizzando MATLAB R2024a.

Si analizza nel dettaglio la fase del tracking e tutte le parti che la compongono, ovvero: pre-processing, algoritmo di tracking, merging delle tabelle e rilevazione delle fusioni.

### 3.1 Pre-processing

Per ogni campione le maschere ottenute nella fase di segmentazione rappresentano le “*slice*” del volume totale perciò prima di essere utilizzate nella la fase di tracking vengono rimesse insieme a ricreare il volume in formato ‘*mat*’.

Poiché l'algoritmo di tracking utilizza la posizione del centroide e quest'ultima viene determinata considerando gli elementi connessi del volume, se uno o più organoidi si fondono tra di loro, questo determina uno spostamento troppo elevato del centroide. Tale problema non permette un corretto e continuativo tracciamento degli organoidi nei volumi. La soluzione adottata che mira alla risoluzione di questo problema è la Watershed transform.

Si è notato, a seguito di molteplici prove, che l'algoritmo di tracking presenta migliori performance nei casi in cui tutti i volumi di uno stesso campione abbiano le medesime dimensioni. A questo proposito si è applicato uno zero padding ai campioni.

#### 3.1.1 Watershed transform

La Watershed transform è una tecnica di segmentazione che si basa sulla rappresentazione topografica dell'intensità dell'immagine. In questo contesto, l'immagine viene interpretata come una superficie topografica in cui il valore di ciascun pixel rappresenta l'altitudine in quel punto. Ogni minimo locale è considerato un bacino idrografico, mentre i confini

tra i bacini costituiscono le linee di Watershed, che indicano le divisioni tra le diverse regioni segmentate [7].

Il toolbox di *Image Processing* di MATLAB consente l'applicazione di questa tecnica anche su dati volumetrici tridimensionali. Per rendere questi volumi idonei a tale tecnica, ovvero per far sì che presentino minimi locali su cui la trasformata Watershed possa agire, è necessario applicare una distance transform. Questa operazione genera una rappresentazione del volume in cui le distanze dai confini degli oggetti sono misurate, facilitando così l'identificazione dei bacini idrografici per una segmentazione accurata.

L'applicazione diretta della trasformata Watershed sulla trasformata della distanza del volume comporta, nel nostro caso, un'eccessiva sovra-segmentazione. Questo fenomeno è attribuibile alla superficie irregolare e non uniforme degli organoidi. Per risolvere tale problematica, è necessario procedere con ulteriori manipolazioni dei volumi, al fine di ottenere una segmentazione più accurata.

Il principio fondamentale dell'applicazione della trasformata Watershed è quindi il seguente: convertire l'immagine originale in una nuova rappresentazione in cui i bacini idrografici coincidano con gli oggetti che si desidera individuare. In questo modo, si facilita la separazione delle aree di interesse, poiché ogni bacino rappresenta una regione distinta che può essere identificata come un oggetto specifico all'interno dell'immagine [8].

Di seguito verranno spiegati gli step seguiti nell'applicazione della Watershed transform ai volumi in esame.

Per applicare la trasformata Watershed è inizialmente necessario caricare il volume binario e calcolare l'inverso della distance transform del complemento del volume: questo passaggio permette di ottenere una matrice delle stesse dimensioni del volume caratterizzata da minimi locali.

In seguito, si procede con l'identificazione dei minimi estesi, questo è un passaggio intermedio per definire meglio le aree che saranno considerate come potenziali "sorgenti" per la Watershed transform. Questo serve a evitare che piccoli valori, causati dalla superficie non uniforme degli organoidi, vengano interpretati come minimi validi e

portino quindi ad un caso di sovra segmentazione. A tal proposito è stata utilizzata la funzione *imextendedmin*.

La funzione *imextendedmin* svolge la trasformata dei minimi estesi, ovvero individua i minimi locali della *H-transform*. La *H-transform* è una trasformata che ha lo scopo di sopprimere i minimi del volume che hanno una profondità minore della soglia *h*. [3]

Di seguito un esempio 1-D per meglio comprendere il funzionamento di tale trasformata:

Data  $f = [5\ 4\ 5\ 4\ 3\ 2\ 1\ 2\ 3\ 4\ 5\ 6\ 5\ 4\ 3\ 2\ 1\ 0]$ , il secondo elemento, di valore 4, è un minimo locale di profondità pari a 1. Il settimo elemento, di valore pari a 1, è anch'esso un minimo locale e ha una profondità di 5.

La *H-transform* di *f* con soglia pari a 1 restituisce  $[5\ 5\ 5\ 4\ 3\ 2\ 2\ 2\ 3\ 4\ 5\ 6\ 5\ 4\ 3\ 2\ 1\ 1]$ .

Questa operazione appiattisce tutti e tre i minimi, infatti il primo minimo locale ora è scomparso.

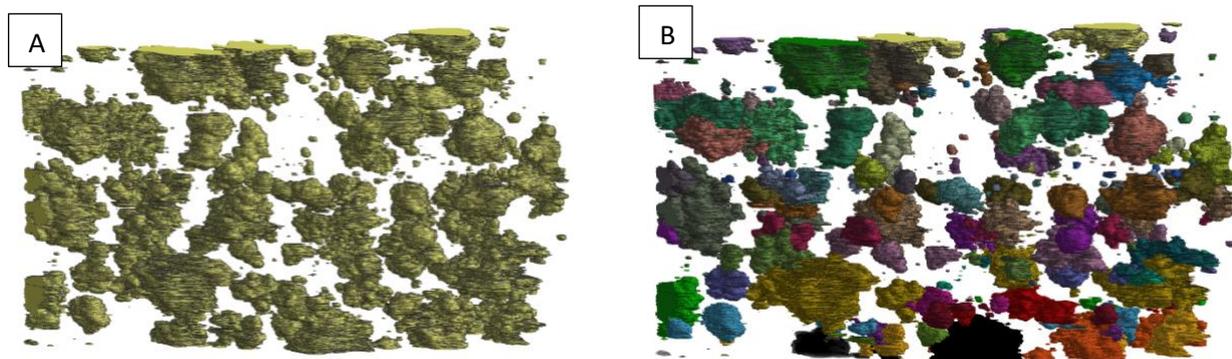
L'operazione *imextendedmin(f,1)* restituisce un array logico con la posizione dei minimi locali rimanenti dopo l'applicazione della *H-transform*:  $[0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 1\ 1\ 1\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 1\ 1]$ . [4]

Risulta quindi necessario determinare una soglia *h* appropriata per volumi in esame. A seguito di molteplici prove, si è deciso di impostare una soglia variabile e dipendente dal giorno di acquisizione di ogni volume: se il giorno (*day*) estratto dal nome del file è maggiore di 13, allora si passa una soglia dinamica a *imextendedmin*, impostata come *day - 10* (Es. Se il volume processato è *p1\_w7\_d17* allora la soglia *h* assume il valore di 7). Altrimenti, viene utilizzata una soglia fissa pari a 3. L'idea è che, con l'avanzare dei giorni, la struttura potrebbe diventare più complessa, necessitando di una soglia più alta per stabilire minimi significativi. La funzione *imextendedmin* è applicata, con la soglia determinata, alla *distance transform* precedentemente ottenuta, con lo scopo di identificare le posizioni che saranno successivamente trattate come marcatori per la segmentazione.

L'ultimo passaggio intermedio che precede l'applicazione della Watershed transform prevede l'utilizzo della funzione *imimposemin*: questa funzione forza i valori della *distance transform* in corrispondenza dei minimi estesi (ottenuti con *imextendedmin*) a

diventare minimi assoluti (punti di partenza per l'allagamento). Così facendo, si indirizza l'algoritmo Watershed a partire dalle regioni dove *imextendedmin* ha trovato i minimi.

A questo punto è possibile applicare l'algoritmo di Watershed alla mappa delle distanze modificata, ottenendo così organoidi definiti e divisi tra di loro sia fisicamente che da label di diversi colori.



**Figura 3.1:** Esempio di volume prima (A) e dopo (B) l'applicazione dell'algoritmo di Watershed

Il codice completo per l'applicazione della trasformata Watershed è mostrato nell'appendice A.

Prima di continuare con il pre-processing, il volume è riportato al formato logico, per cui tutti i voxel di valore diverso da 0 sono convertiti a 1.

### 3.1.2 Zero padding

Testando l'algoritmo di tracking si è notato che le performance di tale algoritmo variano in base all'uniformità delle dimensioni dei volumi di uno stesso campione: il numero di organoidi FT identificati utilizzando il campione con volumi di dimensioni differenti è minore del numero di organoidi FT identificati utilizzando il campione con volumi uniformi.

La presenza di volumi dalle dimensioni differenti è dovuta al fatto che le immagini ottenute tramite OCT risultano in realtà non registrate. La registrazione tridimensionale delle immagini riveste un ruolo fondamentale in ambiti come l'imaging medico e la robotica. Essa consente di allineare diversi set di dati all'interno di un unico sistema di

coordinate, offrendo una prospettiva uniforme che facilita analisi più approfondite. Attraverso un allineamento accurato, è possibile confrontare, esaminare e integrare informazioni raccolte in contesti differenti. [12]

Questo problema rende ancora più difficile il tracciamento degli organoidi lungo i giorni di acquisizione.

Per questo motivo si è deciso di uniformare le dimensioni di tutti i volumi di uno stesso campione. Questo passaggio non è equivalente alla registrazione delle immagini, ma volumi uniformi hanno prodotto performance migliori dell'algoritmo poiché permettono una migliore corrispondenza tra le coordinate dei voxel in diversi volumi.

Questo è stato svolto utilizzando lo zero padding, un metodo che permette di mantenere le caratteristiche del volume originale senza distorcere la forma degli organoidi, a differenza di un resizing tradizionale.

Si identificano i valori massimi di altezza, larghezza e profondità tra tutti i volumi di un campione e si utilizza la funzione *padarray* per applicare il padding necessario a ciascun volume in modo che raggiunga le dimensioni massime precedentemente calcolate.

Questa operazione si è rivelata particolarmente significativa per i volumi del campione w5, che, partendo dalle dimensioni indicate nella Tabella 2.2, hanno raggiunto tutti le dimensioni di 839x1200x698. Lo zero padding nel campione w5 ha aumentato il numero di organoidi FT identificati da 1 a 50.

### **3.1.3 Erosione, Dilatazione e Hole filling**

L'ultimo step di preprocessing che precede l'esecuzione dell'algoritmo di tracking ha lo scopo di svolgere uno *smoothing* degli organoidi ottenuti lo step di segmentazione. A questo proposito, la strategia seguita prevede l'utilizzo di operatori morfologici quali: erosione, dilatazione e hole filling.

L'operazione di erosione, svolta con la funzione *imerode*, utilizza una sfera di raggio pari a 3 come elemento strutturale per restringere le aree occupate dagli organoidi e rimuovere dettagli minori.

L'operazione di dilatazione, svolta con la funzione *imdilate*, utilizza anch'essa una sfera di raggio tre come elemento strutturale e ha lo scopo di ingrandire le zone occupate da organoidi. L'utilizzo combinato e in sequenza di erosione e dilatazione assume il nome di apertura e ha lo scopo di rimuovere piccoli dettagli e rumore.

Infine, si procede con l'hole filling, utilizzando la funzione *imfill*, che consiste nello svolgere un'operazione di riempimento dei buchi che possono derivare da artefatti della segmentazione.

## **3.2 L'algoritmo di tracking**

I volumi in formato logical risultanti dalla fase di preprocessing vengono salvati come file '.mat' in maniera tale da essere utilizzati dall'algoritmo di tracking.

L'algoritmo di tracking ha il compito di tracciare ogni organoide dal volume del primo giorno (d3) a quello dell'ultimo giorno (d13 o d21 a seconda che si tratti rispettivamente di un campione 'Treated' o 'Untreated') in maniera continuativa.

### **3.2.1 Definizione dei parametri**

La prima parte dell'algoritmo consiste nel settaggio dei parametri: questa porzione di codice si differenzia da quella della versione precedente in quanto presenta una maggiore gamma di parametri modificabili. La Tabella 3.1 mostra il nuovo elenco dei parametri settabili.

'ref_index'	"ref_index_range"
'Approach'	"a"
'minDiameter'	20
'matchingCriteria'	1
'centroidType'	"Centroid"
'useCentroidDistance'	True
'centroidWeight'	1
'useVolumeDifference'	True
'usePropertyDifference'	False
'diceWeight'	1
'useIoUScore'	True
'useBoundingBox'	False
'iouWeight'	1
'postprocessing'	True
'spatialConfidenceRadius'	30
'volumeTolerance'	[0.2 0.3]
'probabilityThreshold'	0.75

**Tabella 3.1:** Elenco dei parametri modificabili nell'algoritmo di tracking

In particolare, i principali parametri che si è deciso di testare maggiormente variandone il valore sono:

- **'spatialConfidenceRadius'**: è il raggio della sfera che delimita la distanza massima accettabile entro cui un organoide può muoversi tra un volume e l'altro. Questa distanza è calcolata utilizzando le coordinate dei centroidi degli organoidi. Se l'organoide in esame presenta un movimento superiore a tale soglia questo è considerato 'outlier'.
- **'probabilityThreshold'**: il tracking è basato sul calcolo della probabilità di matching tra gli organoidi. La probability threshold è la minima probabilità accettabile associata alla compatibilità tra due organoidi (es. Se la *probability threshold* viene imposta a 0.6, verranno considerati solo match con una probabilità di matching maggiore di 0.6).
- **'volumeTolerance'**: il limite di tolleranza relativo alla crescita del volume nella fase discendente e alla diminuzione del volume nella fase ascendente. Tra i criteri

utilizzati per determinare le corrispondenze tra gli organoidi, la variazione del volume rappresenta un criterio importante.

- **‘postprocessing’**: è possibile impostare il flag su ‘True’ o ‘False’. Il termine ‘postprocessing’ si riferisce all’ultima serie di procedure descritte nel paragrafo precedente, che vengono applicate ai volumi prima dell’esecuzione del codice di tracking, ovvero erosione, dilatazione e hole filling. Se impostato su ‘True’, queste procedure verranno eseguite; se impostato su ‘False’, verranno omesse. In entrambi i casi, la Watershed transform e lo zero-padding saranno comunque effettuati.

Questi parametri sono stati testati con maggiore frequenza variandone il valore in modo da determinare la combinazione che produce le migliori performance. I valori che si è deciso di mantenere sono quelli riportati nella Tabella 3.1. Come è possibile notare, il nuovo codice permette di eseguire l’algoritmo di tracking utilizzando diversi valori per uno stesso parametro, come accade per esempio nel caso della ‘volumeTolerance’, non si è perciò limitati nella scelta dei parametri a differenza del precedente codice. Questo è possibile poiché la fase successiva all’esecuzione del codice di tracking prevede il merging delle tabelle ottenute con ogni combinazione dei parametri scelti.

Gli iper-parametri che, invece, sono stati mantenuti costanti e invariati sono principalmente:

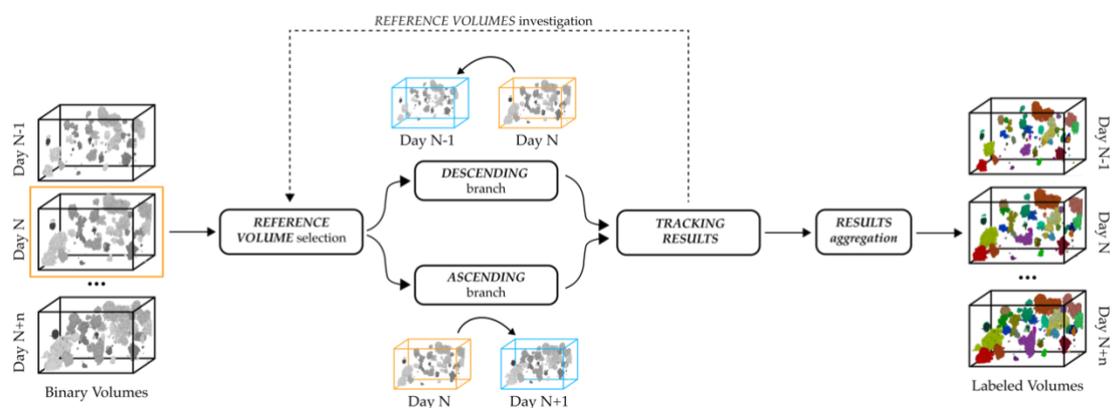
- **‘minDiameter’** = 20: il diametro al di sotto del quale un oggetto della segmentazione non viene considerato organoide. Questo parametro serve per svolgere una sorta di *Remove Small Objects*, prima di iniziare il processo di tracking, in cui il diametro di ogni organoide è comparato alla soglia definita da ‘minDiameter’ e scartato se minore, in modo da correggere ulteriormente eventuali errori nelle maschere dovuti ad artefatti della segmentazione.
- **‘useCentroidDistance’** = true: impone il calcolo delle distanze tra i centroidi e confronto di queste con la ‘spatialConfidenceRadius’ analizzata in precedenza.
- **‘approach’** = “a”: specifica l’utilizzo della distanza euclidea nella funzione per il calcolo della distanza tra due centroidi.

- **‘useVolumeDifference’** = true: impone il controllo della variazione di volume confrontandola con la ‘volumeTolerance’ citata precedentemente.
- **‘useIoUScore’** = true: impone l’utilizzo della IoU per il calcolo della sovrapposizione tra i due organoidi in esame come criterio per la determinazione della compatibilità tra due organoidi.
- **‘UseBoundingBox’** = false: specifica di non utilizzare le bounding box per il calcolo dell’IoU citata nel parametro precedente.

