



אוניברסיטת בן-גוריון בנגב
Ben-Gurion University of the Negev

הפקולטה למדעי ההנדסה

המחלקה להנדסת מערכות תוכנה ומידע

**Performance benchmarking over
fluorescent imagery reconstruction**

הערכת ביצועים של שחזור תמונות פלורסנטיות

372-22-8

מספר פרויקט:

ליעד עוז - 308546167

מגישים:

נאור סובן - 205492671

עומר טג'ר - 207904616

תום רוביסה - 312272107

דוקטורנט עודד רותם

מנחים מקצועיים:

ד"ר אסף זריצקי

ד"ר מיקי פייר

מנחה סמינר:

יוני 2022

מועד הגשה:

תקציר

הפרויקט שלנו עוסק בחיזוי תמונה מיקרוסקופית פלורסנטית (Fluorescence) תלת ממדית של תאים מתוך תמונת מיקרוסקופית תחת אור נראה (Brightfield) שדה-בהיר. תמונת ה-Brightfield מכילה מידע על אברונים שונים בתוך התא, אך בשל הניגודיות הנמוכה שלה וריבוי הנתונים שהיא מכילה, קיים קושי בזיהוי האברונים דבר המקשה על הבנת תהליכים חשובים בתא. לעומתה תמונת הפלורסנט מציגה את המבנים בתא באופן ברור באמצעות סמן פלורסנטי המקושר לחלבון האברון. סמן זה נקשר לאברון אחד בלבד, וכך התמונה הפלורסנטית מספקת מידע איכותי באופן קריא וברור יותר על אברון ספציפי זה.

כיום, תהליך יצירת תמונה מסוג Fluorescence הינו מורכב, יקר ואיטי. נדרש מיקרוסקופ ייחודי, תנאי מעבדה וביולוג בעל ההכשרה המתאימה כדי להחדיר סממן פלורסנטי מיוחד לתוך התא על מנת לצבוע אברון מסוים. החיסרון העיקרי של שיטה זו מתבטא במגבלה לצביעת מספר מועט של אברונים, דבר המגביל את כמות תמונות האברונים השונים שניתנים לצילום בכל תא שנדגם. עם זאת, התמונה הפלורסנטית מאופיינת בניגודיות גבוהה ובאיכות טובה. על כן, היא נחוצה לביולוגים הרבה יותר לטובת חקר התא והבנת תהליכים משמעותיים בביולוגיה המיקרוסקופית מאשר תרומתה של תמונת ה-Brightfield.

מטרת הפרויקט הינה להעריך ביצועים של מודלי למידת מכונה שונים בשחזור תמונות מיקרוסקופיות פלורסנטיות של אברון מתוך תמונת ה-Brightfield. זאת בכדי שנוכל למפות לכל אברון, את המודל הטוב ביותר שיודע לשחזר אותו. כך למעשה, נוכל לאפשר יצירת מספר רב של תמונות פלורסנטיות מתוך תמונת Brightfield בודדת בניגוד אפשרות המוגבלת היום, ובנוסף נוכל לחסוך את התהליך המורכב הכרוך ביצירתן. כדי להשלים את מטרת הפרויקט ולחזות תמונה פלורסנטית מתמונת ה-Brightfield התואמת לה, בחרנו להתמקד במספר מודלי למידת עמוקה (Autoencoder, Unet, Pix2Pix-Cross-domain Autoencoder). על מנת להעריך את ביצועינו, תחילה השתמשנו במדד העין האנושית. ככל שהתקדמנו בפרויקט והתמונות שנחזו הראו דמיון לתמונה המקורית, השוונו את תמונת ה-Fluorescent שנחזתה לתמונת ה-Fluorescent המקורית (Ground Truth) באמצעות מדד פירסון. הערכנו את איכות החיזוי עבור כל אברון, במטרה להתאים לו את המודל שיבצע את החיזוי האיכותי ביותר עבורו.

