

PROGETTO DI RICERCA

TITOLO: Sviluppo di un tool di segmentazione automatica e analisi quantitative su vetrini digitali acquisiti con tecnica immunostochimica multiplex in campo chiaro

Il presente Progetto di Ricerca è multidisciplinare – si svolge in area medica e area tecnologica e ingegneristica – e riguarda lo sviluppo di tecniche di imaging quantitativo per vetrini digitali immunostochimici acquisiti con tecnica multiplex in campo chiaro. Le attività saranno svolte presso la Sede della Unità Operativa (U.O.) di Anatomia Patologica del Dipartimento Interaziendale di Anatomia Patologica (DIAP) di Bologna, Ospedale Maggiore, via dell'Ospedale 8, 40133, Bologna. Le attività di pertinenza medica saranno supervisionate dal Prof. Michelangelo Fiorentino, quelle relative all'area tecnologica e ingegneristica dal Prof. Alessandro Bevilacqua.

OBIETTIVO DEL PROGETTO

Sviluppare un tool di segmentazione automatica e analisi quantitativa da applicare a vetrini digitali acquisiti mediante tecnica multiplex in campo chiaro, cioè multiple colorazioni immunostochimiche di diverse popolazioni di cellule immunitarie, applicabile all'analisi di più tessuti.

PREMESSA

La caratterizzazione del microambiente tumorale ha un ruolo cruciale nella valutazione della prognosi, progressione e risposta ai trattamenti del tumore. Tra le tecniche di analisi del microambiente tumorale, l'immunostochimica eseguita con tecnica multiplex in campo chiaro arricchisce le valutazioni ordinariamente effettuate mediante immunostochimica singleplex in campo chiaro, largamente più familiare ai patologi, poiché consente di analizzare simultaneamente e in maniera più precisa le relazioni reciproche tra le popolazioni di cellule immunitarie presenti e colorate con multipli marcatori differenti. Tuttavia, l'uso dell'immunostochimica multiplex in campo chiaro nella pratica clinica a scopi diagnostici è attualmente ancora limitato per gli elevati costi, la bassa esperienza dei patologi nella definizione della migliore combinazione di colori nonché, soprattutto, per la bassa standardizzazione delle tecniche e dei metodi di analisi e interpretazione visiva dei vetrini.

In questo contesto, il contributo ingegneristico e tecnologico può facilitare e velocizzare il processo di standardizzazione, quindi di diffusione su larga scala dell'immunostochimica multiplex in campo chiaro, quale tecnica estremamente promettente e dalle potenzialità poco sfruttate. Infatti, le tecniche di imaging quantitativo applicate ai vetrini digitali immunostochimici possono consentire di quantificare automaticamente, ed in maniera robusta e ripetibile, le cellule immunitarie nel campione ispezionato e di caratterizzarne il microambiente tumorale. L'utilizzo di metodi di quantificazione automatica delle cellule, che presuppone una preliminare accurata fase di rilevamento delle stesse, consente di migliorare precisione e accuratezza delle misurazioni, attualmente ottenute mediante conta manuale dell'anatomo-patologo. Quest'ultima attività, oltre a richiedere un notevole dispendio temporale, risulta caratterizzata da alta variabilità intra- e inter- operatore, per cui il beneficio atteso dall'utilizzo di tecniche di quantificazione e

caratterizzazione automatica è senza dubbio molto elevato. Inoltre, va evidenziato come questo Progetto contribuisca allo sviluppo di un software finalizzato a supportare il medico patologo durante la pratica clinica di refertazione, mediante analisi dei vetrini digitali ed integrazione con misurazioni quantitative accurate ottenute in tempi brevi.