### 3.2.2 Strategia di tracking a doppio ramo

Una volta settati tutti i parametri e definiti i percorsi ai volumi che verranno utilizzati e alle cartelle che conterranno i risultati del tracking, il codice procede con la parte dell’algoritmo relativa al vero e proprio tracciamento degli organoidi.

Nel nuovo algoritmo di tracking si è mantenuta la strategia a doppio ramo definita nel codice precedente: il ramo ascendente segue l'evoluzione dell'organoide dal volume di riferimento verso i giorni successivi, il ramo discendente analizza il cambiamento dal volume di riferimento verso i giorni precedenti. La principale differenza, in questo caso, tra il nuovo codice e quello precedente risiede nell’eliminazione della necessità di selezionare un singolo giorno di riferimento; il codice ora definisce progressivamente ciascun volume presente in un campione come volume di riferimento.



**Figura 3.2:** Rappresentazione dell'approccio a doppio ramo dell'algoritmo di tracking

La corrispondenza tra gli organoidi in volumi consecutivi è stabilita analizzando attributi essenziali, come la posizione del centroide, il volume e i descrittori della forma, insieme a metriche di somiglianza come l'IoU Score. Le corrispondenze vengono verificate tramite un sistema probabilistico che garantisce l'affidabilità del tracciamento.

### 3.2.3 Criteri di Matching

La fase di tracking segue infatti un approccio probabilistico che consiste essenzialmente nel calcolo di *probability components*, utilizzati per ottenere una matrice di probabilità che riassume la probabilità di matching tra i vari organoidi di volumi consecutivi. Le *probability components* vengono calcolate mediante diverse metriche come la distanza Euclidea, la differenza di volume e la similarità della forma, in base ai criteri impostati nella fase di scelta dei parametri. Nel caso specifico in esame i criteri utilizzati sono la distanza tra i centroidi, la differenza tra i volumi e lo score associato all'IoU.

*Primo criterio: differenza di volume*

Il primo criterio utilizzato riguarda la differenza di volume tra il volume di riferimento e quello ispezionato basata sul confronto con delle soglie. Nel ramo ascendente la soglia è calcolata come mostrato nella seguente formula:

$$toleranceThreshold = refVolume \cdot (1 - volumeTolerance)$$

invece, nel ramo discendente, è calcolata come:

$$toleranceThreshold = refVolume \cdot (1 + volumeTolerance)$$

dove *refVolume* è il volume dell'organoide in esame.

Se nel ramo ascendente il volume dell'organoide ispezionato risulta minore della soglia, oppure, se nel ramo discendente risulta maggiore della soglia, il *probability component* è posto a zero e si procede al successivo organoide da ispezionare.

*Secondo criterio: IoU Score*

Se il criterio sul volume è rispettato, si procede al calcolo dell'IoU score. Matematicamente l'IoU (Intersection Over Union) è definito come segue:

$$IoU = \frac{TP}{TP + FP + FN}$$

In questo caso i TP (True Positive) sono i voxel dell'organoide del volume di riferimento che si sovrappongono a quelli dell'organoide del volume in esame (ovvero l'intersezione tra le due liste di voxel), i FP (False Positive) sono i voxel dell'organoide del volume in esame che non si sovrappongono a quelli dell'organoide di riferimento, e i FN (False Negative) sono i voxel dell'organoide di riferimento che non si sovrappongono con quelli dell'organoide in esame.

Viene perciò calcolata l'intersezione tra i voxel che compongono l'organoide ispezionato e quelli che compongono quello di riferimento: se questa risulta nulla anche in questo caso il probability component è posto a zero e si procede con l'organoide successivo. Se invece questa intersezione risulta piena, si procede con il calcolo dell'IoU score, utilizzato per determinare il probability component mediante la formula:

$$probabilityComponents = probabilityComponents \cdot (iouWeight \cdot iouScore)$$

dove *iouWeight* è pari a 1 in questo caso.

*Terzo criterio: Distanza tra i centroidi*

Rispettato il criterio precedente è possibile procedere al successivo: il criterio legato alla distanza tra i centroidi. La distanza tra il centroide dell'organoide di riferimento e il centroide dell'organoide ispezionato è calcolata utilizzando la distanza euclidea note le coordinate spaziali. Questa distanza viene quindi confrontata con la 'SpatialConfidenceRadius': se la distanza risulta maggiore della soglia, anche in questo caso il probability component è posto pari a zero e il codice passa al successivo organoide, se invece è minore della soglia viene calcolato il probability component come:

$$probabilityComponents = probabilityComponents \cdot (centroidWeight \cdot \frac{1}{centroidDistance + 1})$$

dove anche qui il *centroidWeight* è posto pari a 1.

Ottenuto il probability component relativo alla coppia di organoidi in esame, questo viene inserito nella matrice di matching.

Al centro della fase finale di determinazione dei match si trova la matrice di matching dove ogni elemento è il probability component tra un organoide di riferimento (riga) e un organoide ispezionato (colonna). Gli elementi di questa matrice vengono in seguito normalizzati e filtrati in base al valore di 'probabilityThreshold' impostato: gli elementi con valore minore del 'probabilityThreshold' vengono annullati. A partire dalla matrice di matching si ottiene un vettore che include gli indici degli organoidi corrispondenti e la probabilità associata a ciascun abbinamento.

Nella Figura 3.3 seguente è possibile visionare uno schema riassuntivo nel workflow dei criteri di matching utilizzati nell'algoritmo di tracking:



**Figura 3.3:** Workflow dei criteri di matching nell'algoritmo di tracking

L'utilizzo di criteri più stringenti rispetto alla versione preesistente permette di velocizzare l'esecuzione del codice.

### 3.2.3 Output dell'algoritmo di tracking

Al termine dell'esecuzione del nuovo algoritmo di tracking, vengono generati diversi output tabellari: una cartella conterrà le tabelle relative a ciascuna iterazione, contenenti l'elenco degli organoidi FT; un'altra cartella conterrà le tabelle con l'elenco di tutti gli organoidi (sia completamente tracciati sia parzialmente tracciati) per ogni iterazione. Infine, verrà prodotta una tabella riassuntiva che sintetizza tutte le iterazioni effettuate, con i parametri associati e le metriche di valutazione della qualità dell'esecuzione.

La metrica utilizzata per valutare l'accuratezza del tracciamento degli organoidi è definita con il nome di **Consistency Score** ed è un parametro che viene calcolato per ogni organoide. La consistency score valuta la coerenza in termini di crescita del volume e movimento dell'organoide, basandosi su due criteri principali:

- Coerenza della variazione del volume: valuta quanto coerentemente il volume varia nel tempo.
- Stabilità spaziale: valuta la stabilità nel movimento dell'organoide calcolandone la distanza da una posizione di riferimento.

Ad ognuno di questi due criteri è attribuito uno score e il Consistency Score finale è ottenuto mediando lo score riferito all'andamento del volume e lo score riferito alla stabilità spaziale.

La *consistency* dell'andamento del volume misura l'entità con cui il volume di un organoide è cresciuto o si è mantenuto stabile nel tempo. A tal fine, la funzione elabora i valori di volume rilevati nei diversi giorni, conteggiando quelli che mostrano una variazione positiva o nulla (ossia stabile) e penalizzando i giorni che registrano una significativa riduzione di volume. Si calcola quindi una *positiveProportion*, definita come il rapporto tra i giorni con variazione positiva o stabile e il numero totale di giorni, insieme a una *normalizedPenalty* per le riduzioni consistenti. Il punteggio finale è ottenuto sottraendo la *normalizedPenalty* dalla *positiveProportion*, assicurando che il risultato sia sempre compreso tra 0 e 1.

La stabilità spaziale valuta l'entità degli spostamenti di un organoide rispetto alla sua posizione nel giorno di riferimento. I centroidi degli organoidi vengono confrontati con la posizione del centroide dell'organoide nel giorno di riferimento; distanze che superano

una soglia predefinita, stabilita dal *boundaryRadius*, classificano il giorno in esame come un outlier. Lo score di stabilità spaziale viene calcolato in base alla percentuale di giorni in cui l'organoide rimane all'interno della sfera determinata dal *boundaryRadius*, fornendo una misura della stabilità spaziale.

Un ulteriore parametro, importante per la determinazione di una buona iterazione è quello della **Completeness**: questa metrica è determinata calcolando la percentuale di giorni per cui è stato tracciato continuamente l'organoide rispetto al totale di giorni presenti. Gli organoidi FT sono quindi caratterizzati da una Completeness del 100% perché vengono rilevati in ognuno dei volumi relativi al campione, dal primo fino all'ultimo giorno.

La tabella riassuntiva di tutte le iterazioni fornita alla conclusione dell'esecuzione dell'algoritmo di tracking si presenta come una tabella Excel in formato .xlsx e salvata come *'tuning\_results\_[sampleName].xlsx'*. Ogni riga della tabella è riferita ad una determinata iterazione e le colonne mostrano in parte i parametri utilizzati in quella iterazione e in parte le metriche calcolate con i risultati di quell'iterazione. In particolare, le colonne comprendono:

- **'iteration'**: mostra per ogni riga il numero dell'iterazione a cui si riferisce.
- **'ref\_index'**: questa colonna presenta il numero del giorno utilizzato come giorno di riferimento in quella determinata iterazione.
- **'spatialConfidenceRadius'**: è lo stesso parametro impostato precedentemente nella fase di settaggio. Nel caso in esame questo valore si è mantenuto costante per cui lo stesso valore, pari a 30, si mostra ripetuto in tutte le righe.
- **'volumeTolerance'**: è lo stesso parametro impostato nella fase di settaggio. Nel caso in esame questo parametro varia tra due valori, 0.2 e 0.3, a seconda dell'iterazione considerata.
- **'probabilityThreshold'**: anche in questo caso il valore di questo parametro è mantenuto costante e pari a 0.75 come descritto in precedenza.
- **'postprocessing'**: anche qui si è impostata la flag relativa al parametro pari a 'True' per cui nella tabella Excel si mostra con il valore 1 ripetuto per tutte le righe.

- **‘completeness’**: è la percentuale di organoidi FT rispetto al numero totale di organoidi rilevati. Viene quindi calcolata considerando solo gli organoidi che presentano una completeness pari al 100%.
- **‘completeness0-25’**: è la percentuale degli organoidi tracciati da 0 fino al 25% dei giorni totali rispetto al numero totale di organoidi. Il processo per ottenere i valori delle percentuali come completeness0-25 prevede inizialmente il conto, per ogni organoide, di quanti sono i giorni in cui è stato rilevato e il rapportare quel valore al numero di totale di giorni presenti. In questo modo si ottiene la percentuale di completeness relativa a quell’organoide. Contando poi il numero di organoidi con percentuali di completeness compresi tra due valori e rapportandoli al numero totale di organoidi si ottiene il valore di completeness0-25 in questo caso.
- **‘completeness25-50’**: i valori assunti dalle righe di questa colonna sono ottenuti in maniera analoga alla colonna che la precede, con la differenza che in questo caso si contano gli organoidi con completeness compresa tra 25 e 50.
- **‘completeness50-75’**: i valori assunti dalle righe di questa colonna sono ottenuti in maniera analoga alla colonna che la precede, con la differenza che in questo caso si contano gli organoidi con completeness compresa tra 50 e 75.
- **‘completeness75-100’**: i valori assunti dalle righe di questa colonna sono ottenuti in maniera analoga alla colonna che la precede, con la differenza che in questo caso si contano gli organoidi con completeness compresa tra 75 e 100.
- **‘ConsistencyScore’**: per ogni iterazione, per cui per ogni riga, questo valore è calcolato come la media dei consistency score relativi ad ogni organoide rilevato. In questo caso sono considerati sia gli organoidi FT che quelli solo parzialmente tracciati (PT, Partially Tracked).
- **‘FTConsistencyScore’**: in questo caso la media è calcolata considerando i consistency score dei soli organoidi FT.
- **‘NumHighScore’**: numero di organoidi Fully Tracked con un valore di consistency score maggiore o uguale a 0.8
- **‘NumMidScore’**: numero di organoidi Fully Tracked con un valore di consistency score maggiore o uguale a 0.4 e minore di 0.8

- **‘NumLowScore’**: numero di organoidi Fully Tracked con un valore di consistency score minore di 0.4
- **‘ElapsedTime’**: mostra, per ogni riga, il tempo impiegato da quella iterazione. I valori sono più o meno tutti compresi tra i 7 e i 10 minuti.

Un esempio di come appare questa tabella è mostrato nell’Appendice B.

Nel codice di tracking preesistente veniva eseguita una sola combinazione di parametri per cui l’algoritmo forniva in uscita un’unica tabella contenente l’elenco per giorni dei volumi e dei centroidi degli organoidi rilevati, con un ID univoco per ogni organoide. Poiché nella nuova versione si testano diverse combinazioni, svolgendo quindi diverse iterazioni del codice, si ottiene in uscita una cartella contenente le tabelle con l’elenco degli organoidi rilevati per ogni iterazione. In più si ha anche un’ulteriore cartella contenente le tabelle che mostrano solo i FT.

Un esempio delle tabelle che si ottengono è visualizzabile nelle Appendici C e D.

### 3.3 Merging delle tabelle

A questo punto, la pipeline prevede la fase di unione delle tabelle. Tale processo richiede una fase preliminare in cui vengono determinate le iterazioni ottimali per ciascun giorno di riferimento. Nel nostro caso, dato che il parametro ‘volumeTolerance’ assume due valori, si avranno due iterazioni per ogni giorno di riferimento. L’iterazione ottimale per un determinato giorno è definita come quella che presenta il valore più elevato di ‘NumHighScore’. Inizialmente, si era scelto di utilizzare il ‘FTConsistencyScore’ come criterio per determinare la migliore esecuzione per giorno di riferimento; tuttavia, a seguito di un’analisi approfondita, è emerso che tutte le iterazioni mostrano valori elevati di ‘FTConsistencyScore’, generalmente superiori a 0.9. Pertanto, si è deciso di considerare l’esecuzione che genera il maggior numero di organoidi FT, con particolare attenzione a quella che produce il maggior numero di organoidi con un elevato valore di "consistency score" (‘NumHighScore’).

Viene quindi creata una nuova tabella contenente solo le righe di *'tuning\_results\_[sampleName].xlsx'* relative alle migliori iterazioni, che sarà utilizzata nelle fasi successive.

Il codice che svolge il processo di merging iter su tutti i campioni e in ognuno estrae le iterazioni associate alle migliori esecuzioni e costruisce il percorso per la tabella contenente i dati sugli organoidi (FTOrganoidsTable) relativi alla prima iterazione. Dopo aver caricato questa tabella, il codice determina il valore massimo di ID degli organoidi e la lunghezza iniziale della tabella.

Un ulteriore ciclo consente di caricare le tabelle relative alle altre iterazioni, creando sottoinsiemi delle tabelle contenenti solo le colonne relative ai centroidi e ai volumi. Viene quindi effettuata una comparazione tra le tabelle per identificare gli organoidi presenti nella seconda tabella ma assenti nella prima. Gli organoidi non presenti vengono aggiunti alla prima tabella.

Dopo aver completato il merging delle tabelle, il codice calcola la lunghezza finale della tabella. Se la lunghezza è aumentata, il codice procede a correggere gli ID degli organoidi aggiunti, assegnando loro nuovi ID a partire dal valore massimo precedentemente calcolato.

Infine, la tabella risultante, contenente tutti gli organoidi aggiornati, viene salvata in un nuovo file Excel denominato *'FT\_Merged\_[sampleName]'*, all'interno della stessa sottocartella del campione elaborato. Questo processo consente di consolidare i dati sugli organoidi provenienti da diverse iterazioni in un'unica tabella e in particolare garantisce la massimizzazione del numero di organoidi FT, assicurando un tracking ottimale indipendentemente dal giorno di riferimento.

La Tabella 3.2 mostra in modo riassuntivo la variazione nel numero di organoidi completamente trackati a seguito dell'applicazione del merging.

Campione	Minor numero di FT in un'interazione	Maggior numero di FT in un'iterazione	Numero di FT dopo la procedura di merging
p1_w6	20	24	24
p1_w7	21	29	30
p1_w8	21	32	32
w4	42	46	46
w5	48	50	50
w7	9	10	10
w8	57	63	63

**Tabella 3.2:** Schema riassuntivo del numero di organoidi FT per ogni campione prima e dopo l'applicazione della procedura di Merging

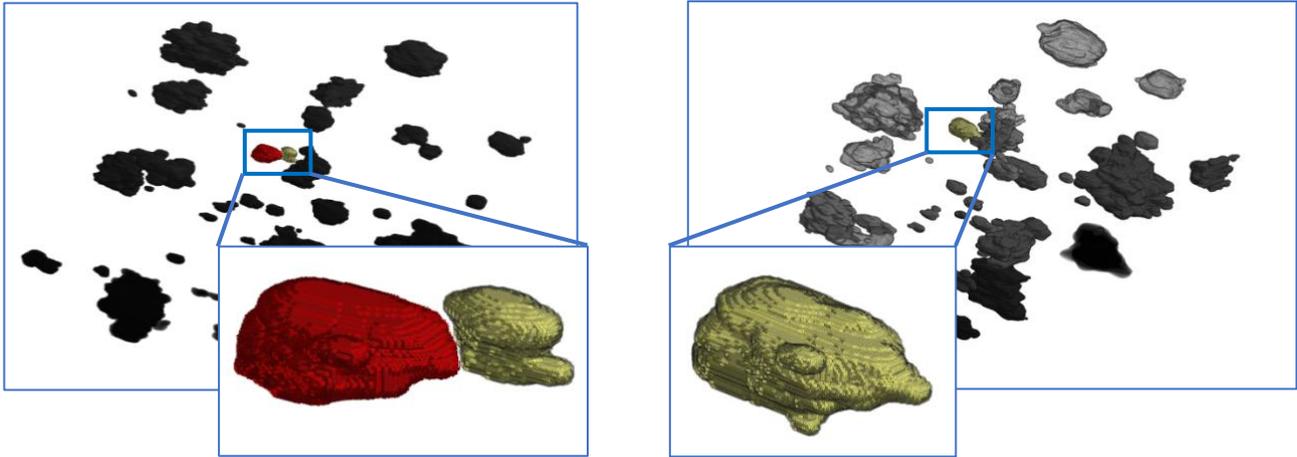
La procedura di fusione è pertanto impiegata principalmente per garantire la massimizzazione del numero di organoidi identificati e, in particolare, per estrarre tutte le informazioni registrate in funzione delle variazioni del giorno di riferimento.