תוצאות הפרויקט שלנו מראות כי בניגוד להשערת המחקר שלנו, UNET הינו המודל המתאים ביותר למשימה עבור כלל האברונים שנדגמו. תוצאות מודל ה-UNET הראו באופן אמפירי את עדיפותו על פני שאר המודלים. לכן, לפי ניתוח הנתונים וההשוואה שביצענו בפרויקט זה נמליץ למדען הביולוגי העתידי להשתמש במודל ה-UNET על מנת לבצע את החיזוי. בכדי להמשיך פרויקט זה ולהעמיק את המחקר, נמליץ לחוקר הבא להשתמש בתהליך ניתוח הנתונים אותו בנינו, ולהשוות את מודל ה-UNET למודלים נוספים המתאימים למשימת החזוי של תמונות אלו.

Abstract

Our project focuses on predicting a three-dimensional fluorescence image of cells from a microscopic image under visible light (Brightfield). The Brightfield image contains information on all the different organelles within the cell, but due to its low contrast and multiplicity of data, it is difficult to identify cell organelles which in turn makes it difficult to understand the important processes in the cell. In contrast, the fluorescent image uses a fluorescent marker linked to the organelle's protein that binds to a specific organelle. This in turn characterizes the image with high contrast and good quality, making it a valuable necessity for biologists that conduct cell studies and review significant processes in microscopic biology, and preferred over the brightfield counterpart. However, the process of creating a fluorescence image is complex, expensive and slow. A unique microscope, laboratory conditions and a biologist with the appropriate training are required to insert a special fluorescent marker into the cell in order to mark a particular organelle. The main disadvantage of this method derives from its inability to mark more than a few proteins in a particular cell, therefore limiting the amount of different organelle images that can be extracted from each cell sampled. As such, we have set our primary objective is to evaluate the performance of various machine learning models in reconstructing microscopic fluorescent images of organelles out of their corresponding brightfield images. We have chosen so In respect to the next phases, which include mapping each organelle to a model that is most efficient at reconstructing corresponding fluorescent images out of an individual brightfield image. In essence, The reconstructed images would provide an alternative to the creation of fluorescent images. We have chosen a number of deep-learning models that would provide the best possible reconstruction. During the evaluation of their performance, we have compared a reconstructed fluorescent image to the laboratory generated fluorescent image (Ground Truth), first by looking for visibly significant differences between them and also by using Pearson Index. We assessed the quality of the prediction for each organelle (category), in order to tailor a model that would out-perform the other models chosen and achieve a high-quality prediction. In terms of reconstruction quality, it became empirically evident that contrary to our research hypothesis, UNET is the most efficient model of all of the organelles sampled in the study and produces superior reconstructed images when compared to its counterparts.

תוכן עניינים

5	מבוא
5	רקע
6	מוטיבציה
6	מצב קיים
6	פער
7	מטרה
7	תיאור השיטה
8	ממצאים עיקריים
8	מבנה המסמך
9	סקירת ספרות
16	ניהול נתונים
17	ניהול סיכונים
18	מתודולוגיית המחקר
19	ניסויים
20	תוצאות
20	תוצרי המודלים - תמונות
20	Mitochondria
21	Nuclear Envelope
22	Actin Filaments
23	Endoplasmic Reticulum
24	תוצאות – טבלה מסכמת
25	מסקנות
27	אתגרים לעתיד
28	ביבליוגרפיה
32	נספחים
32	נספח א' – ארכיטקטורות המודלים
32	UNET
32	Pix2Pix
33	Image2Image Autoencoder
33	Cross-Domain Autoencoder

