

Fluoreszcens *in situ* hibridizációval igazolt onkopatológiai génelváltozások automatizált kiértékelése digitalizált teljes mintákon

Csizmadia Annamária^{1*}, Molnár Béla¹, Kapczár Dóra², Papp Gergő², Krenács Tibor²

¹3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország

²Semmelweis Egyetem, Patológia és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest, Magyarország

*Levelező szerző, e-mail: annamaria.csizmadia@gmail.com

Beérkezett: 2023. december 1.; elfogadva: 2024. február 13.; online megjelent: 2024. november 11.

Összefoglalás

Fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) genetikai aberrációk igazolhatók tumormintákon. Digitális mikroszkópiára épülő automatizált képanalízissel a nagy felbontású FISH gének mintánként több ezer sejtben igazolhatók, és a kezelést befolyásoló daganatheterogenitás is pontosan meghatározható. A módszer a patológus munkaterhelésének csökkentése mellett támogatja a hatékonyabb diagnózist és az erre épülő onkológiai terápiát. A FISHQuant algoritmus finombeállítás után nagyszámú tumormintán igazolta a módszer alkalmazását diagnosztikus célokra, mind génátrendeződéses, mind kópiaszám-eltéréses génhibák megbízható kimutatásában. Vizsgálataink ugyancsak rávilágítottak a 3D magszegmentálás előnyeire a 2D módszerrel szemben. A dolgozatban röviden bemutatjuk kutatásunk néhány eredményét.

Kulcsszavak: fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH), digitális mikroszkópia, onkogén mutációk diagnosztikája, FISHQuant automatizált képanalízis, sejtmagszegmentálás

Automated evaluation of oncopathological genetic aberrations in whole slide images of digitalized samples detected by using fluorescence in situ hybridization

Annamaria Csizmadia¹, Béla Molnár¹, Dóra Kapczár², Gergő Papp², Tibor Krenács²

¹3DHISTECH Kft., Budapest, Hungary

²Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Summary

The fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique has been widely applied in molecular pathology for the *in situ* identification of well-known genetic aberrations in formalin-fixed paraffin embedded tissues, frozen sections, and cytological smears. In tumor pathology, FISH provides qualitative and quantitative results to support differential diagnosis often with a direct therapeutic consequence. It can be used to identify the genetically affected cells and their proportion within tumor populations. FISH can determine genetic abnormalities at a single cell level within the morphological complexity of a tumor. Advanced digital microscopy combined with image analysis algorithm offers a great chance to extract all clinically useful data from whole FISH samples. We have been developing a software tool called FISHQuant to support pathology diagnostics by semiatomated digital image analysis of major genetic abnormalities characterized by numerical and steric deviations. Based on HER2 immunohistochemical positivity breast cancer samples were selected for FISH. A dual color HER2/Cep17 probe was used, which can detect HER2 gene copies in relation to chromosome 17 to identify tumor cells with increased (>2 copy/chromosome) ratios of HER2 signals. In addition to the specific genetic aberration examined, tumor cell populations also carry non-specific deviations, which can be accurately detected with automated digital analysis, but might remain hidden with the traditional microscopy. Although our image analysis found similar HER2 copy number abnormalities to the eye control

testing, the results gained in tissue sections should be treated with caution due to the random truncation related signal loss introduced by cutting. Cultured breast cancer cells and their cell block sections offered chance for reliable nuclear segmentation and to compare FISH analysis in tumor cells in intact and cut through cell nuclei. We used SK-BR-3 a HER2 overexpressing cell line, MDA-MB-453 a triple-negative, and ZR-75-1 a HER2 2+ positive cell line. FISHQuant can also be used for determining sterical genetic abnormalities, i.e. gene translocations/fusions. For the diagnostic interpretation of the small signals their exact number and relative position within the nucleus must be determined accurately. At present our FISHQuant algorithms use 2D images for the nuclear segmentation, which, in high cell density tissue sections may result in suboptimal separation of cell nuclei. For more accurate rendering of FISH signals to individual cells we have been testing 3D nuclear segmentation algorithms compared to our 2D based method in ~5 μm -thick samples. The potential of Cellpose, an artificial intelligence based image anatomical open source 3D segmentation and learning algorithm designed and trained on wide range of image datasets, have been analyzed. Our studies comparing different nuclear segmentation tools highlighted the advantages of 3D nucleus segmentation compared to the 2D algorithm.

Keywords: fluorescence *in situ* hybridization (FISH), digital microscopy, diagnosis of oncogenic mutations, FISHQuant automated image analysis, segmentation of cell nuclei

Előszó

A mikroszkópos minták teljes digitalizálása lehetővé teszi az adatbázisokba illesztett több GB méretű nagy felbontású minták elérését számítógépes hálózatokon, térbeli és időbeli korlátozás nélkül, a világ bármely pontján. Gépi tanulási és mesterségesintelligencia-alapú automatizált képelemző algoritmusokkal a digitálizált minták (sejtek, szövettípusok, molekula-, illetve génjelek) paraméterei mennyiségileg pontosan meghatározhatók. A KDP PhD-hallgató a génhibák automatizált azonosítására alkalmas, ún. FISHQuant program fejlesztésében vesz részt. A program jelenleg kutatási célokat szolgál, és kétdimenziós (2D) magszegmentáló algoritmust alkalmaz. Ezért a hallgató 3D automatizált magszegmentáló algoritmusokat tesz fel, amelyek képesek a sejtmagok teljesebb rekonstrukciójára. Emellett a FISHQuant programmal diagnosztikus célú méréseket végez emlő-, nyirokcsomó-, colorectalis, tüdő-, bőr-, illetve vesedaganatok génátrendeződéses, illetve kópiaszám-eltérést igazoló próbákkal jelölt metszetein, citológiai és sejtblokk mintáin. A FISHQuant program alkalmas mintánként több ezer tumorsejt automatizált értékelésére, ami az egyre nagyobb klinikai jelentőségű tumorheterogenitás pontos meghatározását teszi lehetővé. Eredményeit eddig az Európai Patológus Kongresszuson (*Csizmadia et al. 2022*), egy könyvfejezetben és PhD-kurzusokon mutatta be. E cikk előzetes eredményeit és a projekt vizsgálati irányait mutatja be. Részletes eredményeit két előkészületben levő angol nyelvű közleményben publikáljuk a következőkben.

Krenács Tibor, kutatóprofesszor
témavezető, Semmelweis Egyetem

Csizmadia Annamária a Patológiai Intézet és a 3DHitech Kft. alkalmazottjaként fontos szerepet játszott a fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) laboratórium kialakításában, évekig előlelelte a génhibákat feltáró módszer eredményeit. A FISH-módszer diagnosztikus megbízhatóságának alapja a kimutatott génjelek sejtenkénti meghatározása, ami átfedő, egymással érintkező sejtmagoknál problémás. A digitális patológiai alkalmazásokat fejlesztő 3DHitech Kft. és az Intézet együttműködése, amiben ő is részt vett, két évtizede folyamatos. Annamária biológusként a Villamosmérnöki Kar elvégzése után 2012-ben tehát diagnosztikai tapasztalatokkal csatlakozott a fejlesztő csapatunkhoz, ahol 2020-tól a digitális patológiai hardware és software termékfejlesztés vezetője lett. KDP projektjének célja kettős, egyrészt a gépi tanuláson alapuló Quant-Center automatizált digitális képfeldolgozó kutatási programcsomag FISHQuant algoritmusának diagnosztikus célú továbbfejlesztése és validálása, másrészt a tumorsejtmag szegmentálás minőségének javítása a meglévő 2D algoritmus 3D algoritmussal történő helyettesítésével, tesztelés és beállítás után. Eddigi vizsgálatai igazolják, hogy a 3D sejtmagszegmentálás (Cellpose, illetve NucleAIzer) szignifikánsan jobb pozitív prediktív értéket és érzékenységet mutat, mint a 2D threshold-alapú. Annamária mérnöki alaposága, kreativitása és a diagnosztikából hozott tapasztalatai jól hasznosulnak a KDP PhD projekt megvalósításában.

Molnár Béla, kutatóprofesszor
vállalati szakértő, 3DHitech Kft.