La procedura di merging è applicata in modo analogo agli organoidi parzialmente tracciati: dopo aver estratto dalle tabelle integrali solo gli organoidi non completamente tracciati, a queste nuove tabelle viene applicato lo stesso processo visto precedentemente per gli organoidi FT. Si ottiene quindi anche qui un nuovo file Excel, denominato '*PT\_Merged\_[sampleName]*', contenente tutti gli organoidi parzialmente tracciati (PT) al variare del giorno di riferimento.

Questa nuova tabella è necessaria per il prossimo step della pipeline riguardante l'individuazione delle fusioni tra gli organoidi.

### 3.4 Rilevazione delle fusioni

I valori dei volumi degli organoidi ottenuti dal tracking non tengono conto di eventuali fusioni avvenute tra organoidi adiacenti; pertanto, per evitare picchi anomali in riferimento ai volumi assunti gli ultimi giorni, si procede con la rilevazione e correzione delle fusioni.



**Figura 3.4:** Esempio di fusione tra due organoidi nel campione w4. (A) i due organoidi divisi al giorno 9 e (B) gli organoidi si sono fusi in uno solo al giorno 11

Lo script che ha il compito di trattare queste fusioni comincia con il caricare le tabelle degli organoidi PT e FT, e successivamente invoca la funzione `findFusions`, la quale calcola la distanza la Recall, definita dalla seguente formula, tra gli organoidi PT e FT.

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}$$

All'interno di questa funzione, vengono caricati i dati volumetrici degli organoidi dai file `.mat`, e viene effettuata una pre-elaborazione dei dati comprendente erosione, dilatazione e hole filling, se specificato nel parametro di settaggio `'postprocessing'` dell'algoritmo di tracking. La funzione identifica le fusioni sulla base della posizione dei centroidi degli organoidi, calcolando le distanze e le percentuali di sovrapposizione (recall) tra i volumi degli organoidi.

Solo le fusioni con un valore di recall diverso da zero vengono mantenute. La tabella risultante viene quindi salvata in un file Excel. Un esempio della tabella risultante dalla funzione `findFusions` è mostrato nella seguente figura:

PT_organoid	PT_volume	FT_organoid	FT_volume	FusionDay	recall	distance
(770.04, 681.38, 150.69)	5951	(783.09, 674.39, 132.63)	50920	5	0,10099143	23,3522205
(142.62, 707.88, 298.09)	47233	(116.65, 697.33, 273.09)	124158	9	0,214722757	37,5598642
(160.57, 690.86, 299.65)	20955	(107.40, 669.41, 254.57)	373056	15	0,055452159	72,9339276
(893.56, 663.28, 403.90)	66275	(891.70, 653.34, 459.50)	109565	17	0,001161826	56,5121509
(974.62, 693.43, 448.56)	35521	(1004.98, 681.23, 478.97)	321928	9	0,585146815	44,669203
(1044.75, 705.65, 457.74)	1567	(1015.91, 692.11, 481.48)	229038	7	0,216975112	39,732415
(924.03, 693.96, 481.25)	12537	(891.70, 653.34, 459.50)	109565	17	0,846374731	56,2874391
(1054.87, 706.00, 508.72)	16669	(1015.91, 692.11, 481.48)	229038	7	0,337992681	49,5260669
(801.10, 626.08, 103.73)	58303	(794.87, 670.38, 112.85)	128027	19	0,372176389	45,6560763
(576.39, 606.64, 118.04)	49831	(584.95, 650.81, 145.89)	199313	9	0,514278261	52,9139396
(1045.33, 703.61, 530.92)	25793	(1010.71, 687.64, 499.19)	372778	15	0,59004381	49,6021995
(1120.96, 713.23, 290.25)	11359	(1102.75, 693.88, 287.43)	57396	11	0,85482877	26,7203855

**Figura 3.5:** Esempio tabella riepilogativa delle fusioni rilevate nel campione *pl\_w6*

Il FusionDay è determinato per ogni PT trovando la prima colonna con valori NaN, che indica la scomparsa dell'organoide PT.

Nella fase di correzione della tabella FT, il codice esamina ciascuna fusione, considerando solo quelle con un richiamo superiore al 50%. Viene calcolata la percentuale di volume dell'organoide PT rispetto a quello FT e si recuperano le coordinate dei centroidi. Se la percentuale è inferiore a 1, vuol dire che l'organoide più grande tra i due fusi è quello FT e il codice applica una correzione ai volumi FT, sottraendo il volume proporzionale corrispondente al volume PT. Questa correzione viene applicata per tutti i giorni successivi al giorno di fusione.

La nuova tabella contenente gli organoidi FT corretti viene anch'essa salvata come file Excel. Questo processo garantisce che i dati post-fusione siano rappresentati in modo più accurato, facilitando ulteriori analisi e interpretazioni dei risultati.

Centroid_d	Volume_d9	Centroid_d	Volume_d1	Centroid_d	Volume_d2								
(11506, 7)	(1132.88, 7)	10743	(1127.51, 7)	9288	(1127.23, 7)	9307	(1123.87, 7)	9157	(1120.73, 7)	10365	(1110.18, 7)	8455	
(114665, 7)	(427.32, 67)	112690	(422.54, 67)	103925	(424.45, 67)	114042	(426.53, 67)	100195	(423.13, 70)	100527	(421.13, 70)	111880	
(36129, 7)	(225.70, 68)	34073	(222.53, 69)	34068	(224.76, 69)	31153	(223.41, 69)	26208	(226.42, 72)	22860	(224.84, 73)	28704	
(409.36, 57)	(413.75, 57)	218347	(409.35, 57)	222479	(410.44, 58)	218259	(410.24, 59)	197119	(414.29, 62)	223414	(412.59, 63)	219183	
(1140.28, 7)	(1144.08, 7)	13166	(1140.31, 7)	12277	(1141.82, 7)	11957	(1139.91, 7)	9263	(1139.79, 7)	6959	(1130.61, 7)	8465	
(604.79, 68)	(607.90, 67)	11788	(604.69, 67)	10532	(606.19, 67)	10269	(605.19, 68)	8962	(606.46, 70)	7030	(604.95, 70)	8971	
(140.95, 70)	(145.35, 69)	46981	(144.99, 68)	65991	(147.64, 69)	62250	(146.52, 69)	53805	(149.93, 72)	47662	(136.33, 74)	74837	
(788.95, 66)	(790.57, 66)	93461	(789.53, 66)	90260	(789.46, 66)	89679	(788.12, 66)	75636	(794.87, 67)	128027	(792.06, 67)	146918	
(1103.42, 7)	(1105.45, 7)	27260	(1102.64, 7)	25653	(1103.79, 7)	25151	(1101.66, 7)	23175	(1101.02, 7)	22697	(1096.66, 7)	24038	
(584.95, 65)	(579.50, 64)	195785	(576.42, 64)	187443	(577.38, 65)	186759	(574.88, 65)	155832	(576.34, 67)	170334	(574.47, 68)	190031	
(346.80, 67)	(349.26, 67)	84665	(339.30, 67)	91771	(344.59, 68)	94123	(344.76, 67)	77649	(347.01, 70)	75076	(345.02, 71)	79129	
(652.40, 66)	(654.82, 66)	46031	(651.71, 66)	44168	(653.35, 66)	40059	(652.36, 66)	35562	(652.23, 68)	39419	(649.66, 69)	40205	
(444.43, 67)	(448.41, 66)	43176	(445.39, 66)	40628	(447.08, 67)	36280	(446.28, 67)	30968	(448.66, 69)	36480	(447.25, 69)	37206	
(477.02, 61)	(484.47, 61)	6552	(480.36, 61)	6272	(481.20, 62)	6099	(480.92, 62)	4760	(486.25, 65)	6518	(486.99, 66)	6195	
(408.35, 66)	(415.85, 65)	47047	(411.87, 65)	46408	(412.79, 66)	41627	(412.93, 66)	33875	(416.59, 69)	43465	(416.03, 69)	44383	
(116.65, 69)	(110.70, 67)	155163	(106.40, 67)	196313	(107.40, 66)	373056	(112.50, 65)	865796	(124.71, 67)	2116291	(127.06, 68)	3108309	
(1120.96, 7)	(1102.75, 6)	57396	(1092.98, 6)	44501	(1089.77, 6)	36886	(1084.53, 6)	32658	(1079.44, 7)	34079	(1073.41, 7)	32112	
(339.97, 67)	(346.69, 67)	85994	(342.74, 66)	77715	(344.98, 68)	81513	(346.96, 68)	73246	(341.02, 70)	95568	(338.89, 70)	97728	
(1056.30, 6)	(1059.07, 6)	59739	(1056.90, 6)	61502	(1057.62, 7)	59998	(1045.18, 7)	86638	(1055.36, 7)	63496	(1053.87, 7)	61976	
(907.57, 61)	(912.69, 63)	62617	(892.82, 63)	112054	(895.62, 64)	103232	(891.70, 65)	109565	(879.78, 66)	99383	(874.06, 66)	90958	
(398.61, 67)	(402.87, 66)	5311	(399.49, 66)	5767	(401.29, 67)	5858	(400.62, 67)	6332	(403.46, 70)	6822	(402.74, 70)	6924	
(1004.98, 6)	(1011.59, 6)	337573	(1007.20, 6)	341440	(1010.71, 6)	372778	(1007.74, 6)	390278	(1004.44, 6)	410236	(995.66, 68)	470141	
(232.22, 67)	(238.58, 67)	95403	(233.41, 67)	93322	(235.71, 69)	95882	(234.97, 68)	97110	(239.65, 71)	89670	(237.96, 72)	90205	
(150.69, 70)	(153.68, 69)	16444	(149.72, 69)	14716	(152.09, 71)	14887	(150.48, 70)	14528	(153.86, 73)	14312	(151.73, 74)	14665	

Centroid_d	Volume_d9	Centroid_d	Volume_d1	Centroid_d	Volume_d2								
(11506, 7)	(1132.88, 7)	10743	(1127.51, 7)	9288	(1127.23, 7)	9307	(1123.87, 7)	9157	(1120.73, 7)	10365	(1110.18, 7)	8455	
(114665, 7)	(427.32, 67)	112690	(422.54, 67)	103925	(424.45, 67)	114042	(426.53, 67)	100195	(423.13, 70)	100527	(421.13, 70)	111880	
(36129, 7)	(225.70, 68)	34073	(222.53, 69)	34068	(224.76, 69)	31153	(223.41, 69)	26208	(226.42, 72)	22860	(224.84, 73)	28704	
(409.36, 57)	(413.75, 57)	218347	(409.35, 57)	222479	(410.44, 58)	218259	(410.24, 59)	197119	(414.29, 62)	223414	(412.59, 63)	219183	
(1140.28, 7)	(1144.08, 7)	13166	(1140.31, 7)	12277	(1141.82, 7)	11957	(1139.91, 7)	9263	(1139.79, 7)	6959	(1130.61, 7)	8465	
(604.79, 68)	(607.90, 67)	11788	(604.69, 67)	10532	(606.19, 67)	10269	(605.19, 68)	8962	(606.46, 70)	7030	(604.95, 70)	8971	
(140.95, 70)	(145.35, 69)	46981	(144.99, 68)	65991	(147.64, 69)	62250	(146.52, 69)	53805	(149.93, 72)	47662	(136.33, 74)	74837	
(788.95, 66)	(790.57, 66)	93461	(789.53, 66)	90260	(789.46, 66)	89679	(788.12, 66)	75636	(794.87, 67)	128027	(792.06, 67)	146918	
(1103.42, 7)	(1105.45, 7)	27260	(1102.64, 7)	25653	(1103.79, 7)	25151	(1101.66, 7)	23175	(1101.02, 7)	22697	(1096.66, 7)	24038	
(584.95, 65)	(579.50, 64)	149482	(576.42, 64)	140579.66	(577.38, 65)	140066.67	(574.88, 65)	116871.84	(576.34, 67)	127748.14	(574.47, 68)	142520.62	
(346.80, 67)	(349.26, 67)	84665	(339.30, 67)	91771	(344.59, 68)	94123	(344.76, 67)	77649	(347.01, 70)	75076	(345.02, 71)	79129	
(652.40, 66)	(654.82, 66)	46984	(651.71, 66)	44168	(653.35, 66)	40059	(652.36, 66)	35562	(652.23, 68)	39419	(649.66, 69)	40205	
(444.43, 67)	(448.41, 66)	43176	(445.39, 66)	40628	(447.08, 67)	36280	(446.28, 67)	30968	(448.66, 69)	36480	(447.25, 69)	37206	
(477.02, 61)	(484.47, 61)	6552	(480.36, 61)	6272	(481.20, 62)	6099	(480.92, 62)	4760	(486.25, 65)	6518	(486.99, 66)	6195	
(408.35, 66)	(415.85, 65)	47047	(411.87, 65)	46408	(412.79, 66)	41627	(412.93, 66)	33875	(416.59, 69)	43465	(416.03, 69)	44383	
(116.65, 69)	(110.70, 67)	155163	(106.40, 67)	196313	(107.40, 66)	373056	(112.50, 65)	865796	(124.71, 67)	2116291	(127.06, 68)	3108309	
(1120.96, 7)	(1102.75, 6)	46037	(1092.98, 6)	35693.994	(1089.77, 6)	29586.047	(1084.53, 6)	26194.793	(1079.44, 7)	27334.569	(1073.41, 7)	25756.849	
(339.97, 67)	(346.69, 67)	85994	(342.74, 66)	77715	(344.98, 68)	81513	(346.96, 68)	73246	(341.02, 70)	95568	(338.89, 70)	97728	
(1056.30, 6)	(1059.07, 6)	59739	(1056.90, 6)	61502	(1057.62, 7)	59998	(1045.18, 7)	86638	(1055.36, 7)	63496	(1053.87, 7)	61976	
(907.57, 61)	(912.69, 63)	62617	(892.82, 63)	112054	(895.62, 64)	103232	(891.70, 65)	97028	(879.78, 66)	88011.077	(874.06, 66)	80550.110	
(398.61, 67)	(402.87, 66)	5311	(399.49, 66)	5767	(401.29, 67)	5858	(400.62, 67)	6332	(403.46, 70)	6822	(402.74, 70)	6924	
(1004.98, 6)	(1011.59, 6)	300325.75	(1007.20, 6)	303766.07	(1010.71, 6)	346985	(1007.74, 6)	363274.15	(1004.44, 6)	381851.23	(995.66, 68)	437611.32	
(232.22, 67)	(238.58, 67)	95403	(233.41, 67)	93322	(235.71, 69)	95882	(234.97, 68)	97110	(239.65, 71)	89670	(237.96, 72)	90205	
(150.69, 70)	(153.68, 69)	16444	(149.72, 69)	14716	(152.09, 71)	14887	(150.48, 70)	14528	(153.86, 73)	14312	(151.73, 74)	14665	

**Figura 3.6:** Esempio della correzione dei volumi degli organoidi coinvolti in fusioni evidenziati in verde. (A) Tabella prima della correzione e (B) tabella dopo la correzione. Campione *pl\_w6*

# Capitolo 4

## Risultati

In questo capitolo sono esaminati i risultati ottenuti al termine del processo di tracking. In particolare, la valutazione del tracking è svolta per mezzo dei grafici generati dal codice denominato 'main\_TreatedUntreated'. Questo codice analizza i dati provenienti dal tracking e produce grafici e tabelle per la comparazione dell'andamento della crescita volumetrica dei campioni Treated con quelli dei campioni Untreated.

Per comprendere in modo più approfondito l'impatto dell'ottimizzazione sulle prestazioni dell'algorithm, l'analisi dei risultati sarà condotta confrontando i dati ottenuti mediante l'uso della nuova pipeline con quelli derivanti dall'impiego di una pipeline priva delle fasi di *watershed* e *zero padding*.

### 4.2 Numero di organoidi completamente tracciati

L'obiettivo principale dell'ottimizzazione applicata alla pipeline originale era quello di renderla capace di rilevare in modo continuativo, durante tutti i giorni di acquisizione, il maggior numero possibile di organoidi. Tale risultato è fondamentale per consentire lo studio della crescita e dell'evoluzione degli organoidi, con particolare attenzione all'identificazione, tra questi, di quelli classificabili come DTP.

Nella tabella seguente è possibile notare la differenza nella quantità di organoidi completamente tracciati nella nuova pipeline e nella pipeline senza pre-processing.