DESCRIZIONE DEL PROGETTO

Questo Progetto si propone di sfruttare tecniche di imaging quantitativo per l'analisi automatica delle scansioni digitali di vetrini anatomo-patologici di diversi tumori, analizzati con immunohistochimica multiplex in campo chiaro. In una prima Fase del lavoro, saranno analizzate i vetrini digitali immunohistochimici e, dopo avere eseguito le necessarie procedure di denoising ed image enhancement, sarà identificato il migliore spazio colore in grado di separare i diversi assorbimenti sulla base dell'analisi dello spettro dei diversi marcatori. In una seconda Fase, saranno sviluppate tecniche di segmentazione automatica delle cellule immunitarie, basate su metodi di Intelligenza Artificiale, che saranno quindi fatte corrispondere alle aree colorate identificate nella prima Fase, per ottenere infine una segmentazione delle cellule sulla base dei diversi colori. Infine, sarà implementato il calcolo di tutte le metriche ad oggi utilizzate nella pratica clinica e, eventualmente, anche di quelle metriche attualmente non in uso poiché soggette ai limiti di calcolo manuale dell'operatore, così da quantificare e caratterizzare estensivamente il microambiente tumorale analizzato. Le misurazioni quantitative estratte saranno validate, per ciascun tumore analizzato, con la ground-truth rappresentata attualmente dal calcolo manuale del patologo.

PIANO DELLE ATTIVITÀ

Uno dei principali obiettivi del Progetto è la formazione multidisciplinare di un Ingegnere Biomedico, con un elevato grado di competenze specifiche nell'analisi di vetrini digitali, volta a favorire la traslationalità clinica dell'applicazione dell'imaging quantitativo in campo medico-patologico. Date le tematiche affrontate, il candidato dovrà acquisire conoscenze e competenze trasversali avanzate, con una predominanza per quelle associate al campo medico, ma anche in relazione alle tecniche di Intelligenza Artificiale per segmentazione automatica, nel campo dell'imaging cellulare.

Il piano di lavoro è organizzato in due Fasi. Nella FASE 1, si identifica il migliore spazio colore in grado di offrire la migliore tecnica di separazione delle colorazioni presenti all'interno del vetrino immunohistochimico multiplex in campo chiaro. A questo scopo saranno studiate ed applicate opportune tecniche di denoising, image enhancement e catalogazione delle aree con assorbimento sovrapposto. Si verifica inoltre la generalizzabilità delle analisi del colore tra diversi tessuti colorati con marker differenti.

Nella FASE 2, si analizzano, tra le soluzioni proposte dallo stato dell'arte in termini di metodi di Intelligenza Artificiale per la segmentazione cellulare, quelle più opportune da cui partire per sviluppare un tool che separi, automaticamente, secondo un approccio coarse-to-fine, gli aggregati e le singole cellule di ciascuna delle classi di marcatori. Infine, le informazioni e i dati di elaborazione ottenuti dalle singole Fasi separatamente saranno integrati per eseguire la conta

automatica delle singole cellule colorate diversamente, nonché la quantificazione automatica di tutte le metriche informative a scopo diagnostico.

FASE 1:

A1.1. Studio ed analisi delle immagini cellulari sulla base delle proprietà spettrali del colore, in diversi spazi, con applicazione di procedure di denoising ed image enhancement

A1.2. Rilevamento cellulare, con catalogazione delle regioni separate e/o sovrapposte, di popolazioni cellulare colorate con 4 e 5 marcatori contemporaneamente e quantificazione immunochimica

A1.3. Applicazione e adattamento dell'analisi spettrale del colore a diverse tipologie di tessuto

FASE 2:

A2.1. Approfondimento delle tecniche di Intelligenza Artificiale per segmentazione automatica avanzata applicabili all'imaging cellulare e studio degli aspetti clinici cellulari rilevanti ai fini della messa a punto delle tecniche di segmentazione

A2.2. Segmentazione di singole cellule e dei contorni cellulari all'interno degli aggregati

A2.3. Test e validazione della segmentazione automatica su diverse tipologie di tessuto

A2.4. Integrazione con i dati derivanti da A1.3, quindi analisi quantitativa e validazione delle misurazioni ottenute per diversi marker e su diversi tessuti