Bevezetés

Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) – diagnosztikus, klinikai relevancia

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) egy széles körben alkalmazott molekuláris módszer genetikai aberrációk célzott igazolására, sejt készítményeken (citológiai és vérmintákon), szövettani metszeteken, elsősorban a prenatális, illetve az onkológiai diagnosztikában (Shakoori 2017). A daganatdiagnosztikában a módszer alkalmas a minta genetikailag érintett tumor sejt populációjának kiszűrésére, ami a terápiát támogató diagnosztikus döntéseket megalapozza (Chrzanowska–Kowalewski–Lewandowska 2020). A módszer az adott gént meghatározó dezoxiribonukleinsav (DNS) bázissorrendjének megfelelő, fluorkrómmal jelölt komplementer oligonukleotid szekvenciák (génpróbák) alkalmazásán alapul (Cui–Shu–Li 2016). A DNS kettős spirál ~94 °C-on átmenetileg szétválasztható, majd lehűtéskor regenerálódik, amikor a hozzáadott génpróba az eredeti, vele komplementer DNS-szál helyére beköt, fluoreszcens mikroszkópban láthatóvá téve az ép vagy aberráns gén jelenlétét, illetve a gén/kromoszóma sokszorozódását (amplifikáció), vagy kópiavesztését a tumorsejtmagokban. Az esetenként két- vagy háromféle génpróba FISH-jeleinek számszerű, illetve egymáshoz viszonyított helyzetének pontos meghatározása sejtmagonként, alapvető az értékelés megbízhatósága szempontjából. Ezért kulcskérdés a sejtmaghatárok pontos elkülönítése, ami mind szemmel, mind automatizált képanalízissel komoly kihívás (Hollandi et al. 2022). Hiányában azonban az átfedő, elkülöníthetetlen sejtmagok és a magokon kívül eső génjelek torzítják a végeredményt. Az utóbbi évtizedben a korszerű digitális mikroszkópia bármilyen festési eljárással, ideértve az fluoreszcenciát is, készített minta teljes körű és magas minőségű digitalizálását biztosítja (Varga et al. 2009). Ez lehetőséget ad minden, a patológiában szükséges adat digitális rendszerintegrálására, szabályozott jogosultsági hozzáféréssel, megosztással, diagnosztikus és kutatási felhasználásra, az adat- (GDPR) és kiber-biztonság szabályainak betartása mellett, vagyis a digitális patológia teljes körű biztonságos bevezetésére (Holub–Müller–Bil 2022). Ezzel párhuzamosan, a nagyléptékű molekuláris módszerek, elsősorban az újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing, NGS) egyre több, a daganatok kialakulásában és progressziójában alapvető szerepet játszó genetikai hiba (mutáció) feltárását tették lehetővé (Gibbs–Penava–Cuyun Carter 2023), melyek FISH vizsgálatára fokozódó klinikai igény jelentkezik. A FISH-módszer bevezetése óta mind a komplementer nukleinsavpróbák előállításának, mind jelölésüknek és az alkalmazott egyre stabilabb fluorokrómok előállításának, a fluoreszcens digitalizálásnak, illetve a jelszűrésnek a technológiája jelentősen fejlődött (Shakoori 2017). Mivel a FISH-módszer egyedi sejtek szintjén, de akár egy komplex szöveti környezetben igazolja az adott gén számbeli

vagy strukturális állapotát, esetleges relokalizációját, ezért a módszert, az antitestek specificitását kihasználó immunhisztokémia mellett, molekuláris morfológiai módszernek tekintjük.

A daganatok kialakulása – tumorheterogenitás

A daganatok kialakulása és progressziója többlépcsős folyamat, amelyet számos gén aberráns (mutáció), és/vagy abnormális (epigenetika) szabályozása irányít, és ami tumor mikrokörnyezetével folytatott interakciók során gyakran a daganat szervi, szöveti és sejtszintű heterogenitáshoz vezet (Hanahan 2022). A genetikai háttér mellett egy adott tumortípus heterogenitását, az agresszív klónok kiszekelálódását, inváziós és metasztázis képességét többek között befolyásolják az oxigén és tápanyagellátás, a tumorhatároló módosult strómasejtek (tumor asszociált fibroblasztok, cancer associated fibroblasts – CAFs), a tumorelles immunválasz, a rendelkezésre álló növekedési, illetve gátlófaktorok és az extracelluláris mátrixszal folytatott interakciók (Albini et al. 2015). Csírasejtes és/vagy szomatikus mutációk minden daganatban abnormális fehérjeexpresszióhoz, funkcionális és fenotípus-változáshoz, valamint kontrollálatlan növekedéshez vezetnek. A tumorheterogenitás jelentősen befolyásolhatja egy adott terápia sikerét, recidívák kialakulását, ezért különösen a célzott molekuláris terápiák betegkiválasztását alátámasztó biomarkerszintek igazolásakor jelentős kihívás (Ramon Cajal és mtsai 2019; Marusyk–Janiszewska–Poyak 2020). Ennek megbízható meghatározására irányuló kutatási erőfeszítések a terápiás pontosság javítása mellett segítenek megérteni a daganatprogresszió és a terápiarezisztencia hátterében álló folyamatokat is.

Digitális mikroszkópia jelentősége a patológiában

A fluoreszcens digitális technológia egyre inkább teret hódít a diagnosztika és a kutatás területén egyaránt, lehetővé téve a részletgazdagabb, pontosabb elemzéseket, ami kulcsfontosságú a betegségek korai felismerésében és kezelésében. A legszűkebb keresztmetszet a patológiai véleményalkotás teljes digitalizálása irányába a nagy felbontású, egyenként akár 2GB file méret nagyságú digitális metszetek kórház rendszerintegrálása, közvetítése, megosztása és gyors hozzáférése a diagnosztika/kutató számára (Krenács–Fonyad–Molnár 2021; Munari et al. 2023). Az utóbbi évtizedben a digitális tárgylemez mikroszkópok, szerverek és internethálózatok sebessége, valamint a digitalizált kép minősége és felbontása óriási fejlődésen ment át, és ma már számos dedikált szoftveralkalmazás segíti a minták kezelését, digitális adatbázisokba illesztését és a lehető legtöbb hasznos információ kinyerését belőlük. A technológia, a hagyományos mikroszkópia és az információtechnológia (IT) számos kombinációján keresztül, napjainkban forradalmasítja a

patológiai diagnosztikát (Munari et al. 2023). A digitális metszet másodpercek alatt a világ bármely pontjára eljuttatható, így lehetővé vált a klasszikus mikroszkóp alkalmazásától, valamint tértől és időtől független távdiagnosztika, a dinamikus telepatológia (Kiran et al. 2023). A Covid19 pandémia hatványozottan rávilágított a fizikai határok nélküli otthoni munkavégzés fontosságára a patológiában is, felgyorsítva a digitális patológia fejlesztését és a módszer bevonását a tesztfázisból a teljes értékű diagnosztika és kutatás fegyvertárába. A digitális mikroszkópia nagy mennyiségű adatot gyűjthet és tárolhat, ami lehetőséget ad a mesterséges intelligencia és gépi tanulás algoritmusok alkalmazására a betegségek diagnosztikai, valamint prognosztikai meghatározás támogatására. A digitális képpixel információk megoldást kínálnak a kép felépítő objektumok elkülönítésére, számszerűsítésére, pontos méreteinek gyors megadására, képszegmentálás, gépi tanulás és neurálhálózat-alapú mesterséges intelligencia igénybevételével (Kiszler–Paulik–Krenács 2021).

Automatizált, digitális sejtsegmentáció

A képszegmentáció a kép egyes területeinek fragmentálására, elkülönítésére irányul olyan jellegzetességek alapján, mint a szín, színintenzitás, mérés paraméter hasonlóság, illetve különbözőség, a folytonossági határok felismerése (Kiszler–Paulik–Krenács 2021). A nagy felbontásban digitalizált teljes patológiai mintában egyes objektumok, mint pl. tumor- versus normál-, vagy kötőszövet, illetve sejttípusok, valamint ezekben eltérő biomarker expressziójú csoportok elkülönítése a cél adott területen, vagy akár az egész mintában, illetve ezek mennyiségének, vagy arányaik objektív meghatározása. Számos mélytanulási algoritmust is kidolgoztak már ilyen feladatokra, melyek a neurális hálózati mintázat, vagy Bayes-féle (Bayesian) rekurzív statisztikai becslés, geometriai megközelítések, objektumhatárok felismerése, illetve Python könyvtárak felhasználásával különítik el objektumokat, sejteket (Hollandi 2021).

Munkacsoportunk ipari partnere, a digitális mikroszkópiában nemzetközileg is élenjáró 3DHISTECH Kft. (Budapest; <https://www.3dhistech.com>) együttműködésével, FISHQuant néven fejlesztett szoftvercsomagot, amely alkalmas az onkopatológiai diagnosztikában fontos számbeli (amplifikáció, illetve kópiavesztés), valamint térbeli (transzlokáció, illetve fúzió) genetikai aberrációk FISH szignáljainak automatizált kiértékelésére digitalizált teljes klinikai mintákon (Csizmadia–Krenács 2021). A kromoszóma/gén abnormalitások gépi kontrollal végzett igazolásához a fluoreszcens próba szignálok egyedi sejtmagokon belüli automatikus felismerése szükséges (Irshad et al. 2014). Bár a sejtmagok megbízható automatizált elkülönítése FISH alkalmazásokban számtalan nehézséget hordoz, erre irányuló közölt tudományos munkák eddig alig születtek. Ez is indokolja a program ilyen irányú korszerűsítését célzó törekvéseinket.