Campione	Numero FT senza preprocessing	Numero FT con nuova pipeline	Aumento percentuale
p1_w6	17	24	41.18 %
p1_w7	19	30	57.89 %
p1_w8	27	32	18.52 %
w4	26	46	76.92 %
w5	1	50	4900 %
w7	4	10	150 %
w8	40	63	57.5 %

**Tabella 4.1:** Confronto e aumento percentuale del totale di FT rilevati con la pipeline preesistente e con la nuova pipeline di tracking

Dalla tabella emerge chiaramente l'impatto positivo della nuova pipeline: il numero di organoidi completamente tracciati risulta raddoppiato nella quasi totalità dei campioni analizzati. Particolarmente significativo è l'incremento osservato nel numero di organoidi FT nel campione *w5*, dove, rispetto al singolo organoide precedentemente rilevato, si registrano ora 50 organoidi.

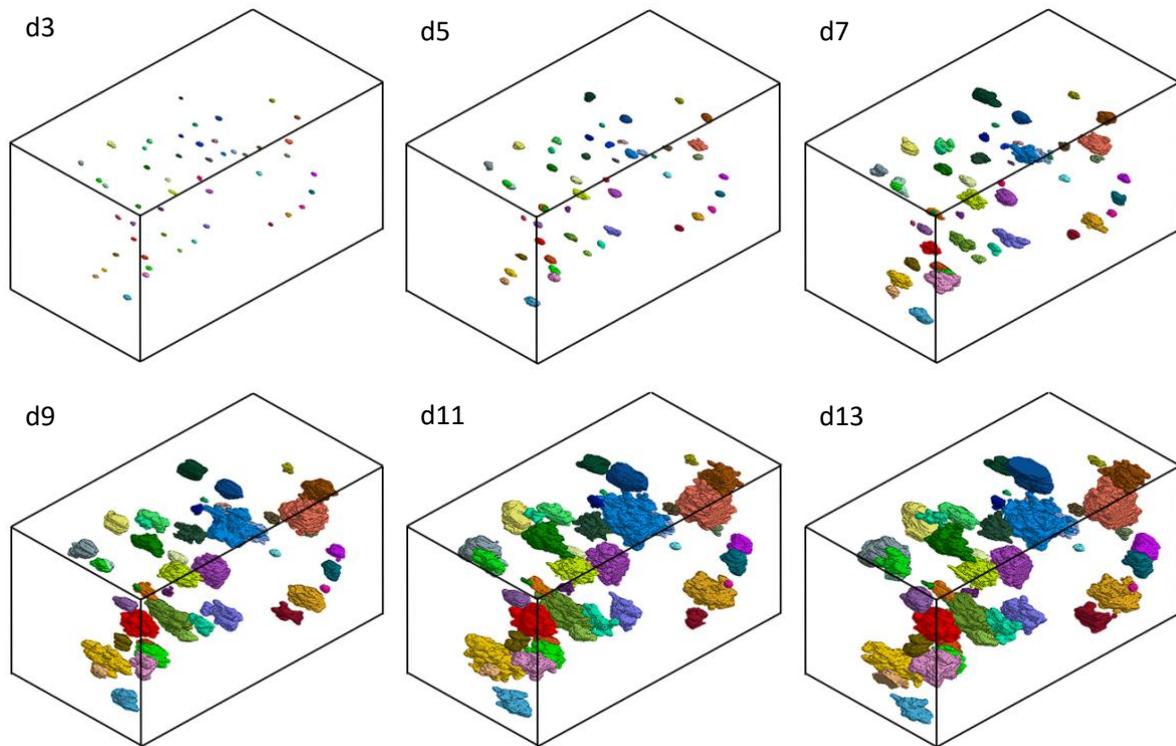
## 4.2 Visualizzazione 3D degli organoidi rilevati

Ottenuti i risultati restituiti dall'algoritmo di tracking, si è passati alla visualizzazione 3D degli organoidi tracciati tramite l'utilizzo dell'applicazione *volume Viewer* di MATLAB. Questa procedura permette di valutare in maniera visiva e oggettiva l'accuratezza del tracking di ogni organoide.

La rappresentazione tridimensionale è ottenuta a partire dalle tabelle contenenti i centroidi degli organoidi rilevati e l'ID univoco associato ad ogni organoide. Questa rappresentazione permette di seguire l'evoluzione degli organoidi nel tempo. Si può, infatti, osservare l'evoluzione di ogni organoide osservandone il colore associato al suo ID nei vari volumi.

La figura 4.1 mostra la rappresentazione 3D degli organoidi completamente tracciati nel volume *w5* (riferita all'esecuzione utilizzando la nuova pipeline).

Dalla visualizzazione 3D, è possibile osservare che l'algoritmo di tracking è in grado di rilevare e seguire la crescita degli organoidi in modo progressivo e accurato nel tempo. L'algoritmo mostra chiaramente l'evoluzione degli organoidi da piccoli cluster (nei giorni iniziali, come *d3* e *d5*) a volumi più grandi e complessi (giorni successivi, come *d11* e *d13*). Questo indica che l'algoritmo è in grado di mantenere il tracciamento degli stessi organoidi nel tempo, riconoscendo e collegando le loro posizioni e dimensioni crescenti nonostante anche la significativa variazione morfologica che gli organoidi subiscono nel tempo.



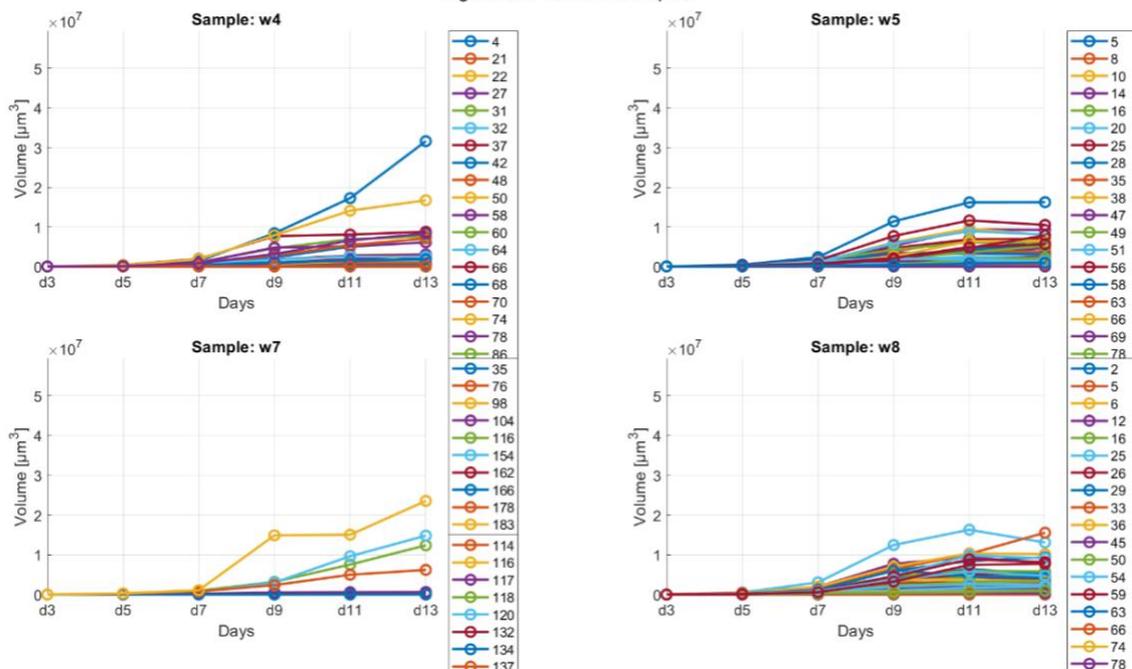
**Figura 4.1:** Rappresentazione 3D dell'evoluzione degli organoidi FT del campione *w5*

### 4.3 Andamento della crescita degli organoidi

La valutazione dell'andamento di crescita dei singoli organoidi per ciascun campione riveste particolare importanza, poiché consente di ottenere una stima accurata delle dimensioni degli organoidi rilevati. In particolare, attraverso questi grafici è possibile individuare la presenza di incrementi improvvisi nel volume di specifici organoidi.

Si comincia con l'analisi del grafico contenente gli organoidi relativi ai campioni considerati Untreated, nella seguente Figura 4.2:

Figure 3.2 - Control Samples

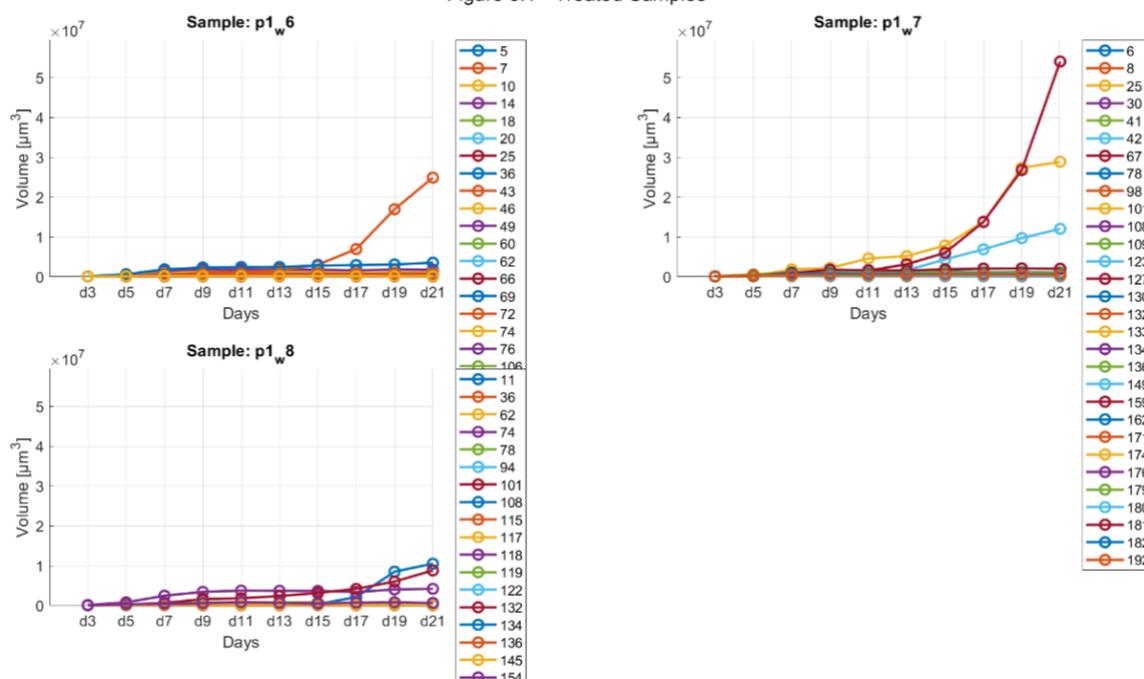


**Figura 4.2:** Andamento del volume dei singoli organoidi dei campioni Untreated nel tempo. Grafico prodotto utilizzando i dati ottenuti dalla pipeline di tracking ottimizzata

Nella Figura 4.2 sono riportati quattro grafici relativi ai campioni *Untreated*: w4, w5, w7 e w8. In ciascun grafico viene illustrato l'andamento temporale del volume degli organoidi identificati all'interno di ogni campione. Ogni organoide è rappresentato da un colore distinto, corrispondente a un ID univoco.

L'andamento dei grafici risulta simile tra i quattro campioni, mostrando una crescita progressiva fino al picco massimo registrato nell'ultimo giorno di acquisizione (d13). I volumi massimi rilevati nella maggior parte degli organoidi oscillano tra un minimo di  $1e+07 \mu\text{m}^3$  e un massimo di  $3e+07 \mu\text{m}^3$ . Una caratteristica comune degli organoidi analizzati è l'andamento di crescita uniforme, che appare coerente per tutti gli organoidi appartenenti a uno stesso campione. Tale comportamento non si riscontra, tuttavia, negli organoidi relativi ai campioni appartenenti al gruppo *Treated*.

Figure 3.1 - Treated Samples



**Figura 4.3:** Andamento del volume dei singoli organoidi dei campioni Treated nel tempo. Grafico prodotto utilizzando i dati ottenuti dalla pipeline di tracking ottimizzata

Nella Figura 4.3 sono illustrati i grafici relativi agli organoidi appartenenti ai campioni *Treated*: p1\_w6, p1\_w7 e p1\_w8. A differenza dei campioni del gruppo *Untreated* precedentemente analizzati, qui l'andamento del volume degli organoidi si presenta eterogeneo. Non tutti gli organoidi seguono una crescita uniforme: alcuni mostrano un incremento di volume significativo, evidenziando un'espansione più rapida rispetto agli altri. In particolare, nel campione p1\_w7 si osservano organoidi con un'accelerazione della crescita del volume molto marcata a partire dal giorno d15, raggiungendo picchi superiori a  $5 \times 10^7 \mu\text{m}^3$  entro il giorno d21. Anche nel campione p1\_w6 emergono organoidi con una crescita più rapida dopo il giorno d15, benché i valori massimi restino inferiori rispetto a quelli di p1\_w7. Il campione p1\_w8, invece, evidenzia un aumento di volume per due organoidi sebbene più moderati rispetto a quello osservato negli altri due campioni, con differenze meno pronunciate tra gli organoidi.

Questi risultati indicano che il trattamento influisce sulla variabilità del tasso di crescita, portando alcuni organoidi a svilupparsi in modo molto più rapido rispetto ad altri all'interno dello stesso campione.

## 4.4 Cellule DTP

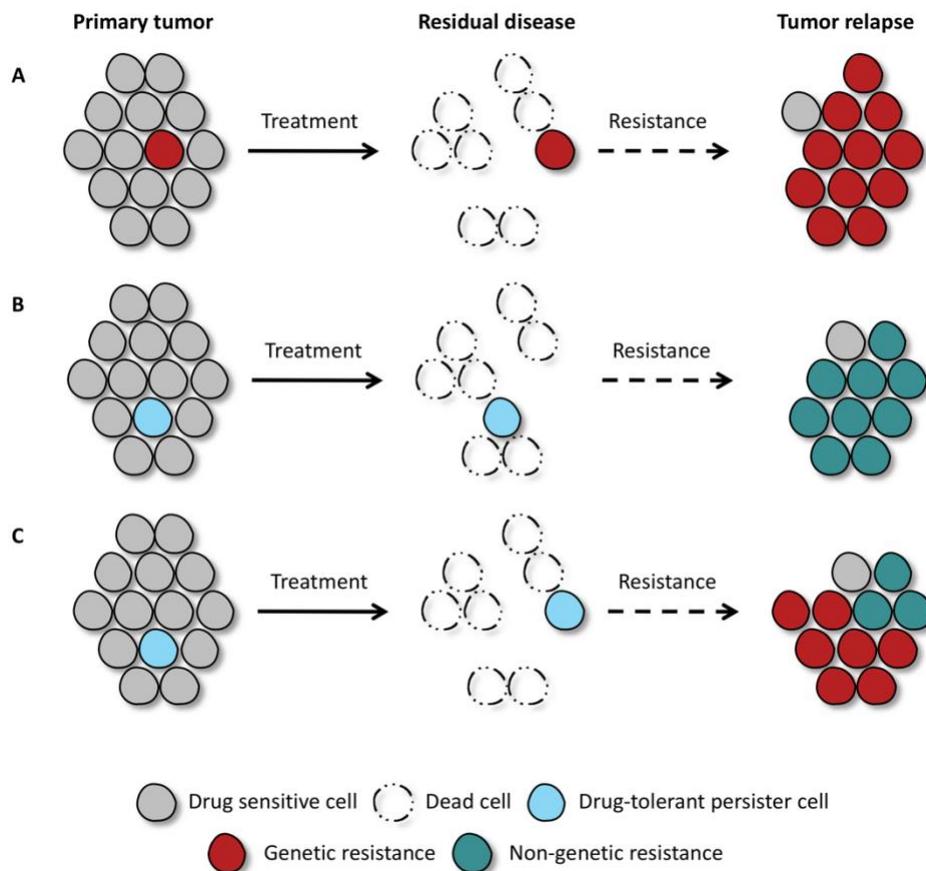
Il comportamento degli organoidi anomali mostrato nella Figura 4.6 corrisponde precisamente a quello tipico degli organoidi DTP (*Drug-Tolerant Persisters*) che si intendeva identificare attraverso questo studio.

Le cellule tolleranti ai farmaci, note come DTP (*Drug-Tolerant Persisters*), costituiscono una rara sottopopolazione di cellule tumorali capace di sopravvivere alla terapia tramite meccanismi di adattamento non genetici. Queste cellule possono contribuire alla ricomparsa e alla ripopolazione del tumore al termine del trattamento farmacologico. [5]



**Figura 4.4:** Schema illustrativo dell'evoluzione delle cellule DTP

I meccanismi di adattamento alla resistenza farmacologica possono essere, infatti, di natura sia genetica che non genetica. In presenza di una terapia farmacologica, le cellule tumorali rispondono al trattamento, ma una sottopopolazione di cellule maligne riesce a sopravvivere. Questo fenomeno può essere attribuito a specifiche mutazioni genetiche presenti in alcune cellule, le quali conferiscono una resistenza intrinseca al trattamento mirato e favoriscono la ricrescita del tumore. In alternativa, in assenza di tali mutazioni genetiche, alcune cellule, denominate DTP (*Drug-Tolerant Persisters*), presentano una tolleranza elevata al farmaco che consente loro di sopravvivere alla terapia e, potenzialmente, di indurre una recidiva tumorale. A partire da una popolazione di cellule DTP possono poi però emergere diversi meccanismi di resistenza, sia genetici sia non genetici, che contribuiscono alla ripresa della crescita tumorale. [6]



**Figura 4.5:** Diversi meccanismi di resistenza farmacologica. (A) Meccanismo genetico, (B) Meccanismo non genetico tipico delle cellule DTP, (C) Nascita di meccanismi genetici e non genetici a partire da popolazione di cellule DTP

È pertanto di fondamentale importanza individuare la presenza o l'assenza delle cellule DTP nel dataset analizzato, con l'obiettivo di sviluppare nuove strategie farmacologiche capaci di superare la tolleranza ai trattamenti.