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Modulo richiesta assegno

TUTOR	MICHELANGELO FIORENTINO		
PRODUZIONE SCIENTIFICA TUTOR			
Punteggio VRA	1,00		

Commissione proposta 3 commissari + 1 supplente	Michelangelo Fiorentino
	Claudio Agostinelli
	Alessandro Bevilacqua
	Antonietta D'Errico

TITOLO DEL PROGETTO		
ASSEGNO FINANZIATO DA PROGETTO COMPETITIVO <i>(barrare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
SE IL FINANZIAMENTO È COMPETITIVO L'ENTE FINANZIATORE		
PROGETTO/ATTIVITÀ A SCOPO COMMERCIALE <i>(es. sperimentazione profit)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
CARATTERISTICHE DEL PROGETTO <i>(biomedico/osservazionale/clinico- interventistico/multidisciplinare)</i>	Biomedico	
STATO DI APPROVAZIONE DEL PROGETTO DA PARTE DEL COMITATO ETICO <i>(se necessario per il tipo di studio barrare o evidenziare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> Ottenuto	<input checked="" type="checkbox"/> Da ottenere
DESCRIZIONE DEL PROGETTO <i>(max 800 parole)</i>		



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

(1)obiettivi, (2)materiali e metodi, (3) risultati/impatto attesi, (4) attività formativa e (5) di ricerca dell'assegnista

- 1. Obiettivi:**Il presente Progetto di Ricerca è multidisciplinare – si svolge in area medica e area tecnologica e ingegneristica ed ha l'Obiettivo primario di sviluppare un tool di segmentazione automatica e analisi quantitativa per vetrini digitali acquisiti mediante tecnica multiplex in campo chiaro. Inoltre, il Progetto si propone di generalizzare l'applicabilità della metodologia sviluppata a diverse tipologie di tessuto. Obiettivo secondario è contribuire allo sviluppo di un software finalizzato a supportare il patologo durante la pratica clinica di refertazione, mediante integrazione di misurazioni quantitative accurate, ottenute in tempi brevi. La quantificazione automatica ha, inoltre, l'obiettivo di esplorare il valore diagnostico, prognostico e/o predittivo di nuove metriche utilizzabili in associazione a quelle di riferimento.
- 2. Materiali e metodi:**Il Progetto prevede l'analisi di vetrini digitali di carcinoma polmonare non a piccole cellule e carcinoma del pene. Le scansioni digitali saranno acquisite mediante scanner Aperio AT2 platform-Leica Biosystems, Wetzlar, Germany; mentre, per l'analisi dei vetrini digitali sarà messa a disposizione una workstation DELL Precision 3660, i9-12900K, 3200Mhz, 16 core, 24 processori logici, RAM 128GB, dotata di scheda video NVIDIA GeForce RTX 3060. Tutta la strumentazione è già disponibile presso l'Unità Operativa (U.O.) di Anatomia Patologica del Dipartimento Interaziendale di Anatomia Patologica (DIAP) di Bologna, Ospedale Maggiore, Bologna. Il Progetto si propone di sfruttare tecniche di imaging quantitativo che ricomprendono anche metodi di Intelligenza Artificiale per la segmentazione automatica. La pipeline metodologica include: (i) applicazione di tecniche di denoising, image enhancement e catalogazione delle aree con assorbimento sovrapposto, (ii) analisi degli spettri di assorbimento del colore dei diversi marcatori colorati in multipli spazi colore per individuarne quello più opportuno in funzione delle successive fasi di progetto, (iii) applicazione di tecniche di intelligenza artificiale per la segmentazione cellulare, partendo dai metodi proposti dallo stato dell'arte per adattarli al caso specifico delle immagini multiplex in campo chiaro, (iv) refinement delle cellule rilevate al punto (iii) mediante le informazioni derivanti dal punto (ii), nonché implementazione del calcolo di consolidate e nuove metriche.
- 3. Risultati/impatto attesi:**La caratterizzazione del microambiente tumorale ha un ruolo cruciale nella valutazione della prognosi, progressione e risposta ai trattamenti del tumore. Tra le tecniche di analisi del microambiente tumorale, l'immunoistochimica eseguita con tecnica multiplex in campo chiaro arricchisce le valutazioni effettuate mediante immunoistochimica singleplex, poiché consente di analizzare simultaneamente e precisamente le relazioni reciproche tra le popolazioni di cellule immunitarie colorate con multipli marcatori. Tuttavia, l'uso dell'immunoistochimica multiplex in campo chiaro nella pratica clinica è attualmente ancora limitato per gli elevati costi, la bassa esperienza dei patologici nella definizione della migliore combinazione di colori nonché, soprattutto, per la bassa standardizzazione delle tecniche e dei metodi di analisi e interpretazione visiva dei vetrini. In questo contesto, l'impatto del Progetto di Ricerca è sostanziale, perché il contributo ingegneristico e tecnologico può facilitare e velocizzare il processo di standardizzazione, quindi di diffusione su larga scala dell'immunoistochimica multiplex in