Digitális képanalízis a FISH-minták kiértékelésében – projekt céljai

A klasszikus FISH reakciókat vizsgáló epifluoreszcens mikroszkópos rendszerek csupán egyedi látóterek, vagy néhány látóteret összekapcsoló digitális képek alapján engedik meg a diagnosztikus véleményalkotást (Levsky–Singer 2003). Ráadásul, a $\sim 0,5 \mu\text{m}$ átmérőjű FISH génjelek a hagyományos epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálat, de akár a tárolás során is gyorsan halványodnak, ezért rövid időn belüli vizsgálatot és fotóarchiválást igényelnek (Csizmadia–Krenács 2021). Továbbá, a $\sim 5 \mu\text{m}$ vastag mintákban az immerziós (63 \times , ill. 100 \times) objektívek csökkent mélységélessége miatt jelentős számú (akár 15) optikai sík digitális rögzítésének igénye kiterjedt mintaterületen olyan problémákat vet fel, amit csak a legnagyobb elérhető (0,85-as) numerikus apertúrájú (NA) 40 \times -os objektívvel felszerelt digitális mikroszkópia tud kezelni. A legtöbb szöveti, de akár citológiai daganatminta heterogén sejtpopulációkból áll és sok ezer daganatsejtet tartalmaz, ami lehetőséget kínál a növekvő klinikai jelentőséggel bíró tumorheterogenitás pontos becslésére is (Cajal és mtsai 2020). Erre a klasszikus módszerek nem, de a korszerű teljes metszet/minta digitalizálást követő képszegmentálási, gépi tanulási, illetve mesterséges intelligencia alkalmazásán alapuló képanalízis módszerek kiválóan alkalmasak. Segítségükkel a FISH reakcióval kezelt teljes klinikai mintákból olyan részletes minőségi és mennyiségi információk nyerhetők, melyek szemkontrollal nem hozzáférhetők. Jelen kutatásunkban egyrészt számos daganattípus szövettani, illetve sejtblokkmetszet, vérkenet és sejttenyészet mintáin, számos genetikai célpont kimutatása után digitalizált készítményeken validáljuk a FISHQuant program megfelelőségét a két legfontosabb próbatípus, azaz a kópiaszám-változás, illetve a géntranszlokációk automatizált értékelésében. Az eredmények alkalmasak az algoritmusok előnyeinek és hiányosságainak feltárására, segítve a továbbfejlesztés irányainak meghatározására. Ehhez kapcsolódik másik célunk: a program automatizált sejtmag-segmentáló algoritmusának korszerűsítése, aminek érdekében két-, illetve háromdimenziós (2D, ill. 3D) magsegmentáló algoritmusok teljesítőképességét hasonlítjuk össze klinikai mintákon végzett FISH reakciókon, a legmegfelelőbb kiválasztásához és a programcsomagba integrálásához.

Anyag és módszer

Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

A reakciókat a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, ill. a Daganatpatológiai és Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium (Tsejt Kft., Szeged) archívumából származó diagnosztizált esetek formalinban rögzített, paraffinba ágyazott szövetblokkjaiból készült metszeteken, az emlőcarcinoma sejtvonalak

(SK-BR-3, MDA-MB-453, ill. ZR-75-1) (<https://www.cellousaurus.org>) fedőlemezeire növesztett tenyészetek, illetve sejtblokkjain végeztük a Patológiai Intézet rutin FISH-protokollja alapján. Röviden, a minták kezelése az alábbi lépéseket foglalta magába: 1) deparaffinálás xilol, majd etanol sorban (3× 30'), majd mosás 2× 30' 2×-es SSC pufferben; 2) feltárás 15' pH 6,0-os citrát pufferben, hűtés 15' szobahőre, mosás 30' 2×SSC pufferben, majd proteázemésztés 15', 10%-os pepsinoldatban 37 °C-on; 3) mosás 30' 2×-es SSC pufferben, dehidráció emelkedő etanolsorban; 4) 6 µl specifikus FISH-próba, 10' denaturálás 85 °C, éjszakán át inkubálás/hibridizálás 37 °C-on; 5) mosás 2×-es SSC pufferben, utána 0,4×-es SSC-ben 70 °C-on, majd 0,1% NP-40 detergenst tartalmazó 2×-es SSC-ben 5'; 6) végül magfestés 0,01%-os DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) oldattal. Releváns sorozatmetszeteken a tumoros gótok mintánkénti kijelöléséhez (annotáció) HER2 immunhisztokémiai reakciókat is végeztünk a korábban közölték szerint (Székely 2022). Röviden, 4 µm vastag metszeteken a Roche-Ventana BenchMark (Indianapolis, IN, USA) automatizált immunfestőben deparaffinálást követően lúgos pH-jú CCI pufferben 60 percig végzett antigénfeltárás után monoklonális nyúl-anti-HER2 (klón: 4B5; RTU: 1:2) immunoglobulinokkal 60 perces, majd UltraView (Roche-Ventana) detektáló rendszerrel 20 perces inkubálást követően, a színreakciót a rendszer Diaminobenzidin (DAB) – hidrogénperoxid kromogén-szubsztrát kittel barna színben tette láthatóvá, végül a sejtmagokat hematoxilinnel festéssel tüntette fel. P1000 Diagnostic Scanner DX (20× NA:0.8 Plan Apochromat; 40× digitális nagyítás, 3DHISTECH Kft.) rendszerrel digitalizáltuk, és a MembraneQuant (IVDD) képelemző szoftverrel értékeltük ki előre kiválasztott HER2 elválasztási küszöbértékeket használva automatikusan 3+, 2+, 1+ és negatív tumorsejteket azonosítottunk.

A fluoreszcens jelölt minták digitalizálása Panoramic MIDI II fluoreszcens szkennelővel történt (40×, NA:0.85 Plan Apochromat objektív, 3DHISTECH Kft.). A FISH-reakciókat nagy érzékenységű fekete-fehér, monokróm kamerával (PCO.edge 4.2 bi) a DAPI (Ex:358nm-Em:405nm), Spectrum Green (497/30nm-Em:538/44nm), ill. Spectrum Orange (Ex:543/22nm, Em:586/20nm) fluoreszcens festékek optikai tulajdonságainak megfelelő szűrőkkel és LED (Lumencor Spectra X) megvilágító egységgel több síkban (8 sík, 0,4 µm síktávolság) olvastuk be, FISHQuant (IVDD) képanalizáló szoftver algoritmusokkal (3DHISTECH Kft.) elemeztük, majd az eredményeket a hagyományos szemkontrollal végzett értékeléssel hasonlítottuk össze (Csizmadia–Krenács 2021). Továbbá mesterségesintelligencia-alapú Cellpose algoritmust is alkalmaztunk, mely egy gépi tanuláson alapuló sejtmagszegmentáló, amely a neuronhálózatok elveire épül.

Modellrendszerek a mennyiségi képanalízis algoritmusok beállításához és teszteléséhez

Az epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusú kódoló gén (HER2) kópiaszám-emelkedése (amplifikáció) felülregulálja a receptor fehérje szintjét a sejtmembránban, ami növekedési jelátviteli utak működését kontrollálatlanul aktiválva agresszív emlőcarcinomát okoz (Moasser 2007). Az emlőrák molekuláris altípusait a diagnózis során immunhisztokémiával (IHC) erősítettük meg. A HER2 pozitív emlőrák 10 esetéből származó duplikált magok mellett a luminális A (10 eset), a Luminális B (8 eset) és a tripla negatív (7 eset) altípusok is szerepeltek kontrollként. A génamplifikáció (számbeli eltérés) HER2 gén és a gént hordozó 17-es kromoszóma centromerikus régióját felismerő kombinált FISH-próbával (ERBB2/CEP17 ZytoPure FISH, Bremerhaven, Németország) vizsgáltuk, ahol a >2 HER2/Cep17 arány hatékony trastuzumab antitest terápiát indikál az egyéb terápiára rosszul reagáló emlőcarcinoma altípusban (Singh-Singh-Singh 2016). A gyógyszer-antitest konjugátumok hatékonyabb onkoterápiás hatása miatt a legutóbbi időben az ún. „HER2-low”, vagyis HER 1-2+ pozitív esetek pontosabb azonosításának igénye is felmerült (Popovic et al. 2023). Szöveti metszetek mellett, ismert HER2 expressziójú emlőcarcinoma tumorsejtvonalak tenyészetek, illetve sejtblokkjainak FISH-reakcióit is elemeztük. Ezek a HER2 gén amplifikációt mutató SK-BR-3 (Davidson-Gorringe-Chin 2000), az androgen receptor pozitív tripla negatív tekintett, de HER2 1-2+ pozitivitást mutató MDA-MB-453 (Xiao-Gao-Telford 2008), illetve a luminális B emlőrák altípusba sorolt közel 3+ HER2 pozitivitást mutató ZR-75-1 sejtvonalak voltak (Lacroix-Leclercq 2004).

FISH-minták digitalizálásának beállítása

A fluoreszcens tárgylemez digitalizálása speciális szkennereket igényel. A fluorokrómok gerjesztése LED megvilágító egységgel történik adott hullámhosszon. Az abszorbeált energia a fluorokróm elektronjait magasabb energiaszintre emeli, majd azok viszonylag gyorsan fotonokat kibocsátva visszatérnek alapállapotukba, amit fluoreszcenciaként detektálunk. A kibocsátott fluoreszcens fény érzékelésére sCMOS (scientific complementary metal oxide semiconductor), PCO.edge 4.2 bi (back illumination) háttér-megvilágítású monokróm kamerát használunk. A kamera kvantumhatékonysági (QE) értéke megadja az érzékelő foton elektronná való átalakító képességének mértékét az adott hullámhosszon. A fluoreszcens szignálok érzékeléséhez a lehető legmagasabb QE értékű monokróm kamerát célszerű választani, annak érdekében, hogy csökkentett gerjesztési idő mellett, megóvva a mintát a gyors kiégéstől, kiváló minőségű fluoreszcens képet kapjunk. A szkenneléshez szükséges látóterek (FOV-k) száma függ a biológiai minta méretétől, az objektív nagyításától, és a fluoreszcens csatornák,

valamint a digitalizált Z(mélységi)-rétegek számától. A homogén fluoreszcencia intenzitás előállításához háttérkompenzációt alkalmazunk. A szkennerek optika szferikus (gyűjtőképesség hiánya) aberrációja miatt a génjelek területei a kétdimenziós összejtett („extended”) kép értékelése során nagyobbak lehetnek, mint azt mikroszkópos megjelenésük alapján várnánk. A fókuszban lévő területeken kívül minden specifikus jelet tartalmazó réteg szintén némileg gerjesztett állapotban lehet, melyek vetületei „elmosódott” jeleket eredményeznek. Matematikai elmélet szerint a leképezés során kapott kép csak a valódi kép és a rendszer impulzív válaszána konvolúciójaként jön létre. Egy pont hozzájárulása a képhez a pontterjedési függvény (PSF) írható le, amely alakját először elméleti modellekkel kell meghatározni. Ezek azonban nem veszik figyelembe a mikroszkóp fizikai felépítését, ezért a fluoreszcencia diagnosztikai digitalizálásához a Richardson–Lucy dekonvolúciós algoritmust alkalmaztuk a szferikus aberráció megjelenésének kompenzálására (Dell’Acqua-Scifo-Rizzo 2010).