מבוא

רקע

הבנה של מערכת התאים הינה אתגר מרכזי בביולוגיה מודרנית, בעוד שגישות מיקרוסקופיות שונות משמשות לחקר ההיבטים השונים במבנה הביולוגי, כל גישה כזו מציגה גם מגבלות, שלבסוף מונעות ראייה מעמיקה לעבר המבנה התאי. תמונות פלורסנטיות של תא מציגות את המבנים בתא באמצעות סמן פלורסנטי לחלבון שמקושר לאורגנלה שמציג אותה באופן קריא וברור יותר מאשר בתמונות אור-נראה (brightfield). אך, לא ניתן לסמן פלורסנטית מספר רב של אורגנלות באותו תא חי משום שבשימוש סמן הצביעה לכמה אורגנלות שונות, גלי הצבעים יתערבבו. לכן יהיה קשה, עד בלתי אפשרי, להבחין בין מספר אורגנלות שונות באותו תא. מעבר לכך, מיקרוסקופ פלורסנטי הוא כלי יקר שלא נמצא בהישג יד וכן מצריך כוח אדם בעל הכשרה מתאימה להפעילו. [5] Ounkomol et al, 2018

אחת הדרכים להתמודד מול האתגר בביולוגיה מודרנית מובא במאמרם של [7] Hastie et al, 2005; [9] Michalski et al, 2013; [8] Murphy, 2012. לטענתם, שיטות ללמידת מכונה מהוות מטרה כללית בגישה של למידת קשרים פונקציונאליים מנתונים, ללא הצורך בהגדרה אפריורית. יתרה מכך, במאמרם [6] Angermueller et al, (2016) טוענים כי בביולוגיה חישובית, הנהירה לשימוש בשיטות ללמידת מכונה, הינה היכולת להפיק מודלים חזויים ללא צורך בהנחות חזקות לגבי מנגנונים בסיסיים, שלעיתים קרובות אינן ידועות או לא מוגדרות היטב.

לדברי [2] LaChance et al, 2020, למידה עמוקה טומנת בחובה הבטחה עצומה לנתוני מיקרוסקופיה ביולוגית, והיא מציעה הזדמנויות נהדרות לשחזור הרכיבים השונים בתמונות פלורסנט. תהליך לשחזור תמונות מיקרוסקופיה פלורסנטית (FRM- Fluorescence Reconstruction Microscopy) הינו תהליך המתאר טכניקות בהן תמונות אור-נראה מועברות לרשת עצבית קונבולוציונית (CNN) שבאמצעותה ניתן לחזות את התמונות הפלורסנטיות.

תמונות אור-נראה הינן תמונות המכילות מידע רב וניתן לייצר אותן בעלות נמוכה. לדוגמא, התמונות מכילות כמה סוגי תאים במושבה. עם זאת, חסרון העיקרי הנובע מעודף המידע הוא הקושי לזהות את מבנה ומרכיבי התא שבתמונה (Ounkomol et al, 2018) [5].

FRM עובד באמצעות אימון ברשת עצבית קונבולוציונית על מנת לקשור קבוצה גדולה של נתוני אור-נראה לתמונות הפלורסנטיות המתאימות (Ground Truth) – (Ronneberger et al, 2015) [3]. הרשת לומדת על ידי השוואת תחזיות הפלורסנטיות שלה אל מול נתוני הפלורסנטיים האמיתיים. לאחר האימון, ניתן לבצע FRM על תמונות אור-נראה ללא הצורך בהדמיה פלאורסצנטית נוספת. זוהי יכולת רבת עוצמה ומאפשרת ל-FRM: להפחית את הפוטו-רעילות (מצב שנוצר עקב הזרקת חומר צבע לתא), להקל בתהליך הכנת הדגימות

ואת היכולת לבצע עיבוד מחדש של אותו התא על מנת לקבל תובנות חדשות מה שמוגבל בשימוש בתהליך פלורסנטי רגיל עקב הרס התא.

Ounkomol et al (2018) [5], במאמרם מחזקים את נושא המחקר שלנו על ידי הצגת שיטה חסרת תיוגים לחיזוי תמונות פלורסנטיות D3 מתוך תמונות אור-נראה. ניתן בגישה זו לייצר ולחזות תמונות של מבנים ביולוגים מורכבים ותלויים. לצורך זה, המאמר מציג רשת CNN שלאחר אימון רשת זו, ניתן להזין תמונת אור-נראה ולקבל כפלט את התמונה המתאימה בתצורה פלורסנטית.