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

campo chiaro, quale tecnica estremamente promettente e dalle potenzialità poco sfruttate. Il principale risultato atteso è che si possa disporre di un tool di segmentazione cellulare per quantificare automaticamente, ed in maniera robusta e ripetibile, le cellule immunitarie nel campione ispezionato e di caratterizzarne il microambiente tumorale. Inoltre, l'utilizzo di metodi di quantificazione automatica delle cellule consente di ottenere un miglioramento di precisione e accuratezza delle misurazioni.

- 4. Attività formativa dell'Assegnista:** Si prevede che l'Assegnista di Ricerca acquisisca delle competenze trasversali e multidisciplinari, sia inerenti al campo tecnico dell'analisi di immagini cellulari mediante tecniche avanzate di Intelligenza Artificiale, sia affini al campo medico, per quanto attiene la conoscenza dei processi immunoistochimici di colorazione multiplex in campo chiaro. L'attività formativa sarà trasversale all'intera durata delle attività di Ricerca e favorita dal costante scambio multidisciplinare con i medici patologi dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica del DIAP, Ospedale Maggiore, Bologna.
- 5. Attività di ricerca dell'Assegnista:** Le attività di Ricerca saranno svolte presso l'U.O.-DIAP, Ospedale Maggiore, Bologna e le attività di area tecnologica e ingegneristica saranno supervisionate del Prof. Alessandro Bevilacqua del Dipartimento di Informatica - Scienza e Ingegneria dell'Università di Bologna. Il progetto ha durata di 12 mesi, articolato in 2 Fasi e 7 macro Attività: Fase 1, A1.1. Studio ed analisi delle immagini cellulari sulla base delle proprietà spettrali del colore, in diversi spazi, con applicazione di procedure di denoising ed image enhancement; A1.2. Rilevamento cellulare, con catalogazione delle regioni separate e/o sovrapposte, di popolazioni cellulare colorate con multipli marcatori contemporaneamente e quantificazione; A1.3. Applicazione e adattamento dell'analisi spettrale del colore a diverse tipologie di tessuto. Fase 2, A2.1. Approfondimento delle tecniche di Intelligenza Artificiale per segmentazione automatica avanzata applicabili all'imaging cellulare e studio degli aspetti clinici cellulari rilevanti ai fini della messa a punto delle tecniche di segmentazione; A2.2. Segmentazione di singole cellule e dei contorni cellulari all'interno degli aggregati; A2.3. Test e validazione della segmentazione automatica su diverse tipologie di tessuto; A2.4. Integrazione con i dati derivanti da A1.3, analisi quantitativa e validazione delle misurazioni.

DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DELL'ASSEGNISTA

(per i **nuovi** assegni: max 400 parole; competenze richieste, scansione temporale della formazione, scansione temporale dell'attività, obiettivi primari e secondari)

(per i **rinnovi**: max 600 parole – da integrare con la relazione dell'assegnista; formazione raggiunta, attività effettuata, obiettivi raggiunti/competenze acquisite, formazione ancora da acquisire (se pertinente), scansione temporale dell'attività durante il rinnovo)

Punti



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Per lo svolgimento del Progetto sono richieste competenze ed esperienze maturate in elaborazione ed analisi di immagini mediche, tecniche di Intelligenza Artificiale e Machine Learning, tecniche e metodi di analisi dati. Per tali ragioni, si ritiene appropriata la figura di un Ingegnere Biomedico, che abbia - come da formazione multidisciplinare - competenze tecniche specifiche e mediche di base per favorire la traslationalità clinica delle applicazioni oggetto del Progetto. Inoltre, il Progetto sarà occasione per la formazione verticale dell'Ingegnere Biomedico nel campo dell'imaging cellulare, sia dal punto di vista tecnico, in relazione alle metodiche di Intelligenza Artificiale per segmentazione automatica su vetrino digitale in campo chiaro, sia dal punto di vista medico, per ciò che attiene le tecniche immunoistochimiche di colorazione.

La Fase di formazione dell'Ingegnere Biomedico sarà continuativa e trasversale alle attività di Ricerca, anche grazie all'interazione quotidiana con i medici Patologi dell'Unità Operativa, sede principale delle attività del presente Progetto.

Il piano di lavoro è organizzato in due Fasi. Nella FASE 1, si identifica il migliore spazio colore in grado di offrire la migliore tecnica di separazione delle colorazioni presenti all'interno del vetrino immunoistochimico multiplex in campo chiaro. A questo scopo saranno studiate ed applicate opportune tecniche di denoising, image enhancement e catalogazione delle aree con assorbimento sovrapposto. Si verifica inoltre la generalizzabilità delle analisi del colore tra diversi tessuti colorati con marker differenti.

Nella FASE 2, si analizzano, tra le soluzioni proposte dallo stato dell'arte in termini di metodi di Intelligenza Artificiale per la segmentazione cellulare, quelle più opportune da cui partire per sviluppare un tool che separi, automaticamente, secondo un approccio coarse-to-fine, gli aggregati e le singole cellule di ciascuna delle classi di marcatori. Infine, le informazioni e i dati di elaborazione ottenuti dalle singole Fasi separatamente saranno integrati per eseguire la conta automatica delle singole cellule colorate diversamente, nonché la quantificazione automatica di tutte le metriche informative a scopo diagnostico.

Obiettivi primari delle attività dell'Assegnista sono la formazione multidisciplinare nel campo dell'imaging cellulare immunoistochimico multiplex in campo chiaro mediante tecniche avanzate di Intelligenza Artificiale per la segmentazione automatica cellulare, nonché lo sviluppo di un tool, integrabile in futuro in un software, per consentire, al medico patologo, l'analisi automatica, indipendente, in tempo reale dei vetrini digitali. Obiettivi secondari sono l'individuazione tra le misurazioni quantitative estratte mediante conta automatica, delle più informative a scopi diagnostici e prognostici sulla base del particolare contesto clinico.

SE RINNOVO, SI RICORDA DI ALLEGARE ANCHE LA RELAZIONE DELL'ASSEGNISTA CON LA SUA PRODUZIONE SCIENTIFICA.

Scheda attività assistenziale (se prevista)

ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DELL'ASSEGNISTA/ N. ORE SETTIMANA (max 18 ore settimanali)

AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Si ricorda che, come previsto dagli Accordi sull'impiego nell'attività assistenziale dei Titolari di assegni di ricerca, sottoscritti tra l'Università di Bologna e le Aziende Ospedaliere di riferimento, una volta stipulato il contratto con il vincitore della selezione, il tutor deve consegnare alla Direzione Medica Ospedaliera la relativa modulistica, nella quale andranno riportate le attività qui segnalate.