A FISHQuant algoritmus rövid bemutatása

A FISHQuant automatizált képelemző algoritmus a vizsgált génhibát hordozó pozitív sejtek automatikus azonosítására alkalmas, megkülönböztetve azokat a keresett mutációt nem hordozóktól (Kiszler et al. 2012). A módszert évek óta alapvetően kutatási célra fejlesztjük. Jelen vizsgálataink egyik célja, hogy a szigorúbb előírásoknak megfelelő diagnosztikus célra is alkalmas legyen a program. Első lépésként az algoritmus a sejtmagokat szegmentálja/különbíti el, majd a detektált génjeleket rendeli hozzá a detektált sejtmagokhoz. A fluoreszcensen jelzett keresett objektumok észlelése általában a háttérhez képest magasabb pixel intenzitásértékük alapján történik, egy fix küszöbérték mentén. Mivel a jelölt organelumok fluoreszcenciaintenzitása változhat területről területre, vagy épp mintáról mintára, a küszöbértéket gyakran manuálisan állítjuk be, akár fluoreszcencia csatornánként is. További nehézséget jelenthet a mutációt hordozó sejtek és az ép sejtpopuláció szignál rendszerek eltérő jelintenzitása is, így a küszöbérték-alapú szegmentálás képminőségfüggő. A diagnosztikus irányelvek szerinti FISH-értékelés ~200 sejt átnézését igényli, ami szemkontrollal, hagyományosan sötét helyiségben fásztó és időigényes, ráadásul a jelek gyorsan halványulnak, kiégnek. Ezzel szemben a digitális képanalízis a reprezentatív tumorgócok kijelölése után a teljes tumorminta objektív értékelését teszi lehetővé, ami mintánként akár több ezer sejtre is kiterjed. Így a digitális képanalízis a tumor heterogenitásáról is pontos, statisztikailag releváns információt ad.

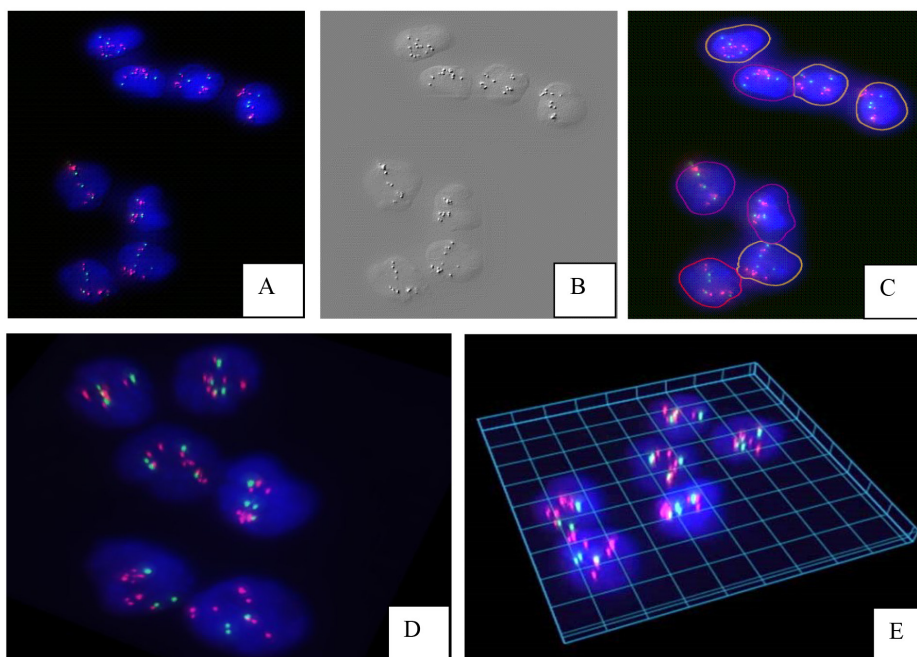
Eredmények és megbeszélés

Threshold-alapú FISH képszegmentáló algoritmus

A specifikus komplementer oligonukleotidok fluoreszcencia jelei mellett a fluorokrómok nemspecifikus kötődése is bekövetkezhet különösen a kollagén mátrixhoz, melyet figyelembe kell venni a génszignál-detektáló alkalmazásoknál. A képfeldolgozó algoritmus vizsgálja az autofluoreszcencia intenzitását, a jelek méretét, intenzitását, valamint a szomszédos génjelek kontrasztját. Ha alacsony az intenzitáskülönbség a génszignál és a háttér intenzitása között, az algoritmus nem képes pontos vágóvonalat meghatározni a szegmentáláshoz. A sejtmagok detekciójához használt „Watershed (vízvázlat) Threshold” algoritmus régiónövelő módszer nevét a hegycsúcsok közötti völgyekben összegyűlt elkülönülő vízről kapta (Malpica N., Ortiz de Solórzano C 1997). Az algoritmus feltölti a medencéket a magok helyéről kiindulva, távolságtranszformációval. Feltételezi, hogy az azonos területen belül lévő szomszédos pixelek hasonló intenzitásértékekkel rendelkeznek. A sejtmagok azonosítását a génszignálok detektálása követi, melyeket a szoftver egy már jelölt sejtmaghoz rendeli. A génszignál szegmentációjának első lépése a „FindMaxima” algoritmus futtatása a jelcsatornákon, amely meghatározza a specifikus pixelintenzitás csúcsait, majd a jeleket a Watershed algoritmusmal a völgyek, vagyis az intenzitáshatárok felé növeli. Meghatározott intenzitási szint feletti szignálokat egy specifikus jellé olvasztja, míg az ez alatti intenzitástartományokat háttérnek tekinti. A potenciális jeleket a kiválasztott FISH-próba osztályozási szabálya alapján értékeli ki a rendszer. A szoftveralkalmazás több lehetőséget biztosít a képelemzés eredményeinek megjelenítésére és értelmezésére (1. ábra).

FISHQuant digitális képfeldolgozó alkalmazás validációja

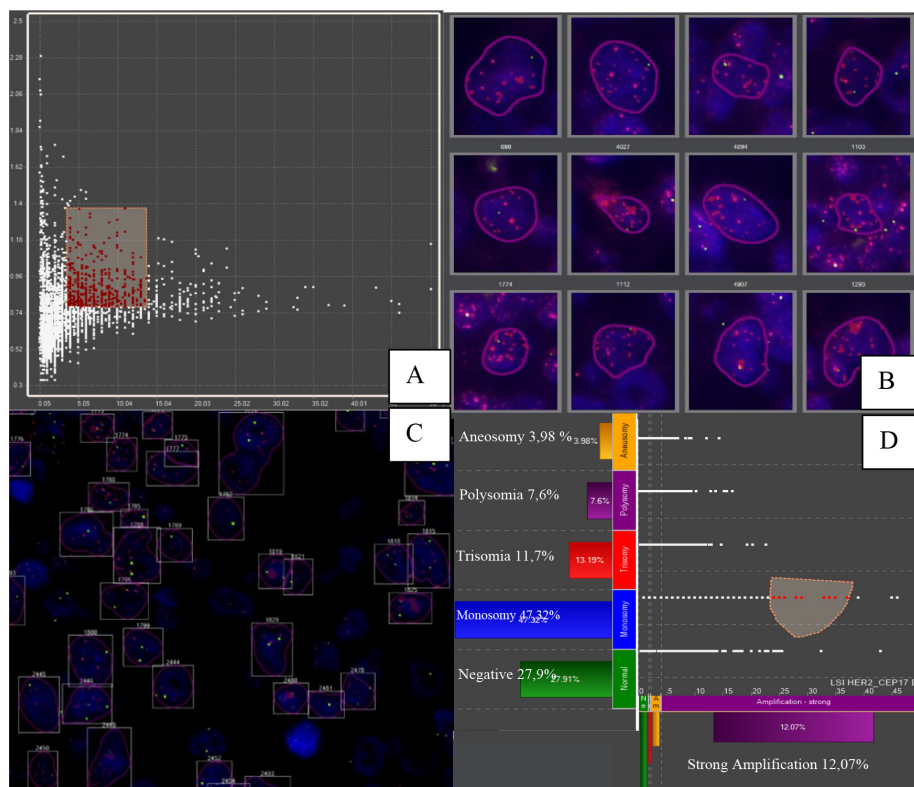
Immunhisztokémiai (IHC) pozitívitás alapján több emlőrák TMA mintát választottunk ki a HER2/Cep17 FISH-hez. A HER2/Cep17 ZytoLight® próbakészlettel kapott eredmények elemzéséhez a génamplifikáció kiértékelésére alkalmas osztályozási algoritmust használtuk. Nyilvánvalóan HER2 3+ esetekben, a sejtmembrán immunreakciók (átmenőfényes digitális mikroszkóppal szkennelve, 40× NA:0.85) erősen pozitívak voltak a tumorsejtek többségében, így mind a MembraneQuant, mind a FISHQuant osztályozással tumor heterogenitást igazoltak. Mindkét programban valamennyi azonosított tumorsejtet (HER2 membrán pozitív) és azok sejtmagjait (FISH HER2 amplifikált) összegyűjtöttük, a kiértékelési kategóriák szerint osztályoztuk, majd parallel galériába rendezve vizsgáltuk (2. ábra).