מוטיבציה

התא הוא רכיב הקיים בכל יצור חי. התא מורכב מאורגנלות (אברונים). ההתארגנות והאינטראקציות בין האורגנלות מאוד חשובות ומשפיעות על תפקוד תקין של התא, כאשר משהו משתבש במבנה או באינטראקציות זה עלול לגרום למחלות או לתפקוד לקוי ולכן לביולוגים מאוד חשוב להבין האם יש פגם במבנה התא. הדרך היחידה כדי להבין את ההתארגנות היא באמצעות מיקרוסקופיה.

מצב קיים

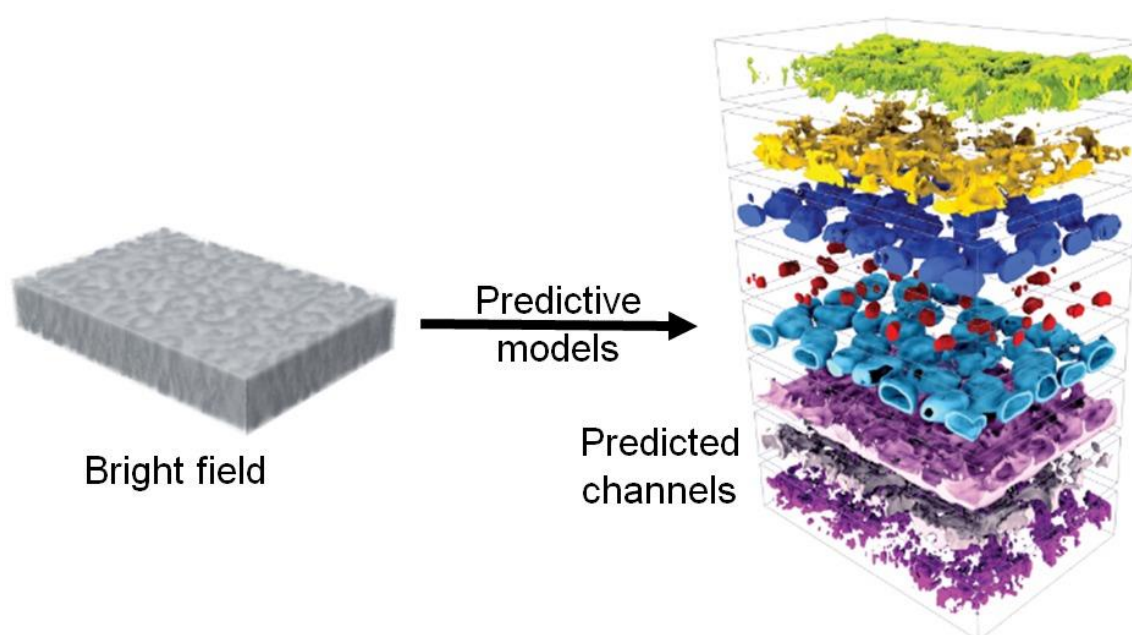
כיום, על מנת לייצר תמונות מיקרוסקופיות פלורסנטיות נדרש מיקרוסקופ ייחודי, תנאי מעבדה וביולוג בעל ההכשרה המתאימה כדי להחדיר סממן פלורסנטי לתוך התא, שיצבע את האורגנלה על מנת שיהיה ניתן לזהות אותה בצילום מיקרוסקופי פלורסנטי. דרישות אלו יקרות מאוד ויתרה מהמשאב הכלכלי, אי אפשר לצלם המון אורגנלות בתא יחיד, התא רגיש לאור ושימוש בסממנים פלורסנטיים לתא עלולים הן לגרום נזק בלתי הפיך לתא. בנוסף, המחסום העיקרי בו נתקלים הביולוגים הינו שימוש בכמות סממנים מוגבלת. ריבוי החדרת סממנים מובילה לערבוב גלי האור בין האורגנלות, דבר שפוגע באמינות הצילום המיקרוסקופי פלורסנטי.