La nuova pipeline sviluppata include la ricerca e l'identificazione degli organoidi DTP all'interno dei campioni Treated tracciati integralmente durante la fase di tracking. La presenza degli organoidi DTP è stata già confermata dai grafici precedenti: nell'analisi dell'andamento dei singoli organoidi, gli organoidi DTP evidenziano un trend di crescita significativamente più rapido e distante rispetto a quello degli altri organoidi. Questa ultima parte, quindi, fornisce solo una conferma alle ipotesi prima citate.

Per l'individuazione degli organoidi DTP, il codice applica una soglia volumetrica con cui confronta il volume di ciascun organoide rilevato al giorno d21: se il volume è pari o superiore a tale soglia, l'organoide viene classificato come DTP. Infine, viene generato un elenco completo degli organoidi DTP identificati, presentato in formato tabellare su Excel. Nel caso in esame la soglia è stata posta pari a  $8e+05$  voxel (pari a circa  $6e+06 \mu m^3$ ).

Sample	Numero DTP nuova pipeline	Numero DTP pipeline preesistente
p1_w6	1	1
p1_w7	3	-
p1_w8	2	2

**Tabella 4.2:** Numero di organoidi DTP rilevati con e senza la nuova pipeline

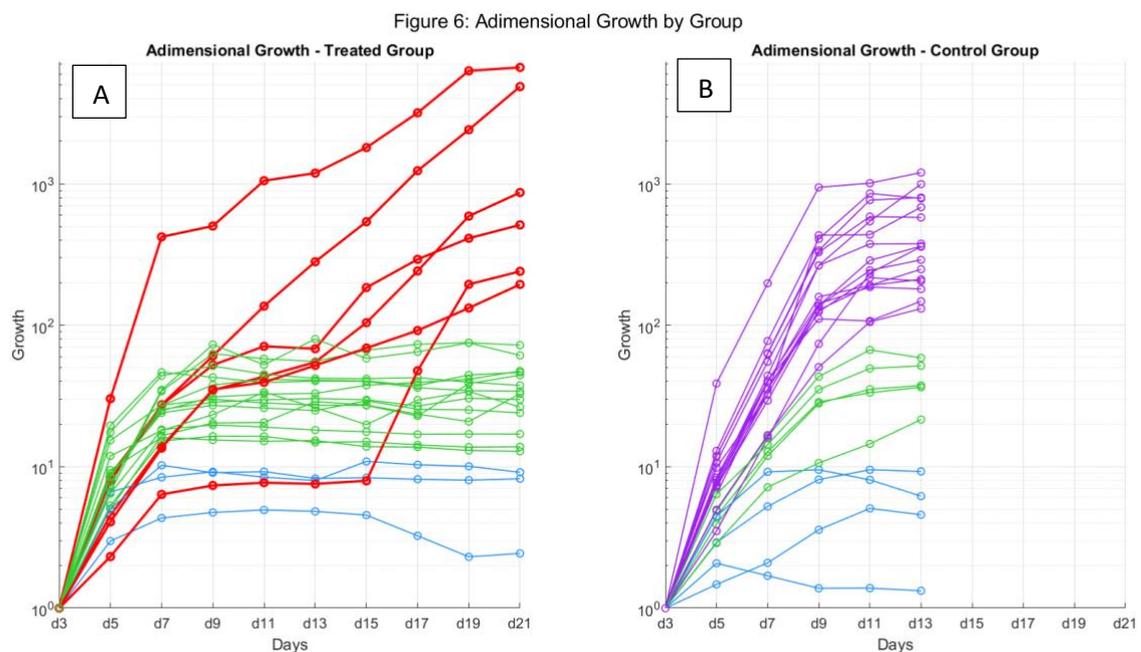
La Tabella 4.4 evidenzia come l'implementazione della nuova pipeline abbia consentito di individuare organoidi DTP anche nel campione p1\_w7, precedentemente privo di tali organoidi quando analizzato con la pipeline senza Watershed transform e zero padding. Tuttavia, la quantità complessiva di organoidi rilevata, sebbene incrementata, risulta ancora insufficiente e insoddisfacente. Tale limitazione è attribuibile alla tendenza degli organoidi, negli ultimi giorni di acquisizione, a fondersi tra loro, complicando notevolmente il loro tracciamento da parte dell'algoritmo. Questa fusione determina infatti un notevole spostamento delle coordinate del centroide, che viene quindi scartato come possibile corrispondenza.

#### 4.4.1 Trend normalizzati di crescita degli organoidi

Per approfondire il comportamento degli organoidi identificati come DTP, è stata analizzata la crescita di ciascun organoide rispetto al primo giorno di acquisizione. A tal fine, il volume di ogni organoide in ciascun giorno di acquisizione è stato normalizzato dividendo il valore per il volume registrato al giorno d3. Questa metrica consente di

valutare l'entità della crescita di ciascun organoide rispetto alla dimensione iniziale osservata al primo giorno di acquisizione.

Per garantire una maggiore chiarezza nel grafico, si è scelto di rappresentare, per ciascun campione, circa sei organoidi significativi: approssimativamente due caratterizzati da una crescita molto rapida, due con una crescita media e due con una crescita quasi statica. Inoltre, per i campioni classificati come *Treated*, sono stati inclusi nel grafico anche gli organoidi identificati come DTP.



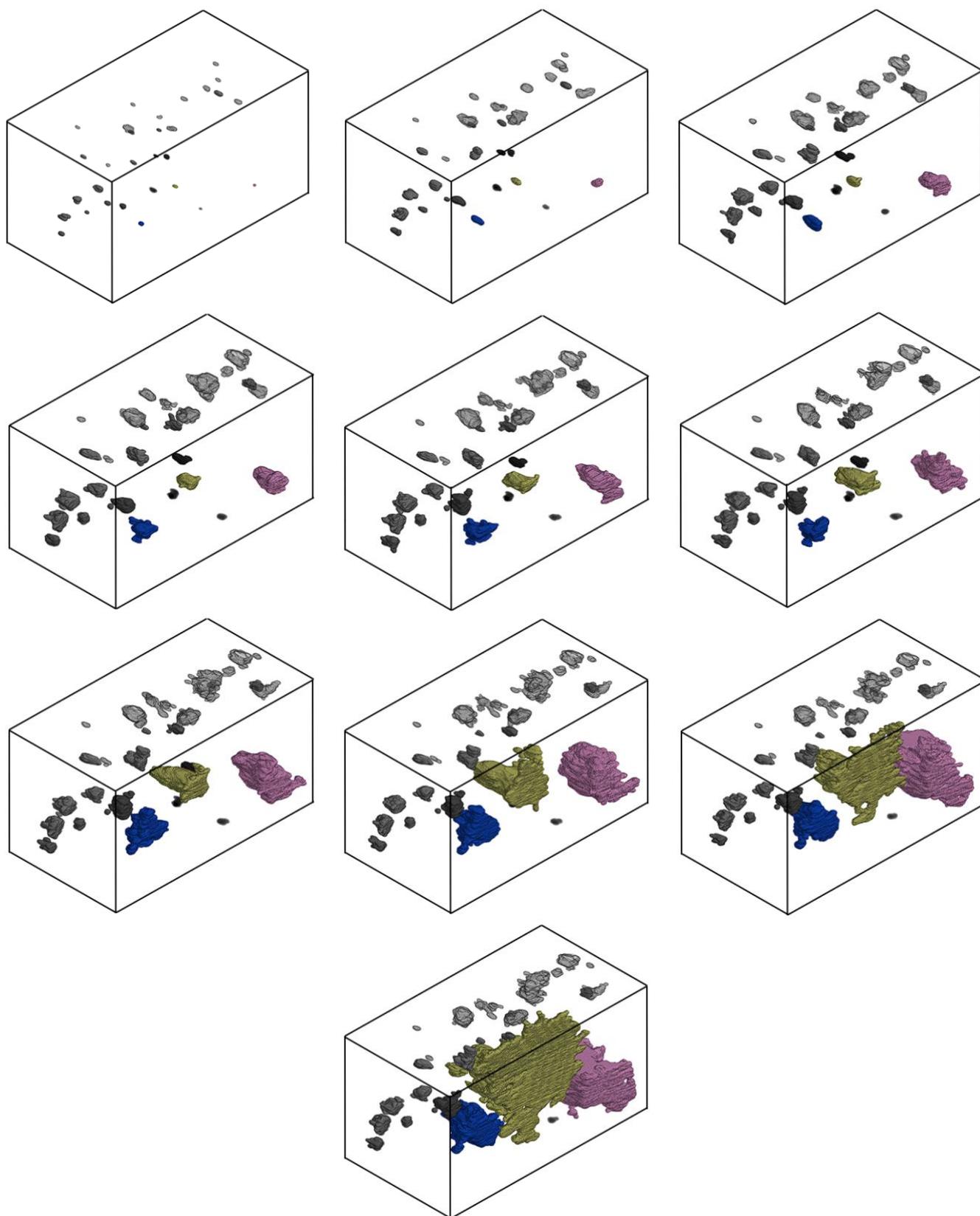
**Figura 4.6:** Crescita degli organoidi normalizzata rispetto alla dimensione al giorno d3. Campioni Treated in (A) e campioni Untreated in (B)

Il grafico utilizza una scala logaritmica sull'asse delle ordinate per facilitare l'interpretazione dei dati. I diversi trend di crescita degli organoidi sono evidenziati mediante una codifica cromatica: in azzurro sono rappresentati gli organoidi con trend di crescita molto lenti, mentre in verde quelli con crescita media. Nel grafico A, relativo ai campioni *Treated*, gli organoidi identificati come DTP sono evidenziati in rosso. Un aspetto immediatamente osservabile è che, indipendentemente dal colore (verde o azzurro), la crescita della maggior parte degli organoidi non-DTP tende ad arrestarsi dopo

il giorno d7, mentre quella degli organoidi DTP mostra un incremento significativo nel tempo. Il grafico B, che rappresenta la crescita normalizzata degli organoidi appartenenti ai campioni del gruppo di controllo, evidenzia in viola gli organoidi con una crescita significativa. Nei campioni *Untreated*, a differenza di quanto osservato nei campioni *Treated*, si rileva una crescita volumetrica continua e costante. La maggior parte degli organoidi si colloca nella categoria evidenziata in viola, superando, in soli 13 giorni, il volume della maggior parte degli organoidi appartenenti al gruppo *Treated*.

La Figura 4.7 seguente illustra l'evoluzione e la crescita dei tre organoidi identificati come DTP nel campione p1\_w7 e fornisce una conferma delle ipotesi formulate in precedenza. In particolare, tale figura evidenzia come i tre organoidi DTP presentino, inizialmente, un tasso di crescita paragonabile a quello degli altri organoidi, per poi manifestare una rapida accelerazione nell'aumento di volume a partire dal giorno d17, mentre il resto degli organoidi mantiene dimensioni pressoché invariate.

Considerato che il trattamento farmacologico è stato somministrato nell'intervallo temporale compreso tra il giorno d5 e il giorno d7, gli organoidi non-DTP interrompono la propria crescita al raggiungimento delle dimensioni acquisite in risposta al farmaco, ossia tra i giorni d7 e d9, stabilizzandosi successivamente senza variazioni significative. Tale comportamento risulta in netto contrasto rispetto a quello osservato negli organoidi DTP.



**Figura 4.7:** Evoluzione e crescita di tre organoidi DTP (rosa, giallo e blu) dal giorno d3 al giorno d21 nel sample *p1\_w7*.

## Capitolo 5

### Algoritmo di tracking: versione lite

La pipeline descritta in precedenza, come illustrato nel Capitolo 2, prevede l'utilizzo di volumi di dimensioni considerevoli: un singolo campione occupa ben 8,7 GB di memoria, con quasi 1 GB per volume. Tali dimensioni rendono impraticabile l'esecuzione di questa analisi senza un dispositivo dotato di almeno 16 GB di RAM.

Per risolvere questo problema, è stata sviluppata una versione ottimizzata del codice, al fine di consentirne l'utilizzo anche su dispositivi con risorse limitate. A tal fine, i volumi analizzati sono stati ridimensionati, dimezzandone le dimensioni lungo gli assi X e Y. Grazie a questa variazione di dimensione i campioni hanno un peso di circa 2 GB (circa 200 MB per volume), molto ridotto rispetto a quelli originali.

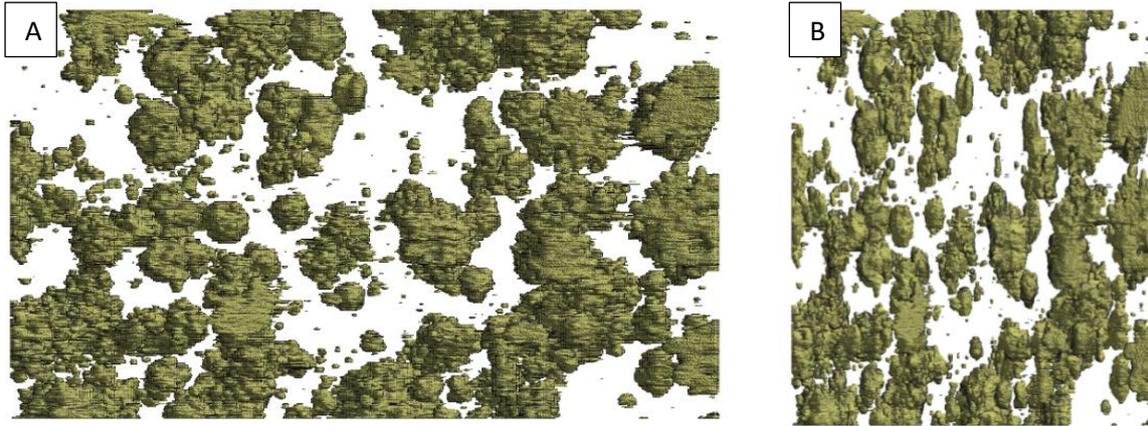
Di seguito sono mostrate le nuove dimensioni dei campioni:

Sample	Label	Size
p1_w6	Treated	400x600x698
p1_w7	Treated	440x600x698
p1_w8	Treated	415x600x698
w4	Untreated	429x600x698
w5	Untreated	406x600x698
w7	Untreated	420x600x698
w8	Untreated	425x600x698

**Tabella 5.1:** Dimensioni dei campioni ridotti

Poiché la dimensione Z è rimasta invariata, i volumi risultano ora più stretti e allungati lungo l'asse Z, causando una distorsione degli organoidi.

L'adozione di volumi dalle dimensioni dimezzate ha reso indispensabile la creazione di una versione del codice che utilizzasse parametri anch'essi ridotti. Sebbene la pipeline sia rimasta invariata, alcuni parametri sono stati modificati. Nei paragrafi successivi verranno analizzate nel dettaglio le modifiche apportate.



**Figura 5.1:** Esempio della distorsione degli organoidi causata dalla riduzione delle dimensioni dei volumi. (A) dimensioni originali e (B) dimensioni ridotte. Vista del piano XZ del campione *w8* al giorno 13.

## 5.1 I parametri modificati

Come precedentemente menzionato, l'uso di volumi ridotti comporta la necessità di variare alcuni parametri e soglie impostati in precedenza. Questo è dovuto alla distorsione dei volumi, che ha portato a un rimpicciolimento degli organoidi.

Ripercorrendo la pipeline descritta finora, si può affermare che le principali modifiche apportate per eseguire il codice utilizzando questi volumi ridotti riguardano la fase di preprocessing e dell'algoritmo di tracking:

### *Preprocessing*

- **Trasformata Watershed:** con la riduzione del volume degli organoidi, è stato necessario sviluppare un nuovo codice, leggermente modificato, per applicare la trasformata Watershed. La modifica principale riguarda la determinazione della soglia per la funzione *imextendedmin*.

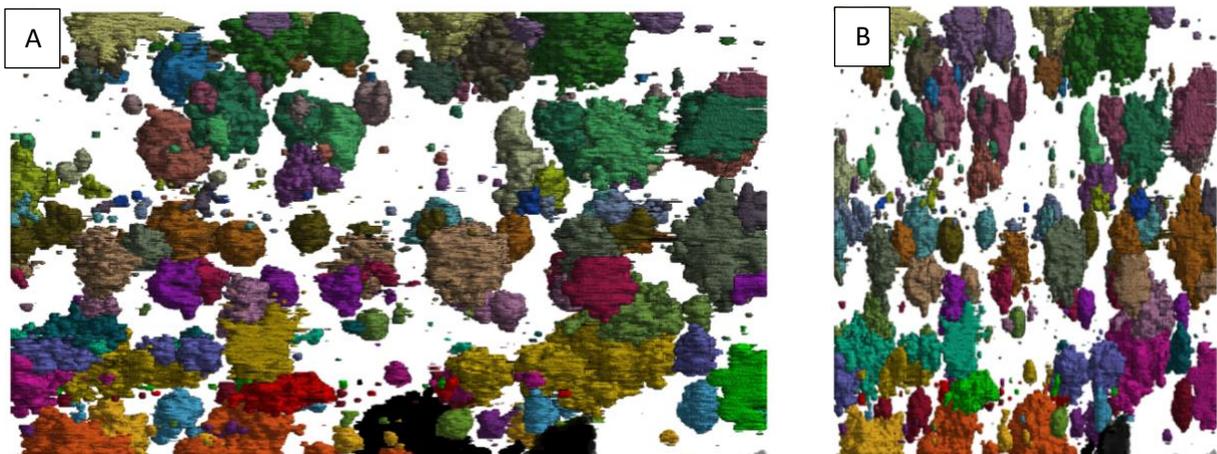
Nel metodo precedente, la soglia era variabile e dipendente dal giorno di acquisizione di ciascun volume. Nello specifico, se il giorno (*day*) estratto dal nome del file risultava maggiore di 13, si assegnava una soglia dinamica alla funzione *imextendedmin*, calcolata come  $\text{day} - 10$ . Ad esempio, per un volume identificato come *p1\_w7\_d17*, la soglia *h* assumeva il valore di 7. In caso contrario, si utilizzava una soglia fissa pari a 3.