1. ábra

SKBR3 sejtvonal HER2 (piros)/Cep17 (zöld) FISH-próbával jelölve, DAPI-val festett sejtmagokkal. Több Z síkban digitalizált metszet extended (összecsajtott) fókusz képe (A), digitális differenciális interferencia kontraszt (DDIC, Digital Differential Interference Contrast), gén szignálok kontrasztos megjelenítésére (B), FISHQuant kép szegmentációs képe (C). 1:1 63× nagyítású kétdimenziós kép (D), amelyet a térbeli jelrendszer hangsúlyozása érdekében 3D-ben is megjeleníthetünk (E)

Forrás: saját ábra



2. ábra

HER2 (piros) és Cep17 (zöld) FISH-reakció emlőrák metszetén, magas szintű HER2 génamplifikációt azonosítva FISHQuant algoritmussal. Az eltérő amplifikációjú sejtmagok eloszlása látható az ábrázoló grafikonokon (A). Galérianézet az egyes azonosított magas HER2 génamplifikációjú sejtekről (B), melyeket egyesével relokalizálni, vizsgálni lehet in situ szöveti metszeten (D). Grafikon, amely összefoglalja az elsődleges (x tengely, amplifikáció) és a másodlagos (y tengely, Cep17 ploiditás) jellemzőket (D)

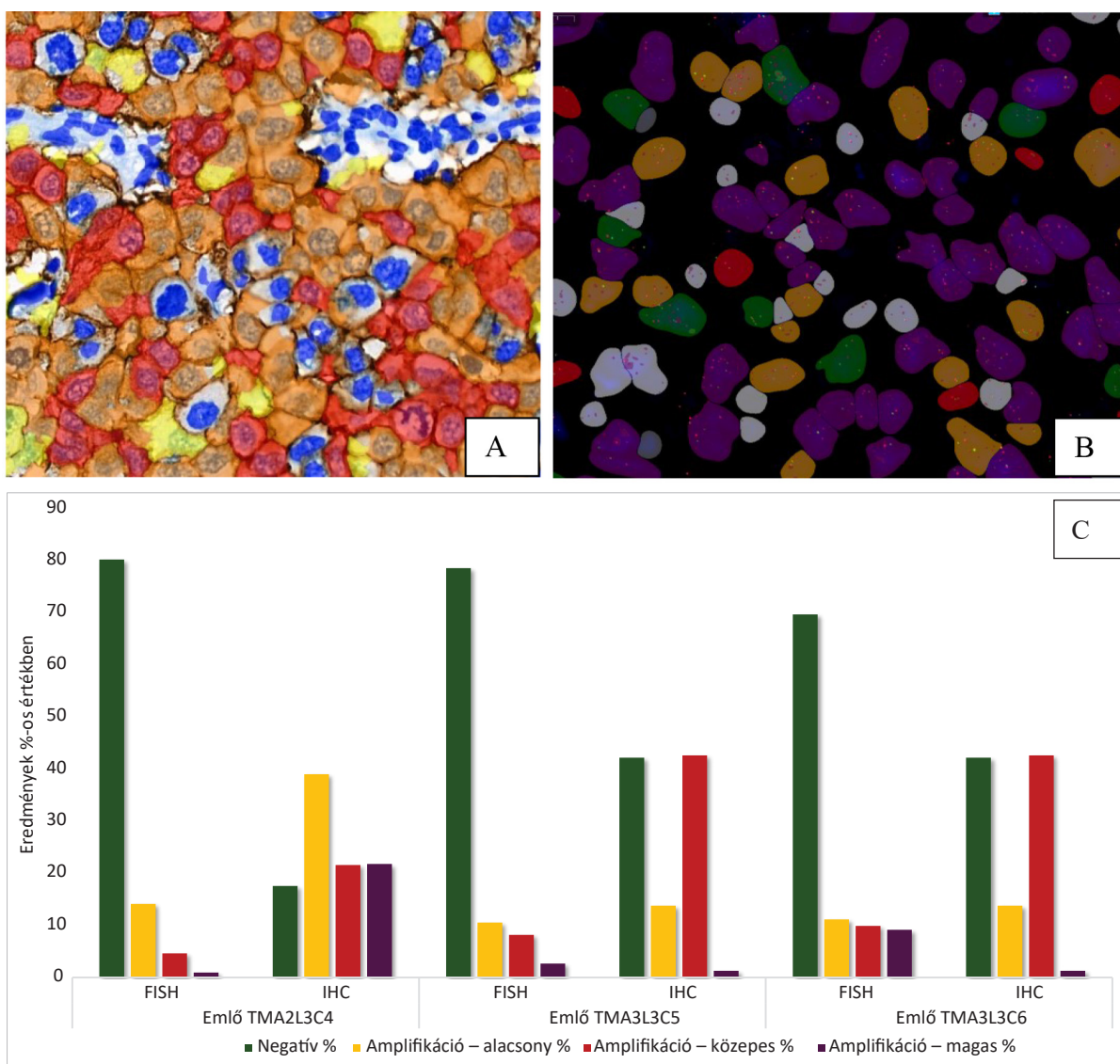
Forrás: Csizmadia A., & Krenács T. (2021) A fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) eredményének automatizált kiértékelése. In: Krenács T, Bödör Cs., Matolcsy A. (szerk.) Patológiai és Molekuláris Onkológia Módszerek.

A vizsgált elsődleges, specifikus genetikai aberráció (amplifikáció) mellett azonban a tumorsejt-populációk másodlagos, nonspecifikus, de klinikai jelentőséggel bíró eltéréseket is hordozhatnak (2D. ábra). Ezek automatizált digitális elemzéssel ugyancsak pontosan meghatározhatók, azonban hagyományos értékelésnél rejtve maradnak.

Automatizált HER2/Cep17 FISH-elemzéssel feltárt másodlagos, ploiditási rendellenességek

Három olyan esetet választottunk, ahol a 4B5 klón immunhisztokémiai reakciója HER2 2+ pozitivitást mutatott (BreastTMA2L3C4, BreastTMA3L3C5 és

TMA3L3C6) a daganatsejtek 30-40%-ában mérsékelt körkörös membránfestés alapján, és a MembraneQuant (IVDD) képelemző szoftver eredményei szerint (Willmore- Holden-Layfield 2005). A sorozatmetszeteken készült HER2 FISH-pozitivitást FISHQuant programmal vizsgáltuk (3. ábra). Összehasonlítottuk a HER2 FISH és a fehérje expresszálo pozitív tumorsejtek arányát. Általánosságban azt tapasztaltuk, hogy a fehérjeexpresszió több HER2 pozitív sejtpopulációt igazolt, mint az genetikailag FISHQuant által igazolt lett volna, vagyis a sejtek ~40 százaléka gyenge vagy közepes immunpozitivitást mutatott (~2+), míg génamplifikációt a FISHQuant alkalmazás nem igazolt (3C. ábra), aminek akár transzkripció-szabályozási okai is lehetnek.