פער

במחקרים שנעשו בתחום, מימשו מודל UNET שיועד לחזות תמונה מיקרוסקופית פלורסנטית של אורגנלה מתמונת אור-נראה. לעניות דעתנו, יש מודלים נוספים שמתאימים למשימה ויתכן ומודלים שונים יחזו בצורה שונה את האורגנלות בתא. חלקם יבצעו זאת טוב יותר מ-UNET וחלקם פחות.

מטרה

המטרה המרכזית בפרויקט שלנו היא להעריך ביצועים של מודלים גנרטיביים שונים בשחזור תמונות מיקרוסקופיות פלורסנטיות של אורגנלות מתוך תמונת אור-נראה וזאת על מנת להוביל לפרצת דרך משמעותית בעולם הביולוגי בכך שיהיה אפשר לשחזר צילום מיקרוסקופי פלורסנטי של תא ללא פגיעה בתא ולהביא למיצוי מקסימאלי של ידע על התא מתוך מרכיביו. בכך, נוכל למפות לכל אורגנלה, את המודל הטוב ביותר שיודע לשחזר אותה.



תיאור השיטה

לפי מאמרם של [5] (Ounkomol et al 2018) הוצגה הוכחת היתכנות (Proof of principle) לפיה אפשר למפות מתמונת אור-נראה של תא אל תמונות פלורסנטיות של אורגנלות המרכיבות את התא באמצעות שימוש בכלי AI כמו מודלים גנרטיביים ובכך לא לגרום נזק לתאים, להפחית עלויות, להשיג הרבה יותר מידע מכל תא וכמובן להוות פרצת דרך טכנולוגית בעולם הביולוגי.

ממצאים עיקריים

על פי תוצאות המחקר שבצענו, עליהן ניתן לקרוא בהרחבה בפרק של תוצאות. ניתן לראות, שהמודל המוביל בחיזוי תמונות פלורסנטיות מיקרוסקופיות של מרבית מהאורגנלות שנדגמו הוא UNET, המדדים איתם מדדנו את טיב החיזוי היה מדד פירסון ועל פי העין האנושית.

מבנה המסמך

בספר פרויקט זה, אנחנו נציג ארבעה מודלי למידה עמוקה לחיזוי תמונות מיקרוסקופיה ביולוגית תלת מימדית, תוך הדגמה על מספר אברוני התא, אשר נבחרו על פי מחקרים קודמים בנושא. בנוסף, נדון בחקר המקדים שעשינו בנושא ובסיבה לבחירת מודלים אלו, בפרק סקירת הספרות. בהמשך, נציג את היעדים שהצבנו בפרק מטרות המחקר, וכן נדבר על ההתמודדות עם המשימה, הנתונים ועיבודם בפרק מתודולוגיית המחקר וכן את האתגרים שעמדו בפנינו במהלך הפרויקט. לבסוף, נציג את הניסויים שביצענו ותוצאות המחקר אותן קיבלנו ואת התמונות אותן הצלחנו לחזות בעזרת המודלים שאומנו ונכתבו על ידינו. בנספחים, נציג המחשה ויזואלית של ארכיטקטורות המחקר אותן בחרנו לממש במודלים שלנו.

סקירת ספרות

בחלק זה נדון בעבודות קודמות שנעשו בתחום, נסקור את הטכנולוגיות שבהן השתמשו, נדגיש מדוע הן רלוונטיות עבור תחום המחקר שלנו ונציג פתרונות לבעיות אותן הצגנו לעיל.