Con i nuovi volumi, in cui gli organoidi risultano ulteriormente ridotti, sono stati stabiliti nuovi criteri di assegnazione della soglia  $h$  sulla base di diverse prove sperimentali. In particolare:

- Se il giorno (day) è maggiore di 17, la soglia  $h$  è calcolata come  $\text{day} - 14$ .
- Se il giorno è compreso tra 13 e 17 inclusi, la soglia  $h$  assume il valore di  $\text{day} - 10$ .
- Se il giorno è inferiore o uguale a 13, viene impostata una soglia fissa di 3.

Analogamente al metodo descritto in precedenza, la funzione *imextendedmin* è applicata, con la soglia determinata, alla *distance transform* precedentemente ottenuta, con lo scopo di identificare le posizioni che saranno successivamente trattate come marcatori per la segmentazione. Infine, mediante la funzione *imposemin*, è possibile calcolare la Watershed trasform. Nell'appendice E è possibile visionare la porzione di codice per l'esecuzione della Watershed modificata appena descritta.

Queste modifiche apportate hanno lo scopo di generare un risultato della Watershed il più possibile comparabile a quello ottenuto utilizzando i volumi con dimensioni originali. I risultati ottenuti appaiono vicini a quelli voluti, nonostante alcune piccole differenze.



**Figura 5.2:** Confronto tra i risultati del processo di Watershed sui volumi ridotti (B) e su quelli di dimensioni originali (A).

- Zero-padding: la procedura di applicazione dello zero-padding segue le stesse modalità adottate per i volumi nelle loro dimensioni originarie. Anche in questo

caso, i volumi appartenenti ai diversi campioni vengono uniformati alle dimensioni del volume di dimensione massima. Poiché la riduzione delle dimensioni dei volumi originali è stata effettuata automaticamente, le discrepanze dimensionali inizialmente presenti tra i volumi dei campioni *p1\_w6* e *w5* sono state preservate.

Day	Size w5	Size p1_w6
d3	420x600x698	400x600x698
d5	406x600x698	400x600x698
d7	406x600x698	400x600x697
d9	406x600x698	400x600x698
d11	406x600x698	400x600x698
d13	406x600x698	400x600x698
d15	-	400x600x698
d17	-	400x600x698
d19	-	400x600x698
d21	-	400x600x698

**Tabella 5.2:** Dimensioni dei volumi appartenenti ai campioni *w5* e *p1\_w6*

Anche in questo caso, l'applicazione dello zero-padding ha consentito di uniformare tutti i volumi del campione *w5* alle dimensioni di 420x600x698 e quelli del campione *p1\_w6* alle dimensioni di 400x600x698.

- Erosione, dilatazione e hole filling: la fase di applicazione degli operatori morfologici è stata mantenuta invariata, conservando l'elemento strutturale sferico di raggio tre, come nel caso precedente, e seguendo la procedura illustrata nel Paragrafo 3.1.3.

#### *Algoritmo di tracking*

I volumi ottenuti dalla fase di preprocessing vengono sottoposti a una fase di conversione in cui sono trasformati in formato logical, assegnando il valore 1 a tutti i voxel appartenenti a un organoide e il valore 0 a quelli dello sfondo. A questo punto, i volumi risultanti sono pronti per essere utilizzati nel codice di tracciamento.

L'impiego di volumi ridotti ha reso necessarie alcune modifiche nella configurazione di specifici parametri dell'algoritmo di tracking. La riduzione delle dimensioni dei volumi,

infatti, ha comportato un rimpicciolimento degli organoidi, rendendo necessaria la revisione di gran parte delle soglie relative a diametri e dimensioni.

'ref_index'	"ref_index_range"
'Approach'	"a"
<b>'minDiameter'</b>	<b>5</b>
'matchingCriteria'	1
'centroidType'	"Centroid"
'useCentroidDistance'	True
'centroidWeight'	1
'useVolumeDifference'	True
'usePropertyDifference'	False
'diceWeight'	1
'useIoUScore'	True
'useBoundingBox'	False
'iouWeight'	1
'postprocessing'	True
<b>'spatialConfidenceRadius'</b>	<b>30</b>
'volumeTolerance'	[0.2 0.3]
'probabilityThreshold'	0.75
<b>'PixelSizeXY'</b>	<b>5.04</b>
'PixelSizeZ'	1.26

**Tabella 5.3:** Elenco dei parametri nel codice di tracking riferito ai volumi ridotti. in grassetto i parametri riguardanti diametri e dimensioni che sono stati variati.

Pressochè tutti i parametri sono rimasti invariati ad eccezione dei seguenti:

- **'minDiameter'**: il valore minimo del diametro utilizzato per identificare un oggetto segmentato come organoide è stato ridotto da 20 a 5. Numerose prove hanno infatti evidenziato che il ridimensionamento degli organoidi ha comportato una riduzione delle loro dimensioni di circa un ordine di grandezza; di conseguenza, il valore ottimale per *minDiameter* è stato determinato pari a 5. Un valore più elevato, anche solo pari a 10, comporterebbe l'esclusione della maggior parte degli organoidi presenti al giorno d3, poiché questi risultano estremamente piccoli nel primo giorno. In assenza di corrispettivi rilevabili al giorno d3, quasi tutti gli organoidi tracciati negli altri punti temporali risulterebbero pertanto solo parzialmente monitorati.

- **‘spatialConfidenceRadius’**: come accennato in precedenza, sono stati variati i parametri inerenti a diametri e dimensioni. Tuttavia, si è capito che lo `spatialConfidenceRadius` di valore diverso, non permetteva il corretto tracciamento degli organoidi. Questo raggio infatti identifica una sfera, quindi permette la ricerca dell’organoide a distanza pari a 30 lungo tutti gli assi. Poiché il volume viene dimezzato solo lungo gli assi X e Y e non lungo Z, la diminuzione di questo parametro non permetterebbe la completa ricerca lungo Z, per questo motivo si è deciso di mantenerlo invariato.
- **‘PixelSizeXY’**: questo parametro è stato modificato in seguito alla riduzione della dimensione lungo gli assi X e Y. Poiché il numero di voxel è stato dimezzato lungo tali direzioni, la dimensione reale di ciascun voxel deve essere raddoppiata per mantenere inalterate le dimensioni fisiche del volume rappresentato. Ad esempio, se la dimensione effettiva lungo l’asse Y è pari a 2016  $\mu\text{m}$ , per preservare questa stessa dimensione reale con un numero di voxel dimezzato è necessario aumentare il valore della dimensione reale di ogni voxel, portando il parametro `PixelSizeXY` da 2.52  $\mu\text{m}$  a 5.04  $\mu\text{m}$ .

Poiché la dimensione lungo l’asse Z non è stata modificata, anche il parametro `PixelSizeZ` rimane invariato.

La modifica di questi parametri consente di eseguire l’algoritmo di tracking sui volumi ridotti. La procedura di tracciamento è svolta secondo le modalità descritte nel Paragrafo 3.2.3. Le tabelle risultanti mantengono la stessa struttura illustrata nel suddetto paragrafo, con la differenza che i valori relativi ai volumi identificati (espressi in voxel) saranno necessariamente inferiori, a causa delle minori dimensioni degli organoidi.

I passaggi successivi vengono eseguiti senza modifiche rispetto al caso precedente. In particolare, vengono identificati i migliori run per ciascun giorno di riferimento, quindi si procede con il merging delle tabelle corrispondenti e, successivamente, con la determinazione delle fusioni e la correzione dei valori dei volumi interessati.

A causa delle differenze introdotte dal processo di *Watershed* durante la fase di preprocessing, la divisione degli organoidi risulta leggermente diversa rispetto a quella ottenuta utilizzando i volumi nelle dimensioni originali. Di conseguenza, il numero finale

di organoidi completamente tracciati (FT) risulta lievemente differente rispetto ai risultati precedenti. La Tabella 5.4 mostra la variazione nel numero di organoidi completamente tracciati confrontando l'esecuzione con i volumi originali e quella con i volumi ridotti.

Campione	# organoidi FT con volumi originali	# organoidi FT con volumi ridotti
p1_w6	24	28
p1_w7	30	32
p1_w8	32	30
w4	46	56
w5	50	60
w7	10	43
w8	63	68

**Tabella 5.4:** Numero di organoidi FT rilevati con i volumi interi e con i volumi ridotti per ogni campione

Come mostra la Tabella 5.4 si ha un aumento nel numero di organoidi FT in tutti i campioni tranne p1\_w8 nel quale si rilevano due organoidi in meno rispetto al tracking svolto con i volumi di dimensioni originali.

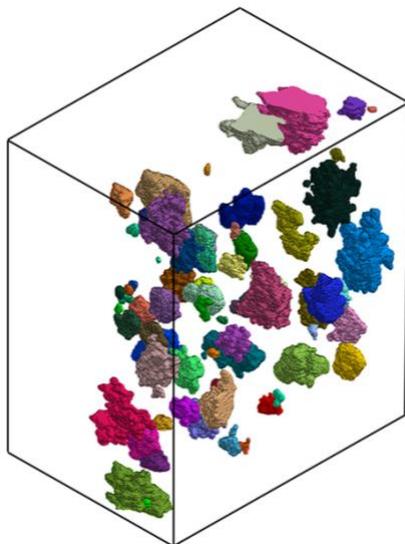
Si procede ora all'analisi dei risultati ottenuti dal tracking sui volumi ridotti, confrontandoli con quelli derivanti dall'uso dei volumi nelle dimensioni originali.

## 5.2 Risultati

I risultati e la performance dell'algorithmo utilizzando i volumi ridotti sono valutati generando e analizzando gli stessi grafici del caso con i volumi di dimensioni intere.

Utilizzando l'applicazione *Volume Viewer* di MATLAB è possibile visualizzare in 3D gli organoidi tracciati seguendo la loro crescita in tutti i timepoint, come fatto precedentemente.

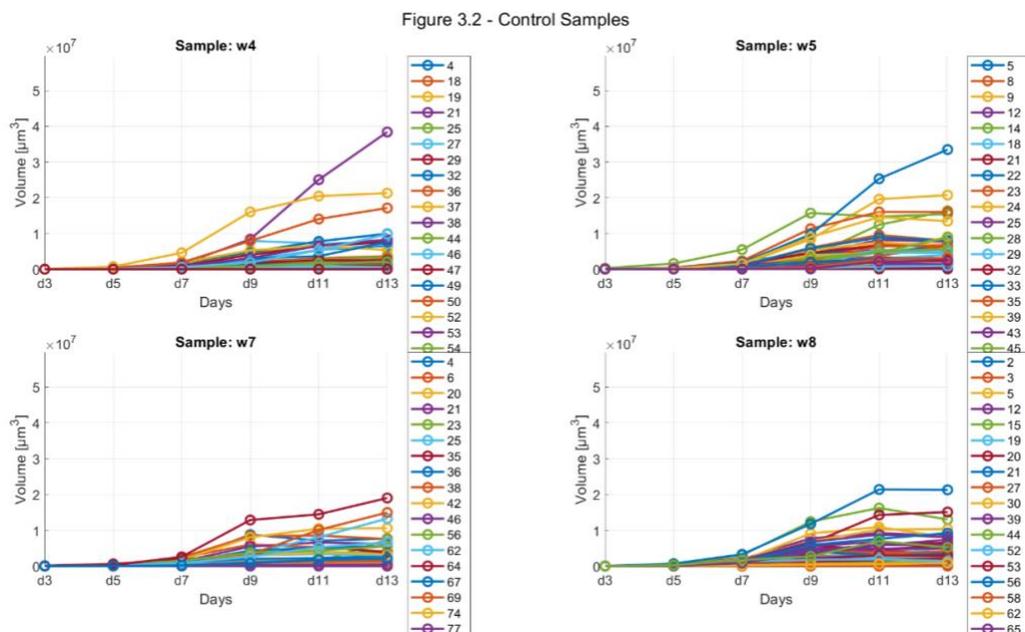
Nella visualizzazione tridimensionale, la principale differenza risiede nelle dimensioni più contenute del volume, come è possibile osservare in Figura 5.3. Questa riduzione dimensionale consente tuttavia una maggiore rapidità nella generazione del grafico.



**Figura 5.3:** Esempio di visualizzazione 3D degli organoidi FT nel volume  $w8\_d13$  ridotto.

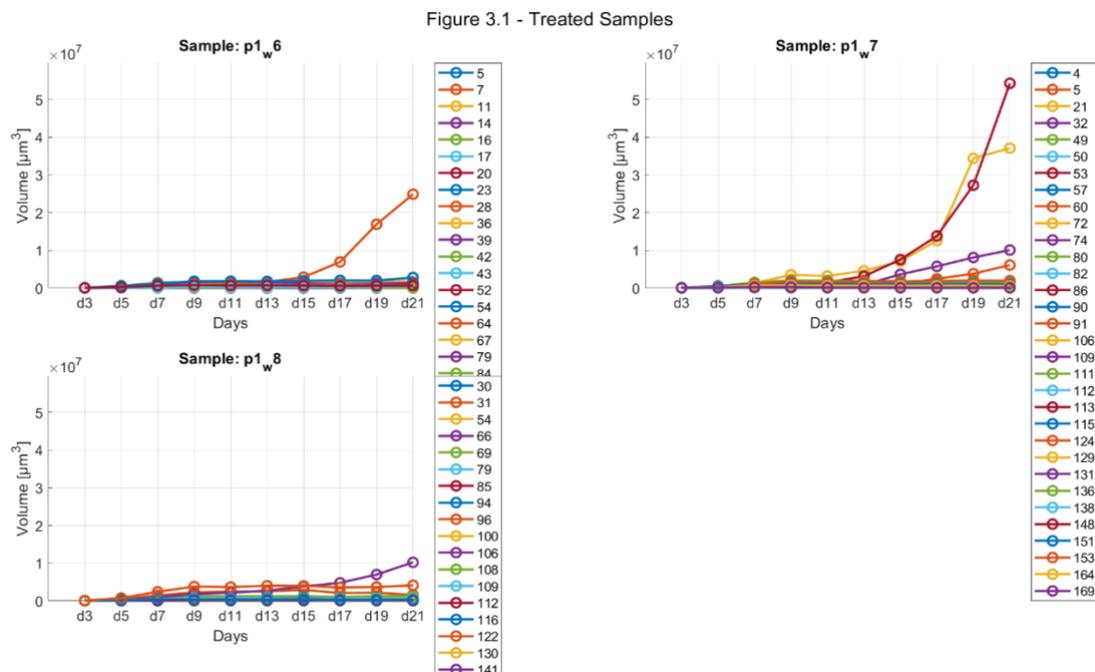
### 5.2.2 Andamento della crescita degli organoidi

Come fatto in precedenza, si analizzano gli andamenti della crescita volumetrica degli organoidi, graficando i trend dei volumi degli organoidi di ogni campione.



**Figura 5.4:** Crescita degli organoidi relativi ai campioni Untreated:  $w4$ ,  $w5$ ,  $w7$ , e  $w8$

Analogamente a quanto osservato nei grafici relativi all'andamento dei volumi degli organoidi nei campioni di controllo, riportati in Figura 4.6 con i volumi originali, anche in questo caso la crescita degli organoidi appare pressoché uniforme. I picchi massimi si attestano nuovamente tra  $2e+07 \mu\text{m}^3$  e  $4e+07 \mu\text{m}^3$ . Tuttavia, a differenza dell'analisi precedente, emergono alcuni organoidi con accelerazioni nella crescita volumetrica nei campioni *w4* e *w5*, fenomeno che non era stato rilevato in precedenza. Tale discrepanza era attesa, poiché, come evidenziato in precedenza, questa esecuzione con volumi ridotti ha consentito di identificare ben 10 organoidi aggiuntivi sia in *w4* che in *w5*.



**Figura 5.5:** Crescita degli organoidi FT ottenuti dall'esecuzione con volumi ridotti. Campioni Treated: *p1\_w6*, *p1\_w7* e *p1\_w8*

Per quanto riguarda i grafici relativi agli organoidi dei campioni *Treated*, si osserva, analogamente al caso precedente in Figura 4.7, che la maggior parte degli organoidi presenta una crescita molto limitata. Tuttavia, si distinguono alcuni organoidi singolari che mostrano un marcato picco di crescita, con volumi significativamente elevati negli ultimi giorni di acquisizione. Anche in questo caso, è plausibile ipotizzare che tali organoidi particolari possano essere identificati come DTP.