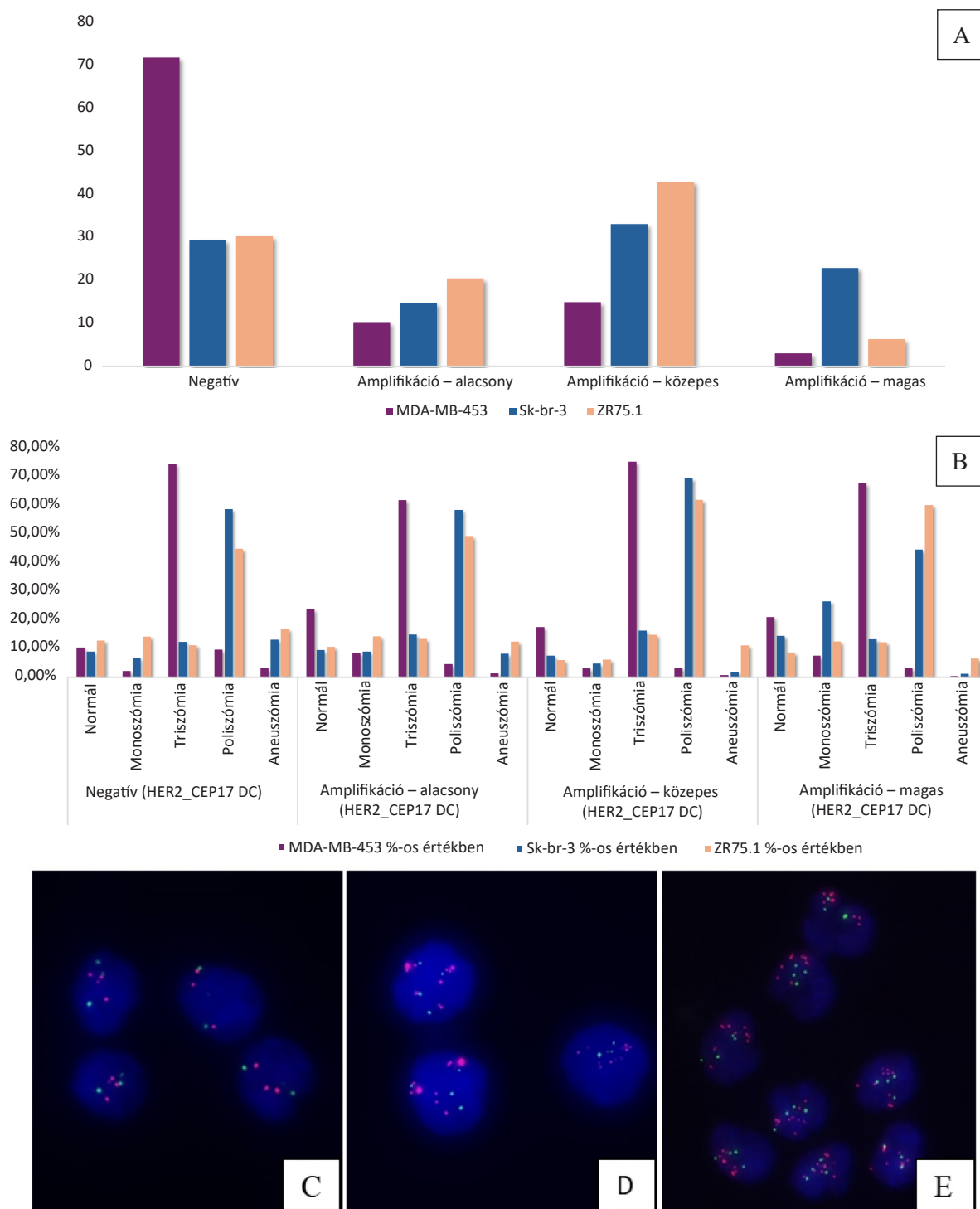
3. ábra

Emlőrákmetszet HER2 immunreakcióval jelölve, MembraneQuant® algoritlussal kiértékelve (A). Az alkalmazás a HER2 fehérjeexpresszálo sejteket pirossal (3+), a közepes pozitivitást (2+) narancssárgával, valamint gyenge (1+) pozitivitást sárga színnel a jelzi. A HER2/Cep17 FISH-reakciót (B) korábban immunhisztokémiával jelölt területen elvégezve a FISHQuant program kevesebb magasan amplifikált sejtet talált (B). Az összefoglaló grafikon az IHC és FISH eredmények összehasonlítását mutatja 3 esetben (C), a HER2/Cep17 arányok erős amplifikációt jelentenek >4 (lila), közepes amplifikációnál >2,2-≤4 között (piros), gyenge amplifikációt >1,8-≤2,2 között (narancs) és negatívát. 0≤1,8 közötti eredmény (zöld) (a 2013-as ASCO/CAP Her2 irányelv alapján)

Forrás: Muller et al. 2015

A CEP17 kromoszóma száma is befolyásolja a HER2 gén kópiaszámát és ezzel az amplifikáció mértékét (Wang-Saboorian-Frenkel 2002). Amennyiben csak a 17-es kromoszóma számára fókuszálunk, akkor annak számbeli eltérései (ploiditása) igazolható, és bár a képanalízis valamennyi amplifikációs osztályban kromoszóma kópiaszám-rendellenességet azonosít, az eredményeket

óvatosan kell kezelni, mivel egyes jelek véletlenszerű vesztese a sejtmagok metszésével történő csonkolása fals eredményhez vezethet. A másodlagos Cep17-alapú számbeli eltérések, különösen az emlőrákos metszetekben talált magas szintű monoszómia további vizsgálata érdekében ismert HER2 státuszú emlőrák sejtvonalakat is tanulmányoztunk.



4. ábra

FISHQuant-analízis HER2/Cep17 (piros/zöld) próbával jelölt emlőrák sejtvonalakon. Erős amplifikáció >4 -nél, közepes, mérsékelt amplifikáció $>2,2$ - ≤ 4 , gyenge amplifikáció $>1,8$ - $\leq 2,2$, ill. negatív eredmény $0 \leq 1,8$ HER2/Cep17 szignálarányok alapján (a 2013-as ASCO/CAP Her2 irányelv alapján) (Muller et al. 2015) (A). A 17. kromoszóma másodlagos ploiditás analízise a Cep17 kópiaszám alapján a HER2 amplifikációs klasztereken belül (B). Her2/CEP17 FISH MDA-MB-4531 -ben (C), Sk-BR-3 (D) és Her2/CEP17 FISH ZR-75-1 (E) sejtvonalakban

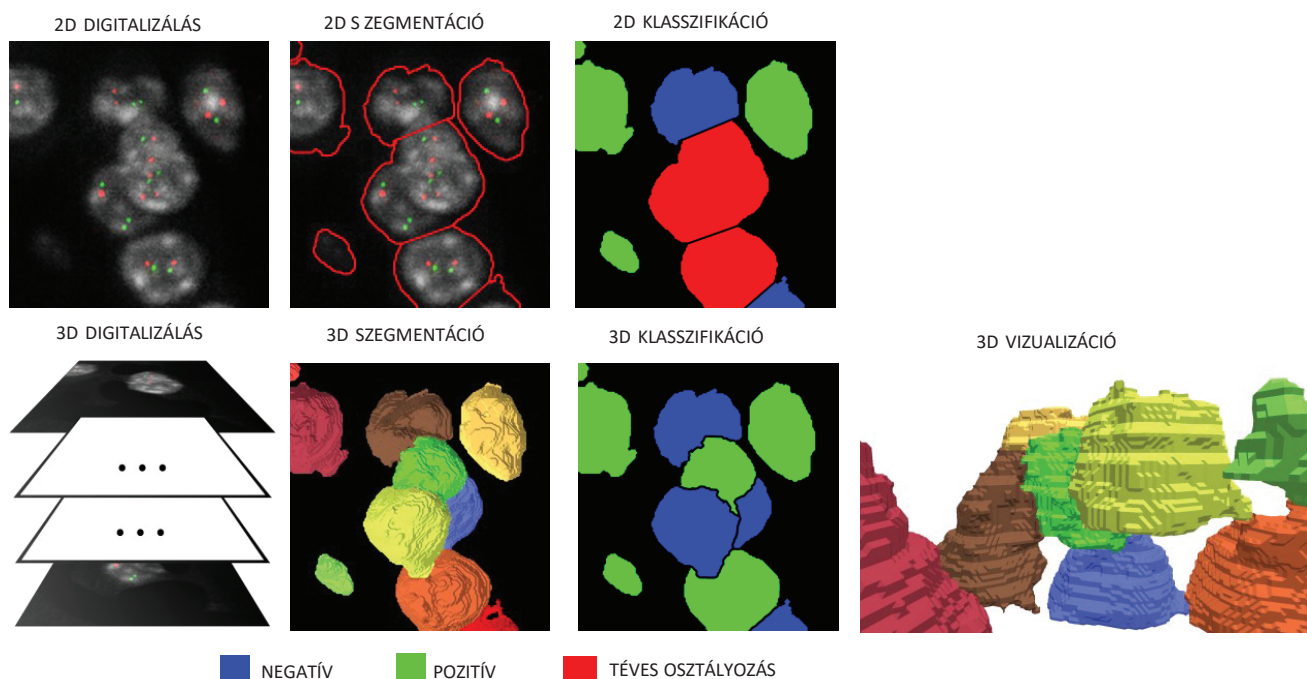
A FISHQuant tesztelése HER2 FISH-reakcióval emlőcarcinoma sejtvonalakban

A tumorsejtmagok általánosságban nagyobbak, mint a minta ~4-5 µm metszet vastagsága, ami sejtmagcsonkoldást és jelvesztést eredményezhet, valamint a specifikus szignálok elvesztésének oka lehet továbbá a helytelen kétdimenziós sejtmag-szegmentáció is. Metszetben, ha a valós méretnél kisebb sejtmagterület kerül azonosításra, a metszési síkon kívül eső szignálok elvesznek. A sejtenyészeten a sejtmaghatárok általában jól elkülönülnek, ami objektívebb FISH HER2/Cep17 értékelést tesz lehetővé. Vizsgálatunkhoz SK-BR-3-at, egy pleurális folyadékgyüleméből származó HER2-t túlexpresszáló sejtvonalat (Lacroix–Leclercq 2004), MDA-MB-453-at egy androgénreceptor-pozitív és „három negatív”, de HER2 2+ pozitív sejtvonalat (Xiao-Gao-Telford 2008), valamint ZR-75-1 egy lúminális B típusú emlőrák sejtvonalat használtunk, amely a HER2 túlzott expresszióját mutatja (Davidson-Gorringe-Chin 2000). A FISHQuant programmal minden sejtvonalban 2000–6000 kiértékelt sejt alapján csak az SK-BR-3 bizonyult biológiailag HER2-gén amplifikáltnak (Xiao-Gao-Telford 2008) a CAP 2018-as (Collage of American Pathologists) irányelvek szerint (Wang-Ding-Sun 2019), míg a ZR-75-1 kisebb mértékben, illetve az MDA-MB-453 csak gyenge vagy mérsékelt HER2 amplifikációt mutatott (5A. ábra), amely összhangban van a biológiai negativitással, de némileg megerősítette a HER2 fehérje expresszióját a tumorsejt membránokban (Lacroix–Leclercq 2004;

Daigo-Chin-Gorringe 2000) (4A. ábra). Az egyes amplifikációs klaszterekben a 17-es kromoszóma kópiaszám alapján a másodlagos eltéréseket is vizsgáltuk, ami az MDA-MB-453 sejtvonal esetében a 17-es kromoszóma triszómiájának magas arányát mutatta, míg az SK-BR-3 és a ZR-75-1 sejtvonalaknál a poliszómia dominált (4B. ábra). Az ép sejtmaggal rendelkező sejtvonalak (8 sík, 0,4 µm síktávolság) alkalmasak Z-síkok felhasználásával, minden 0,5 µm-nél nagyobb átmérőjű jel feltárására, lehetőséget kínáltak arra, hogy automatizált digitális képanalízissel pontos és objektív eredményeket kapjunk nagy tumorsejt-populációkban. Ez a megközelítés adaptálható a tumor heterogenitásának feltárására bármely tenyésztett sejtvonalban, exfoliatív vagy aspirációs citológiai minták sejtkenetén alapuló FISH-próbák felhasználásával.

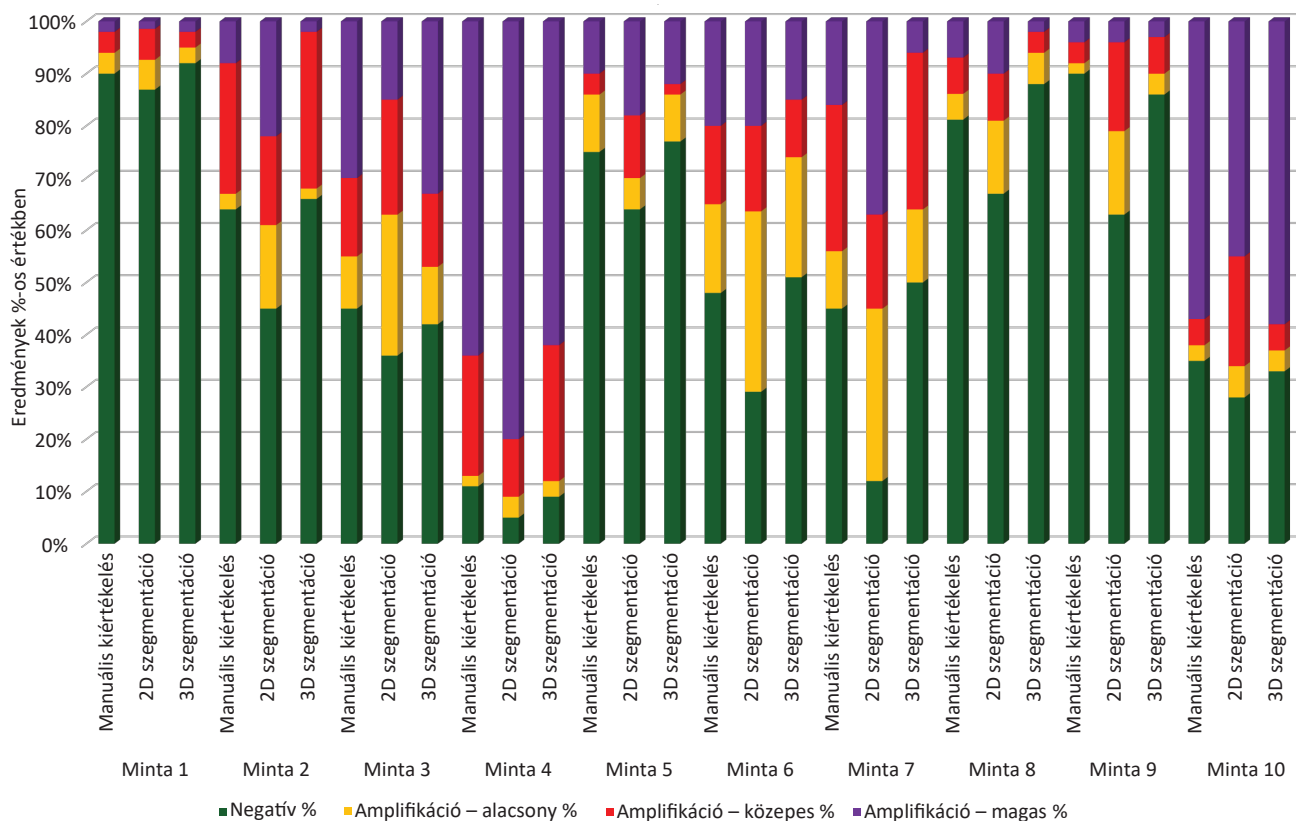
Háromdimenziós képszegmentálás

A FISH threshold-alapú digitális képfeldolgozó algoritmusok 2D sejtmagdetekción alapulnak, amely nélkülözi a genetikai jelek elemzésének mélységi térbeli kontextusait. Ezzel ellentétben a 3D elemzés az említett hiányosságokra válaszként biztosítja a sejtmagon belüli szerkezetek jobb megértését, bár az intenzitáskülönbség és objektum alak detekcióalapú képszegmentálás összetett mintázatú, alacsony intenzitású képeken, még mesterségesintelligencia-algoritmusok számára is kihívást jelent. A neurális hálózatok elvén működő megoldások számításlag intenzívebbek, de teljesen automatizált, robusztus



5. ábra | Kűszöbérték-alapú 2D képszegmentálás lépései (felső sor) és eredményei a Cellpose 3D szegmentációs algoritmushoz (alsó sor, plusz jobb közép) viszonyítva

Forrás: Csizmadia, A., Jonas, V., Paulik, R., Krenács, T., & Molnár, B. (2022) Comparison of different nuclear segmentation algorithms on the digital image of HER2 FISH labelled breast cancer tissue sample. *Virchows Archive*, Vol. 481. Suppl 1. S1–S364.



6. ábra

HER2/CEp17 FISH-próbával jelölt 10 emlőcarcinoma reakcióinak összehasonlító elemzése FISHQuant (2D), Cellpose (3D) és szemkontrollal végzett kiértékelés képelemzési eredménye alapján

Forrás: Csizmadia, A., Jonas, V., Paulik, R., Krenács, T., & Molnár, B. (2022) Comparison of different nuclear segmentation algorithms on the digital image of HER2 FISH labelled breast cancer tissue sample. *Virchows Archive*, Vol. 481. Suppl 1. S1–S364.

képszegmentálást, jobb skalázhatóságot és nagy adathalmazok kezelését kínálják mérsékelt emberi beavatkozás és megnövelt reprodukálhatóság mellett. A sejtmagtér-fogat szegmentáción alapuló közelítése precízebb próba kiértékelési szabálykövetést eredményez. Sejtmagszegmentálás céljából teszteltük a Cellpose (Stringer–Wang 2021) mély tanulású mesterségesintelligencia-alapú 3D képfeldolgozó algoritmust, amelyet több mint 70 000 szegmentált objektumot tartalmazó, eltérő képekből álló adatkészletekkel tanítottak. Mi az eredetileg tanított verzióval dolgoztunk (5. ábra).

A HER2/CEP17 FISH digitális képeket három módszerrel értékeltük ki. Az eredmények összehasonlítása érdekében a 2D és 3D képfeldolgozó algoritmusok objektív eredményei mellett manuális kiértékelést is végeztünk a SlideViewer (3DHISTECH Kft.) digitális képmegjelenítő alkalmazásban. A FISHQuant (IVDD) képelemző szoftver a több síkban digitalizált képek összejejtett („extended”) képén, 2D képrétegen szegmentált, míg a sejtmagdetektálás 3D vizsgálatát Cellpose algoritlussal végeztük. A három értékelési módszer eredményeit összevetve azt találtuk, hogy a manuális vizsgálat és a Cellpose algoritmus eredményei nagyon magas korrelációt mutatnak ($r = 0,991$), míg a FISHQuant threshold küszöbérték-alapú 2D magszegmentáció eredményei

10-20%-kal több pozitív sejtpopulációt azonosítottak a manuális kiértékeléshez képest ($r = 0,9328$) (6. ábra). Összehasonlítva a 3D mesterségesintelligencia-alapú képanalízis eredményét a 2D kiértékeléssel, az eredmények korrelációja ($r = 0,9107$) hasonló értéket ad, mint a manuális és 3D képanalízis esetében, igazolva ezzel, hogy a 3D sejtmag-szegmentáció jobban közelít a manuális síkon átívelő kiértékeléshez (6. ábra).

A FISHQuant algoritmus magasabb amplifikációdetektálás oka a több Z síkban rögzített kép összesítéséből kialakított, valamennyi síkból a magas intenzitású pixeleket tartalmazó összejejtett („extended”) képen megjelenő szferikus aberráció lehet. A 2D magok mérete nagyobb lehet, mint valójában, ami miatt több génszignál, akár más-más síkból, nem a megfelelő sejtmagban lokalizálódhat.

Következtetések

A mikroszkópos minták teljes digitalizálása mára nagymértékben elősegítette a patológia tértől és időtől független művelését a nagy felbontású minták azonnali megosztásával a világ bármely pontján. A teljes digitalizálás a célzott génhibákat igazoló FISH-próbákkal jelölt minták automatizált kiértékelésére is lehetőséget ad.

Többféle daganattípusban és próbával végzett vizsgálataink alátámasztották, hogy a kutatási célra fejlesztett FISHQuant programunk alkalmas a genetikai aberrációk igazolására szigorúbb diagnosztikus elvárásoknak megfelelően is. Ráadásul az algoritmus mintánként akár több ezer tumorsejtet szortíroz, így a módszer hasznos a terápiás jelentőségű tumorheterogenitás meghatározására. Ugyancsak igazoltuk, hogy a génelek sejtmagon belüli lokalizálására a 3D-s sejtmagszegmentálás pontosabb eredményt ad, mint a jelenlegi 2D algoritmus, tehát a programunk ilyen irányú továbbfejlesztése javasolt.