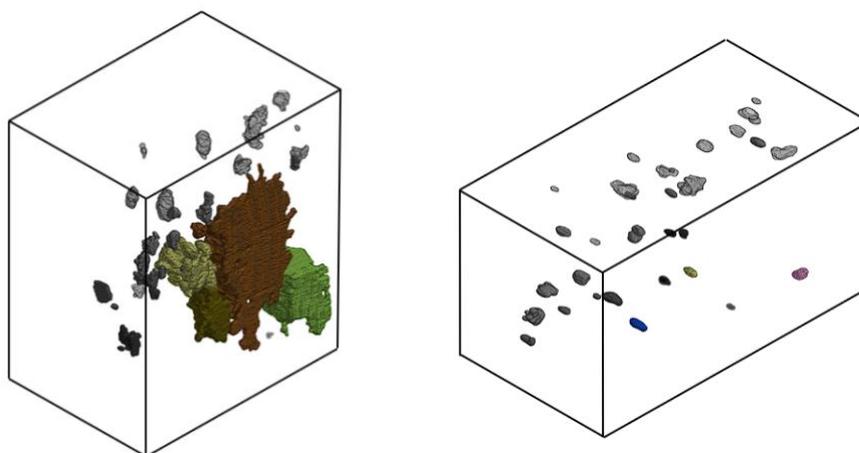
### 5.2.3 Identificazione degli organoidi DTP

Analogamente a quanto avviene per i volumi a dimensioni originali, per determinare quali tra gli organoidi rilevati nei campioni *Treated* possano derivare dalla proliferazione di cellule DTP, viene applicata una soglia oltre la quale un organoide è considerato DTP. Nel caso dei volumi a dimensioni ridotte, tale soglia è stata fissata a 100.000 voxel. Questo valore è stato definito attraverso numerose prove, con l'obiettivo di garantire l'identificazione degli stessi DTP individuati nei volumi a dimensioni originali, mantenendo la medesima accuratezza e precisione in entrambi i contesti.

Sample	DTP con volumi originali	DTP con volumi ridotti
p1_w6	1	1
p1_w7	3	4
p1_w8	2	2

**Tabella 5.5:** Numero di DTP rilevati nelle esecuzioni con i volumi interi e con i volumi dimezzati

La Tabella 5.5 evidenzia come l'analisi eseguita con volumi a dimensioni dimezzate sia riuscita a rilevare gli stessi organoidi DTP identificati nella precedente analisi. Inoltre, rispetto ai volumi a dimensioni intere, è stato individuato un organoide aggiuntivo nel campione *p1\_w7*.

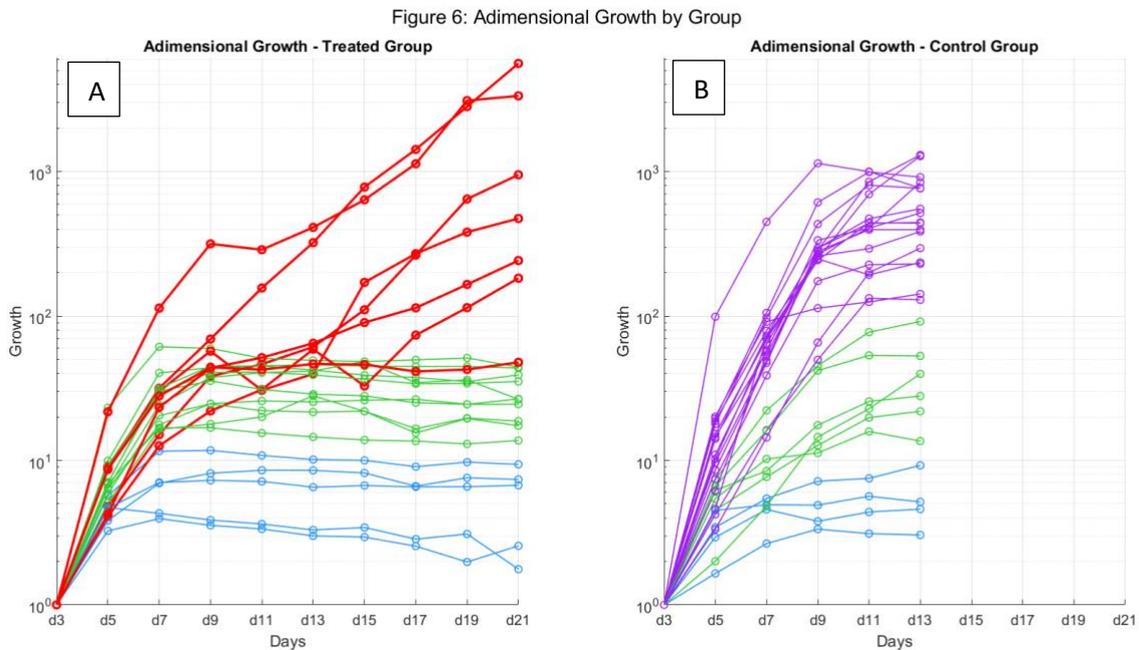


**Figura 5.6:** rappresentazione degli organoidi DTP identificati nel volume *p1\_w7*. A sinistra il volume con dimensioni ridotte e a destra quello in dimensioni originali.

Nella Figura 5.6 si può osservare nel volume ridotto a sinistra l'organoide di colore giallo, non presente nel volume a dimensioni originali.

### 5.2.4 Trend normalizzati di crescita degli organoidi

L'ultimo grafico utile per confrontare le esecuzioni con volumi interi e volumi ridotti riguarda la crescita degli organoidi, normalizzata rispetto al giorno d3, il primo giorno di acquisizione considerato. Analogamente a quanto fatto in precedenza, il grafico è stato realizzato selezionando circa sei organoidi per ciascun campione: due con crescita rapida, due con crescita media e due con crescita lenta.



**Figura 5.7:** crescita dei volumi degli organoidi normalizzata rispetto al giorno d3. (A) campioni Treated e (B) campioni Untreated

Come spiegato nel paragrafo 4.4.1, in azzurro sono rappresentati gli organoidi con trend di crescita molto lenti, mentre in verde quelli con crescita media. Anche qui nel grafico A, relativo ai campioni *Treated*, gli organoidi identificati come DTP sono evidenziati in rosso. Coerentemente al caso precedente la crescita della maggior parte degli organoidi non-DTP tende ad arrestarsi dopo il giorno d7, mentre quella degli organoidi DTP mostra

un incremento significativo nel tempo. Nei campioni *Untreated*, a differenza di quanto osservato nei campioni *Treated*, si rileva una crescita volumetrica continua e costante. Nel complesso i valori raggiunti sono paragonabili con quelli ottenuti con i volumi a dimensioni originali.

## Capitolo 6

### Conclusioni

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo principale l'ottimizzazione di una pipeline di tracking per organoidi tridimensionali al fine di migliorare l'identificazione e il monitoraggio delle cellule Drug-Tolerant Persisters (DTP). La situazione di partenza presentava diverse difficoltà e sfide tecniche, tra cui: la mancata registrazione delle immagini OCT utilizzate, la dipendenza dell'algoritmo di tracking dai parametri impostati e dal giorno di riferimento scelto, nonché la complessità nell'identificazione degli organoidi DTP. Tali criticità comportavano una significativa difficoltà per l'algoritmo nel rilevare un numero consistente di organoidi. Con il lavoro descritto si è proposta quindi una possibile soluzione a questi problemi con lo scopo di aumentare significativamente l'accuratezza e la capacità di tracciamento dell'algoritmo. Le soluzioni proposte includono l'implementazione di tecniche di preprocessing, quali la trasformata Watershed e lo zero padding, l'ottimizzazione dei criteri di matching impiegati nell'algoritmo di tracking al fine di migliorarne l'efficienza, e l'introduzione di un sistema per la combinazione dei risultati ottenuti da esecuzioni con diversi iperparametri, con l'obiettivo di eliminare la dipendenza da questi ultimi.

I risultati ottenuti dimostrano l'efficacia della nuova pipeline, con un incremento notevole nel numero di organoidi completamente tracciati (fully tracked, FT) rispetto alla pipeline precedente. In particolare, nel campione w5 si è osservato un aumento da 1 a 50 organoidi FT, evidenziando l'importanza delle modifiche apportate. Inoltre, la pipeline ottimizzata ha permesso di identificare organoidi DTP precedentemente non rilevati, ampliando le possibilità di studio dei meccanismi di tolleranza ai farmaci.

La rappresentazione grafica dei trend di crescita ha confermato che gli organoidi DTP si distinguono per una crescita significativamente più rapida rispetto agli altri organoidi trattati, mentre nei campioni di controllo si è osservata una crescita costante e uniforme. Questi risultati sottolineano l'impatto del trattamento farmacologico sul comportamento degli organoidi e la capacità dell'algoritmo di evidenziare tali differenze.

In conclusione, il lavoro svolto non solo rappresenta un passo avanti significativo nel monitoraggio degli organoidi, ma offre una base solida per futuri studi dedicati all'analisi quantitativa e qualitativa dei pattern biologici. Le prospettive includono il perfezionamento dell'algoritmo, l'applicazione su dataset più ampi e l'integrazione con tecnologie avanzate di imaging per ulteriori progressi nel campo della ricerca oncologica.

# Appendice A

```
% CODICE WATERSHED
rootDir = "E:\Tesi_hafida\for_tracking\mat_data_or";
OutDir = "E:\Tesi_hafida\for_tracking\mat_data_water";
mkdir(OutDir);
% Get all subfolders within the root directory
subfolders = dir(fullfile(rootDir, '*'));
subfolders = subfolders([subfolders.isdir]); % Filter out anything that is not a
directory
subfolders = subfolders(~ismember({subfolders.name}, {'.', '..'})); % Ignore '.' and
'..'
for i = 1:(length(subfolders))

    % Get sample name
    sampleName = subfolders(i).name;
    samplePath = fullfile(rootDir, sampleName);

    % Create saving directory
    save_path = fullfile(OutDir, sampleName);
    mkdir(save_path);

    matFiles = dir(fullfile(samplePath, '*.mat'));
    matFiles = sort_nat({matFiles.name}); % Ensure the files are sorted naturally

    for j = 2:(length(matFiles)) % Processing starts from day 5

        % Load the volume
        volume = load(fullfile(samplePath, matFiles{j}));
        volume = volume.V_mask;

        % Calculate distance transform
        D = -bwdist(~volume);

        % Get the day's number
        pattern = 'd(\d+)';
        token = regexp(matFiles{j}, pattern, 'tokens');
        day = str2double(token{1}{1});

        % Calculate the extended minima transform
        if day > 13
            min = imextendedmin(D, day-10);
        else
            min = imextendedmin(D, 3);
        end

        imgDist = imimposemin(D, min);
        imgLabel = watershed(imgDist);
        imgLabel(~volume) = 0;

        savePath = fullfile(save_path, matFiles{j});
        save(savePath, 'imgLabel');
    end
end
```

# Appendice B

Tabella tuning\_results\_p1\_w6

Iteration	ref_index	spatialConfidenceRadius	volumeTolerance	probabilityThreshold	postprocessing
1	1	30	0,2	0,75	1
2	1	30	0,3	0,75	1
3	2	30	0,2	0,75	1
4	2	30	0,3	0,75	1
5	3	30	0,2	0,75	1
6	3	30	0,3	0,75	1
7	4	30	0,2	0,75	1
8	4	30	0,3	0,75	1
9	5	30	0,2	0,75	1
10	5	30	0,3	0,75	1
11	6	30	0,2	0,75	1
12	6	30	0,3	0,75	1
13	7	30	0,2	0,75	1
14	7	30	0,3	0,75	1
15	8	30	0,2	0,75	1
16	8	30	0,3	0,75	1
17	9	30	0,2	0,75	1
18	9	30	0,3	0,75	1
19	10	30	0,2	0,75	1
20	10	30	0,3	0,75	1

Completeness	Completeness0-25	Completeness25-50	Completeness50-75	Completeness75-100
11,68831169	54,54545455	13,63636364	11,03896104	9,090909091
15,58441558	54,54545455	8,441558442	10,38961039	11,03896104
10,65088757	44,9704142	18,34319527	15,97633136	10,0591716
14,20118343	43,78698225	13,60946746	14,79289941	13,60946746
8,910891089	35,14851485	31,18811881	16,33663366	8,415841584
11,88118812	29,7029703	28,21782178	17,82178218	12,37623762
8,571428571	34,28571429	35,71428571	14,28571429	7,142857143
10,95238095	28,0952381	31,9047619	16,66666667	12,38095238
7,359307359	36,7965368	34,1991342	15,58441558	6,060606061
9,523809524	30,3030303	35,06493506	16,01731602	9,090909091
7,203389831	40,6779661	30,93220339	15,6779661	5,508474576
9,322033898	32,62711864	32,62711864	16,52542373	8,898305085
6,910569106	50,81300813	22,76422764	14,22764228	5,284552846
8,943089431	44,30894309	23,57723577	14,63414634	8,536585366
7,142857143	66,19047619	12,85714286	8,095238095	5,714285714
10,47619048	58,0952381	10,95238095	10,47619048	10
6,43776824	81,97424893	6,43776824	3,004291845	2,145922747
8,583690987	78,96995708	5,150214592	2,575107296	4,721030043
6,060606061	83,98268398	5,627705628	2,597402597	1,731601732
8,658008658	81,38528139	3,896103896	2,164502165	3,896103896

ConsistencyScore	FTConsistencyScore	NumHighScore	NumMidScore	NumLowScore	ElapsedTime
0,982467532	0,927777778	15	3	0	906,429364
0,977721816	0,926579862	20	4	0	975,10246
0,983136095	0,930555556	17	1	0	953,087831
0,976391703	0,926579862	22	2	0	973,38721
0,987376238	0,966666667	17	1	0	1003,22402
0,98002161	0,955746529	22	2	0	1004,29857
0,986904762	0,947222222	17	1	0	1003,99839
0,979557493	0,949474639	22	1	0	1011,37021
0,986580087	0,929411765	17	0	0	1019,18547
0,983343682	0,938340628	22	0	0	1068,08399
0,986440678	0,935294118	17	0	0	975,410233
0,982802455	0,942886082	22	0	0	898,083681
0,987804878	0,970588235	17	0	0	911,311112
0,984421016	0,972431537	22	0	0	921,149002
0,990238095	0,953333333	15	0	0	928,802719
0,983778542	0,9610679	22	0	0	826,213434
0,988626609	0,903333333	12	3	0	801,332599
0,984517984	0,9075	16	4	0	808,655261
0,981385281	0,814285714	8	6	0	790,26023
0,976406926	0,8325	12	8	0	947,023083

# Appendice C

Esempio tabella completa (Fully e Partially tracked) risultante da un'iterazione

OrganoidID	Centroid_d3	Volume_d3	Centroid_d5	Volume_d5	Centroid_d7	Volume_d7	Centroid_d9	Volume_d9	Centroid_d11	Volume_d11	Centroid_d13	Volume_d13
1	(819.75, 704.07, 3.04)		1428 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
4	(365.86, 641.42, 16.41)		1031 (366.92, 622.41, 6.71)		6454 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
5	(1118.55, 736.64, 21.47)		3179 (1124.38, 725.21, 11.63)		10085 (1123.43, 740.67, 12.53)		12133 (1125.80, 734.42, 12.06)		11506 (1132.88, 737.64, 12.78)		10743 (1127.53, 735.83, 16.79)	9288
6	(878.78, 673.76, 34.39)		1840 (877.55, 684.90, 16.95)		21695 (871.93, 698.74, 17.65)		50506 (875.68, 690.61, 18.20)		54312 (879.38, 688.48, 20.27)		50706 (875.80, 688.62, 20.89)	46512
7	(425.37, 697.16, 29.60)		5147 (424.73, 673.06, 16.46)		38987 (419.89, 688.93, 17.97)		100909 (424.64, 675.95, 18.18)		114665 (427.32, 670.94, 20.93)		112690 (422.54, 671.69, 19.89)	103925
8	(744.60, 493.43, 29.25)		3110 (748.92, 496.46, 26.76)		24704 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
9	(389.07, 703.82, 31.37)		1007 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
10	(217.83, 716.41, 34.64)		1699 (217.68, 699.70, 26.03)		14340 (224.76, 711.71, 26.70)		36213 (223.24, 700.72, 26.49)		36129 (225.70, 688.75, 28.23)		34073 (222.53, 690.36, 29.45)	34068
11	(502.67, 697.44, 44.93)		2638 (498.18, 684.56, 41.27)		5995 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
12	(477.88, 691.84, 52.06)		2090 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
13	(957.23, 706.26, 62.35)		4532 (963.25, 702.47, 59.56)		14766 (962.93, 712.09, 57.10)		28637 (962.13, 704.67, 57.47)		23321 (965.17, 703.33, 60.28)		20891 (962.30, 703.00, 61.70)	18987
14	(395.25, 575.64, 67.66)		7330 (398.95, 555.84, 57.23)		65922 (403.46, 583.03, 55.68)		186246 (409.36, 572.03, 50.92)		209422 (413.75, 571.46, 55.06)		218347 (409.35, 576.97, 56.72)	222479
15	(99.49, 736.76, 73.99)		6869 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
16	(1040.97, 707.42, 68.07)		918 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
17	(100.56, 592.30, 72.00)		1267 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
18	(1122.48, 725.83, 76.43)		2336 (1128.09, 723.87, 67.84)		10487 (1139.01, 739.57, 69.05)		12275 (1140.28, 730.72, 70.15)		13311 (1144.08, 731.58, 72.04)		13166 (1140.31, 730.92, 73.48)	12277
19	(1084.15, 720.94, 76.40)		1273 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
20	(600.40, 676.40, 80.36)		3667 (605.48, 670.84, 71.73)		11317 (603.87, 691.13, 69.48)		13607 (604.79, 681.59, 69.68)		12372 (607.90, 675.88, 73.04)		11788 (604.69, 675.76, 73.38)	10532
21	(942.85, 536.08, 77.42)		1636 (946.23, 539.45, 69.68)		10067 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
22	(648.83, 332.92, 81.06)		2299 (658.15, 333.08, 75.55)		9242 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
23	(87.49, 632.36, 83.89)		6749 (86.28, 619.37, 73.78)		26260 (85.98, 646.95, 69.15)		67596 (84.46, 634.20, 70.38)		95398 (88.34, 627.95, 74.24)		86566 (80.91, 636.17, 78.17)	78767
24	(259.10, 682.56, 87.98)		5325 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
25	(136.88, 721.41, 93.70)		2283 (139.09, 698.52, 83.42)		11474 (141.16, 712.61, 82.87)		37897 (140.95, 707.60, 85.49)		46539 (145.35, 695.87, 89.35)		46981 (144.99, 683.68, 88.41)	65991
26	(166.23, 650.40, 96.74)		1619 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
28	(801.73, 604.48, 104.22)		3954 (809.04, 602.11, 95.28)		27014 (805.12, 622.83, 93.80)		69279 (804.91, 614.07, 95.05)		73149 (806.88, 613.33, 99.79)		73432 (803.26, 614.85, 101.03)	70929
29	(897.07, 696.53, 103.61)		1820 (906.06, 680.54, 93.09)		18796 (899.88, 690.55, 92.04)		36954 (900.98, 682.37, 92.99)		42477 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
30	(512.37, 610.82, 102.41)		1483 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
31	(1025.86, 695.09, 114.00)		923 (1032.70, 693.15, 106.18)		2733 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
32	(702.04, 630.76, 118.82)		3001 (703.05, 623.07, 114.18)		14329 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	
33	(1091.57, 524.70, 119.34)		2950 (1098.75, 540.27, 112.31)		11682 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)	