Köszönetnyilvánítás

A KDP-14-3/PALY-2021 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a KDP-2020 pályázati program finanszírozásában valósult meg.



Irodalomjegyzék

- Albini, A., Bruno, A., Gallo, C., Pajardi, G., Noonan, D., & Dallaglio, K. (2015) Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity. *Connect Tissue Research*, Vol. 56. No. 5. pp. 414–425. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1066780>
- Cajal, R., Sesé, M., Capdevila, C., Aasen, T., De Mattos-Arruda, L., Diaz-Cano, J., Hernandez-Losa, J., & Castellví, J. (2020) Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *Journal of Molecular Medicine*, Vol. 98. No. 2. pp. 161–177.
- Chranowska, N., Kowalewski, J., & Lewandowska, A. (2020) Use of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors. *Molecules*, Vol. 25. No. 8. 1864. <https://doi.org/10.3390/molecules25081864>
- Cui, C., Shu, W., & Li, P. (2016) Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00089>
- Csizmadia, A., Jonas, V., Paulik, R., Krenács, T., & Molnár, B. (2022) Comparison of different nuclear segmentation algorithms on the digital image of HER2 FISH labelled breast cancer tissue sample. *Virchows Archive*, Vol. 481. Suppl 1. S1–S364.
- Csizmadia A., & Krenács, T. (2021) A fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) eredményének automatizált kiértékelése. In: Krenács T, Bődör Cs., Matolcsy A. (szerk.) *Patológiai és molekuláris onkodiagnosztikai módszerek*. Medicina Kiadó, pp. 439–451.
- Davidson, J. M., Gorringer, K. L., Chin, S-F., Orsetti, B., Courtay-Cahen, C., Roberts, I., Theillet, C., Caldas, C., & Edwards, P. A. W. (2000) Molecular cytogenetic analysis of breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, Vol. 83. No. 10. pp. 1309–1317.
- Daigo Y., Chin S., Gorringer K., Bobrow K., Ponder b., Pharoah P., & Caldas C. (2001) Degenerate Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction-Based Array Comparative Genomic Hybridization for Extensive Amplicon Profiling of Breast Cancers: A New Approach for the Molecular Analysis of Paraffin-Embedded Cancer Tissue. *The American Journal of Pathology* Vol. 158. No. 5. pp. 1623–1631. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64118-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64118-1)
- Dell'Acqua, F., Scifo, P., Rizzo, G., Catani, M., Simmons, A., Scotti, G., & Fazio, F. (2010) A modified damped Richardson-Lucy algorithm to reduce isotropic background effects in spherical deconvolution. *Neuro Image*, Vol. 49. No. 2. pp. 1446–1458. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.033>
- Gibbs, S., Peneva, D., Carter, G., Palomares, M., Thakker, S., & Hall, D. (2023) Comprehensive Review on the Clinical Impact of Next-Generation Sequencing Tests for the Management of Advanced Cancer. *JCO Precision Oncology*, Vol. 7. <https://doi.org/10.1200/PO.22.0071>
- Hanahan, D. (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hollandi, R., Moshkov, N., Paavolanien, L., Tasnadi, E., Piccinini, F., & Horvath, P. (2022) Nucleus segmentation: towards automated solution. *Trends in Cell Biology*, Vol. 32. No. 4. pp. 295–310. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.12.004>
- Holub, P., Müller, H., Bíl, T., Pireddu, M., Prasse, F., Schüller, I., Zatloukal, K., Nenutil, K., & Brádíl, T. (2023) Privacy risks of whole-slide image sharing in digital pathology. *Nature Communications*, Vol. 14. Article number: 2577.
- Irshad, H., Montaser-Kouhsari, L., Waltz, G., Bucur, O., Nowak, J., Donog, F., Knoblauch, N., & Beck, A. (2015) Crowdsourcing image annotation for nucleus detection and segmentation in computational pathology: Evaluating experts, automated methods and the crowd. *Pacific Symposium on Biocomputing 2015*, pp. 294–305. https://doi.org/10.1142/9789814644730_0029
- Kiszler, G., Krecsák, L., Csizmadia, A., Micsik, T., Szabó, D., Jónás, V., Prémusz, V., Krenács, T. & Molnár, B. (2013) Semi-automatic FISH quantification on digital slides. *Diagnostic Pathology*. Vol. 8. Article number S21. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-S1-S21>
- Kiszler G., Paulik R., & Krenács T. (2021) Automatizált, mintázat, intenzitás és mérés alapú digitális szövetanalízis. In: Krenács T., Bődör Cs., Matolcsy A. (szerk.) *Patológiai és Molekuláris Onkológiai Módszerek*. Medicina Kiadó, pp. 415–426.
- Kiran, N., Sapna, F., Kiran, F., Kumar, D., Raja, F., Shiwani, S., Paladini, A., Sonam, A., Bendari, A., Perakash, S., Anjali, F., & Varrassi, G. (2023) Digital Pathology: Transforming Diagnosis in the digital age. *Cureus*, Vol. 15. No. 9. 44620. <https://doi.org/10.7759/cureus.44620>
- Krenács T., Főnyad L., & Molnár B. (2021) Digitális patológia, digitális mikroszkópia. In: Krenács T., Bődör Cs., Matolcsy A. (szerk.) *Patológiai és Molekuláris Onkológiai Módszerek*. Medicina Kiadó, pp. 394–414.
- Lacroix, M., Leclercq, G. (2004) Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumors: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*, Vol. 83. No. 3. pp. 249–289. <https://doi.org/10.1023/b:brea.0000014042.54925.cc>
- Levsky, M., & Singer, H. (2003) Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, Vol. 116. No. 14. pp. 2833–2838, The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.00633>
- Malpica, N., Ortiz de Solorzano, C., Vaquero, J., Santos, A., Vallcorba, I., García-Sagredo, J. M., & del Pozo, F. (1997) Applying Watershed Algorithms to the Segmentation of Clustered Nuclei. *Cytometry*, Vol. 28. No. 4. pp. 289–297. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19970801\)28:4%3C289::aid-cyto3%3E3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19970801)28:4%3C289::aid-cyto3%3E3.0.co;2-7)
- Marusyk A., Janiszewska M., Polyak K., (2020) Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.007>

- Moasser, M. (2007) The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, Vol. 26. pp. 6469–6487. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>
- Muller, K. E., Marotti, D. J., Memoli, A. V., Wells, W. A., & Tafé, J. L. (2015) Impact of the 2013 ASCO/CAP HER2 guideline updates at an academic medical center that performs primary HER2 FISH testing: Increase in equivocal results and utility of reflex immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*, Vol. 144. Issue 2. pp. 247–252. <https://doi.org/10.1309/AJCPE5NCH-WPSMR5D>
- Munari, E., Scarpa, A., Cima, L., Pozzi, M., Pagni, F., Vasuri, F., Marletta, S., Dei Tos, A. P., & Eccher, A. (2023) Cutting edge technology and automation in pathology laboratory. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, Vol. 484. No. 4. pp. 555–566. <https://doi.org/10.1007/s00428-023-03637-z>
- Popovic, M., Silovski, T., Krizick, M., & Plavetic, N. D. (2023) HER2 Low Breast Cancer: A New Subtype or a Trojan for Cytotoxic Drug Delivery? *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 24. No. 9. Article 8206. <https://doi.org/10.3390/ijms24098206>
- Shakoori A. (2017) Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) and Its Applications. *Chromosome Structure and Aberrations*, pp. 343–367. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3_16
- Singh, K., Singh, S., Lillard, W., & Singh, R. (2016) Drug delivery approaches for breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 12. pp. 6205–6218. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140325>
- Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. (2021) Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, Vol. 18. pp. 100–106.
- Székely T., Wichmann B., Maros M E., Csizmadia A., Bodor Cs., Timar B., Krenács T., (2022) Myelofibrosis progression grading based on type I and type III collagen and fibrillin 1 expression boosted by whole slide image analysis. *Histopathology* <https://doi.org/10.1111/his.14846>
- Varga, V. S., Ficsor, L., Kamarás, V., Jónás, V., Virág, T., Tulassay, Z., & Molnár, B. (2009) Automated multichannel fluorescent whole slide imaging and its application for cytometry. *Cytometry*, Vol. 75A. No. 12. pp. 1020–1030. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20791>
- Wang, B., Ding, W., Sun, K., Wang, X., Xu, L., & Teng, X. (2019) Impact of the 2018 ASCO/CAP guidelines of Her2 fluorescence in situ hybridization interpretation in invasive breast cancers with immunohistochemically equivocal results. *Scientific Reports*, Vol. 9. Article 16726. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53003-w>
- Wang, S., Saboorian, M. H., Frenkel, E. P., Haley, B. B., Siddiqui, M., Gokaslan, S., Hynan, L., & Ashfaq, R. (2002) Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Modern Pathology*, Vol. 15. Issue 2. pp. 137–145. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880505>
- Willmore, C., Holden, J. A., & Layfield, L. J. (2005) Correlation of HER2 gene amplification with immunohistochemistry in breast cancer as determined by a novel monoplex polymerase chain reaction assay. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, Vol. 13. No. 4. pp. 333–341. <https://doi.org/10.1097/01.pai.0000158400.58030.c4>
- Xiao, Y., Gao, X., Maragh, S., Telford, G. W., & Tona, A. (2009) Cell lines as candidate reference materials for quality control of ERBB2 amplification and expression assays in breast cancer. *Clinical Chemistry*, Vol. 55. No. 7. pp. 1307–1315. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.120576>