Centroid_d15	Volume_d15	Centroid_d17	Volume_d17	Centroid_d19	Volume_d19	Centroid_d21	Volume_d21	ConsistencyScore	OutlierDays
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(1127.23, 733.14, 18.92)	9307	(1123.87, 734.65, 17.89)		9157 (1120.73, 743.27, 10.35)	10365	(1110.18, 730.49, 8.84)	8455		1 No Outliers
(877.45, 689.26, 24.92)	44815	(876.12, 691.23, 22.70)		39421 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(424.45, 674.44, 21.72)	114042	(426.53, 678.82, 22.38)		100195 (423.13, 701.22, 18.97)	100527	(421.13, 707.60, 21.46)	111880		1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(224.76, 695.82, 32.80)	31153	(223.41, 698.53, 31.92)		26208 (226.42, 724.73, 26.35)	22860	(224.84, 733.58, 27.64)	28704		1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(963.10, 703.38, 64.28)	17123	(962.08, 705.64, 62.31)		15436 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(410.44, 585.08, 59.80)	218259	(410.24, 595.88, 59.22)		197119 (414.29, 624.55, 53.15)	223414	(412.59, 637.88, 54.79)	219183		0,9 d19, d21
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(1141.82, 730.28, 76.09)	11957	(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(606.19, 679.15, 76.38)	10269	(605.19, 680.52, 76.17)		8962 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(84.93, 642.73, 80.51)	83786	(82.54, 651.16, 81.12)		74646 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(147.64, 695.15, 93.67)	62250	(146.52, 698.93, 92.82)		53805 (149.93, 726.39, 90.82)	47662	(136.33, 743.13, 86.72)	74837		0,95 d13
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(803.77, 620.85, 103.77)	66293	(801.10, 626.08, 103.73)		58303 (NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers
(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)		(NaN, NaN, NaN)			1 No Outliers

# Appendice D

Esempio tabella contenente solo gli organoidi FT

OrganoidID	Centroid_d3	Volume_d3	Centroid_d5	Volume_d5	Centroid_d7	Volume_d7	Centroid_d9	Volume_d9	Centroid_d11	Volume_d11	Centroid_d13	Volume_d13
5	(1118.55, 736.64, 21.47)	3179	(1124.38, 725.21, 11.63)	10085	(1122.43, 740.67, 12.53)	12133	(1125.80, 734.42, 12.06)	11506	(1132.88, 737.64, 12.78)	10743	(1127.51, 735.83, 16.79)	9288
7	(425.37, 697.16, 29.60)	5147	(424.73, 673.06, 16.46)	38987	(419.89, 688.93, 17.97)	100909	(424.64, 675.95, 18.18)	114665	(427.32, 670.94, 20.93)	112690	(422.54, 671.69, 19.89)	103925
10	(217.83, 716.41, 34.64)	1699	(217.68, 699.70, 26.03)	14340	(224.76, 711.71, 26.70)	36213	(223.24, 700.72, 26.49)	36129	(225.70, 688.75, 28.23)	34073	(222.53, 690.36, 29.45)	34068
14	(395.25, 575.64, 67.66)	7330	(398.95, 555.84, 57.23)	65922	(403.46, 583.03, 55.68)	186246	(409.36, 572.03, 50.92)	209422	(413.75, 571.46, 55.06)	218347	(409.35, 576.97, 56.72)	222479
25	(136.88, 721.41, 93.70)	2283	(139.09, 698.52, 83.42)	11474	(141.16, 712.61, 82.87)	37897	(140.95, 707.60, 85.49)	46539	(145.35, 695.87, 89.35)	46981	(144.99, 683.68, 88.41)	65991
36	(805.36, 687.38, 136.42)	3308	(783.09, 674.39, 132.63)	50920	(790.53, 684.66, 125.17)	90175	(788.95, 667.28, 125.49)	99299	(790.57, 666.15, 132.16)	93461	(789.53, 664.29, 131.12)	90260
43	(1111.32, 716.48, 150.53)	4588	(1114.27, 714.46, 147.21)	15027	(1103.10, 722.74, 143.17)	29772	(1103.42, 713.58, 143.60)	32733	(1105.45, 716.08, 145.73)	27260	(1102.64, 715.01, 146.62)	25653
46	(554.47, 639.96, 167.40)	5532	(556.98, 650.56, 155.59)	37214	(564.49, 662.04, 152.42)	109386	(584.95, 650.81, 145.89)	199313	(579.50, 646.15, 151.26)	195785	(576.42, 645.26, 152.97)	187443
49	(328.32, 663.40, 173.05)	3517	(344.38, 664.77, 177.91)	26363	(347.87, 685.04, 166.01)	59987	(346.80, 674.41, 158.54)	75072	(349.26, 672.92, 150.31)	84665	(339.30, 672.98, 149.70)	91771
60	(652.57, 676.44, 225.41)	3018	(657.81, 660.37, 221.63)	20910	(651.75, 679.11, 225.16)	45944	(652.40, 666.83, 225.03)	46984	(654.82, 661.51, 228.52)	46031	(651.71, 660.41, 228.60)	44168
62	(446.11, 682.75, 239.70)	2106	(440.38, 667.84, 235.88)	10208	(442.57, 682.89, 237.01)	25907	(444.43, 672.79, 236.31)	35249	(448.41, 661.72, 241.20)	43176	(445.39, 660.44, 241.80)	40628
69	(409.12, 680.56, 269.46)	3630	(416.51, 663.25, 260.83)	16496	(410.70, 674.60, 260.33)	43129	(408.35, 662.86, 261.33)	45056	(415.85, 658.26, 264.48)	47047	(411.87, 659.02, 267.73)	46408
72	(112.28, 715.99, 281.73)	3572	(112.99, 694.52, 273.90)	16211	(111.46, 712.27, 266.71)	49768	(116.65, 697.33, 273.09)	124158	(110.70, 677.52, 272.40)	155163	(106.40, 672.05, 259.38)	196313
76	(357.22, 690.40, 306.25)	2827	(356.87, 676.00, 303.34)	30788	(346.81, 693.86, 283.27)	80706	(339.97, 679.79, 268.80)	76263	(346.69, 670.82, 275.97)	85994	(342.74, 669.90, 276.82)	77715
114	(889.01, 572.05, 466.98)	3338	(904.28, 581.69, 466.62)	19583	(891.39, 603.09, 460.18)	48071	(907.57, 618.15, 468.53)	71348	(912.69, 630.21, 462.88)	62617	(892.82, 634.34, 448.71)	112054
122	(1010.67, 698.49, 488.79)	9203	(1016.53, 683.15, 485.71)	75809	(1015.91, 692.11, 481.48)	229038	(1004.98, 681.23, 478.97)	321928	(1011.59, 679.23, 487.29)	337573	(1007.20, 671.90, 490.83)	341440
128	(226.48, 704.68, 549.00)	4134	(232.02, 676.89, 541.44)	23528	(230.71, 696.47, 537.75)	65229	(232.22, 677.77, 539.01)	93880	(238.58, 674.65, 541.78)	95403	(233.41, 671.72, 542.41)	93322
138	(142.62, 713.94, 588.31)	1782	(149.81, 697.25, 578.95)	9017	(152.20, 718.24, 576.64)	18242	(150.69, 707.97, 580.14)	16157	(153.68, 697.67, 583.21)	16444	(149.72, 693.31, 583.87)	14716

Centroid_d15	Volume_d15	Centroid_d17	Volume_d17	Centroid_d19	Volume_d19	Centroid_d21	Volume_d21	ConsistencyScore	OutlierDays
(1127.23, 733.14, 18.92)	9307	(1123.87, 734.65, 17.89)	9157	(1120.73, 743.27, 10.35)	10365	(1110.18, 730.49, 8.84)	8455	1	No Outliers
(424.45, 674.44, 21.72)	114042	(426.53, 678.82, 22.38)	100195	(423.13, 701.22, 18.97)	100527	(421.13, 707.60, 21.46)	111880	1	No Outliers
(224.76, 695.82, 32.80)	31153	(223.41, 698.53, 31.92)	26208	(226.42, 724.73, 26.35)	22860	(224.84, 733.58, 27.64)	28704	1	No Outliers
(410.44, 585.08, 59.80)	218259	(410.24, 595.88, 59.22)	197119	(414.29, 624.55, 53.15)	223414	(412.59, 637.88, 54.79)	219183	0,9	d19, d21
(147.64, 695.15, 93.67)	62250	(146.52, 698.93, 92.82)	53805	(149.93, 726.39, 90.82)	47662	(136.33, 743.13, 86.72)	74837	0,95	d13
(789.46, 668.99, 134.27)	89679	(788.12, 669.66, 133.58)	75636	(794.87, 670.38, 112.85)	128027	(792.06, 674.63, 110.73)	146918	1	No Outliers
(1103.79, 715.98, 149.76)	25151	(1101.66, 716.97, 147.56)	23175	(1101.02, 725.12, 140.15)	22697	(1096.66, 724.48, 138.42)	24038	1	No Outliers
(577.38, 653.11, 156.71)	186759	(574.88, 654.43, 156.23)	155832	(576.34, 675.94, 151.38)	170334	(574.47, 680.83, 151.40)	190031	0,85	d9, d19, d21
(344.59, 680.15, 157.11)	94123	(344.76, 679.15, 156.68)	77649	(347.01, 703.80, 152.70)	75076	(345.02, 711.69, 153.56)	79129	0,9	d19, d21
(653.35, 667.78, 231.37)	40059	(652.36, 668.03, 231.54)	35562	(652.23, 689.34, 226.98)	39419	(649.66, 692.05, 227.38)	40205	1	No Outliers
(447.08, 670.99, 244.97)	36280	(446.28, 670.28, 244.64)	30968	(448.66, 694.71, 238.64)	36480	(447.25, 699.41, 241.56)	37206	1	No Outliers
(412.79, 667.89, 270.93)	41627	(412.93, 667.65, 270.93)	33875	(416.59, 692.00, 264.42)	43465	(416.03, 696.23, 267.71)	44383	1	No Outliers
(107.40, 669.41, 254.57)	373056	(112.50, 657.56, 246.18)	865796	(124.71, 670.41, 240.87)	2116291	(127.06, 682.92, 239.29)	3108309	0,7	d11, d13, d15, d17, d19, d21
(344.98, 681.78, 281.21)	81513	(346.96, 680.61, 284.55)	73246	(341.02, 703.95, 276.63)	95568	(338.89, 709.47, 277.39)	97728	0,75	d9, d11, d13, d19, d21
(895.62, 647.43, 452.09)	103232	(891.70, 653.34, 459.50)	109565	(879.78, 665.63, 448.19)	99383	(874.06, 667.03, 447.23)	90958	0,65	d9, d11, d13, d15, d17, d19, d21
(1010.71, 687.64, 499.19)	372778	(1007.74, 682.04, 499.16)	390278	(1004.44, 697.86, 490.95)	410236	(995.66, 687.16, 492.56)	470141	1	No Outliers
(235.71, 691.09, 546.12)	95882	(234.97, 687.95, 545.07)	97110	(239.65, 715.89, 536.27)	89670	(237.96, 722.10, 536.37)	90205	1	No Outliers
(152.09, 714.43, 586.69)	14887	(150.48, 709.97, 584.78)	14528	(153.86, 738.71, 577.33)	14312	(151.73, 744.98, 577.86)	14665	1	No Outliers

# Appendice E

Porzione per il codice Watershed modificata per l'utilizzo su volumi di dimensioni ridotte

```
for j = 2:(length(matFiles))    % Processing starts from day 2

    % Load the volume
    volume = load(fullfile(samplePath,matFiles{j}));
    volume = volume.V_mask;

    % Calculate distance transform
    D = -bwdist(~volume);

    % Get the day's number
    pattern = 'd(\d+)';
    token = regexp(matFiles{j}, pattern, 'tokens');
    day = str2double(token{1}{1});

    % Calculate the extended minima transform
    if day > 17
        min = imextendedmin(D,day-14);

    elseif day <= 17 && day > 13
        min = imextendedmin(D,day-10);

    else
        min = imextendedmin(D,3);
    end

    imgDist = imimposemin(D,min);
    imgLabel = watershed(imgDist);
    imgLabel(~volume) = 0;

    savePath = fullfile(save_path, matFiles{j});
    save(savePath, 'imgLabel');
end
```

## Bibliografia

- [1] Mengyang Liu *et al* 2021, “REAP: revealing drug tolerant persister cells in cancer using contrast enhanced optical coherence and photoacoustic tomography”, *J. Phys. Photonics* 2021, 3, 021001. DOI: 10.1088/2515-7647/abf02f.
- [2] Branciforti, F.; Salvi, M.; D’Agostino, F.; Marzola, F.; Cornacchia, S.; De Titta, M.O.; Mastronuzzi, G.; Meloni, I.; Moschetta, M.; Porciani, N. *et al* 2024, “Segmentation and Multi-Timepoint Tracking of 3D Cancer Organoids from Optical Coherence Tomography Images Using Deep Neural Networks”, *Diagnostics* 2024, 14, 1217. DOI: 10.3390/diagnostics14121217
- [3] Mathworks Documentation for Image Processing Toolbox, *Imextendedmin*: <https://it.mathworks.com/help/images/ref/imextendedmin.html>
- [4] Steve Edding (2004) ‘Re: Imextendedmin’, *Matlab Narkive*, accessed 11 November 2024. <https://comp.soft-sys.matlab.narkive.com/qOIGki4q/imextendedmin#post2>
- [5] Chen, Mengnuo *et al* 2024, “Targeting of vulnerabilities of drug-tolerant persisters identified through functional genetics delays tumor relapse”, *Cell Reports Medicine* 2024, 5, 3, 101471. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101471
- [6] De Conti, G.; Dias, M.H.; Bernardis, R. 2021, “Fighting Drug Resistance through the Targeting of Drug-Tolerant Persister Cells”, *Cancers* 2021, 13, 5, 1118. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13051118>
- [7] Y. Liu and Q. Zhao, "An improved watershed algorithm based on multi-scale gradient and distance transformation," *2010 3rd International Congress on Image and Signal Processing*, Yantai, China, 2010, pp. 3750-3754, DOI: 10.1109/CISP.2010.5646802.
- [8] Steve Edding, “The Watershed Transform: Strategies for Image Segmentation”, *Mathwork Technical Articles*, 2022, [https://it.mathworks.com/company/technical-articles/the-watershed-transform-strategies-for-image-segmentation.html?s\\_tid=srchtitle](https://it.mathworks.com/company/technical-articles/the-watershed-transform-strategies-for-image-segmentation.html?s_tid=srchtitle)
- [9] Klein, O. J., Jung, Y. K., & Evans, C. L. 2014, “Longitudinal, quantitative monitoring of therapeutic response in 3D in vitro tumor models with OCT for high-content therapeutic screening”, *Methods (San Diego, Calif.)*, 66(2), 299–311. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.08.028>
- [10] Aumann S, Donner S, Fischer J, et al. Optical Coherence Tomography (OCT): Principle and Technical Realization. 2019 Aug 14. In: Bille JF, editor. *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: New Frontiers in Biomedical Optics [Internet]*. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 3. Available

from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554044/> DOI: 10.1007/978-3-030-16638-0\_3

- [11] UPM Biomedicals (n.d.), *3D Organoid and Spheroid Cell Culture*, Available from: <https://www.upmbiomedicals.com/resource-center/learning-center/what-is-3d-cell-culture/3d-organoid-and-spheroid-cell-culture/#:~:text=What%20is%20organoid%20cell%20culture,organize%20themselves%20into%203D%20structures>
- [12] Hamzehei, S., Bai, J., Raimondi, G., Tripp, R., Ostroff, L., & Nabavi, S. (2023). "3D Biological/Biomedical Image Registration with enhanced Feature Extraction and Outlier Detection". *ACM-BCB ... : the ... ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine. ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine, 2023*, 1. DOI: <https://doi.org/10.1145/3584371.3612965>