בעיית תרגום התמונה (Image to Image Translation) הינה הבעיה המרכזית בתחום המחקר שלנו, בה נעשה שימוש רחב בארכיטקטורת ה- [11] Auto Encoders [\[ראה נספח א'\]](#), רשת נוירונים שמטרתה העיקרית היא לקודד את הקלט לייצוג דחוס בעל משמעות ולפענח אותו בחזרה, כאשר לאחר תהליך אופטימיזציה, תוצאות הפענוח תהיינה דומות ככל האפשר לקלט המקורי. שיטה זו שימושים רבים, החל מצמצום רעש ועד הסרת טשטוש בתמונה. בנוסף, יש לה הרחבות ופיתוחים שונים.

(Ronneberger et al, 2015) [\[3\]](#) במאמרם עוסקים בתחום תרגום התמונה תוך התמקדות במתן פתרון לבעיית הסגמנטציה – פעולת סימון אובייקט בתמונה. Ronneberger ושותפיו למחקר בנו ארכיטקטורה מבוססת Autoencoder אשר נקראת U-Net. כאשר זיהו שניתן לשמר את הקשר בין תמונת המקור לתמונת היעד, הם הציעו להעביר חלק מהמידע שאבד בתהליך הקידוד לתוך תהליך הפענוח ובכך לייצג קשר זה, אשר יסייע בשחזור התמונה. יתרה מכך, יש לציין מכיוון שמדובר במשימת סגמנטציה, מטרת הפענוח היא לא תמונת המקור, אלא תמונה המייצגת את הסגמנטציה שלה. בניגוד ל Autoencoder אותו הזכרנו לעיל, שבו תמונת היעד היא שחזור תמונת המקור.

שימוש ויישום של הקשר בין תמונת היעד לתמונת המקור דרך הארכיטקטורה הוא שמהווה את היתרון המרכזי על אחרים אשר מתבטא בהצלחתה. יתרון נוסף של הרשת הוא יכולתה להגיע לתוצאות טובות עם מספר מצומצם של תמונות. עם זאת, חסרונה של רשת ה-UNET היא שלמרות היכולת להגיע לתוצאות טובות עם כמות מוגבלת של מידע, התהליך מותנה בהוספת תמונות נוספות בליווי אוגמנטציות – סיבוב התמונה, שינוי בהירותה ומניפולציות נוספות על גביה, כאשר בחירה באוגמנטציות הנכונות ובכמות התמונות שיש להוסיף מחייבת ניסיון וידע, דבר המקשה על אלה שבחרים להשתמש בה. יחד עם זאת, חשוב לציין שתהליך זה הופך את הרשת ליותר עמידה לשינויים, מותאמת לעבודה עם מגוון רחב של תמונות וחסונה יותר למצב של התאמת יתר (Overfitting).

ממצאיו של המאמר של Ronneberger [\[3\]](#) מתארים ביצועים טובים, לפי המטריקות בהן השתמשו, גם כאשר כמות התמונות הייתה מצומצמת (כ-30 תמונות). כדי לפצות על כך, כותבי המאמר השתמשו בטכניקת האוגמנטציות שצוינה לעיל. בנוסף, כותבי המאמר מתארים את תוצאות הרשת בטובות יותר מאשר תוצאותיהן של מודלים אחרים מבוססי Auto Encoder, כאשר ההשוואה נעשתה באמצעות שימוש במאגר נתונים זהה ותחת משימת סגמנטציה. לטענת כותבי המאמר, היתרון היחסי של הרשת מתבטא באמצעות השימוש בקשר בין תמונת היעד לתמונת המקור או Skip Connections .

רשת ה-UNET [\[ראה נספח א'\]](#) נבנתה במטרה להתמודד עם תמונות מתחום הדימויות הרפואי ואנו מעריכים שתתאים גם לתחום המיקרוסקופי ביולוגי ובפרט תמונות הברייטפילד ותמונות הפלורסנט שבתחום המחקר שלנו, עקב הדמיון בין התחומים. רשת זו נבנתה על מנת להצליח באתגר הסגמנטציה שזוהי מטרה שונה מתרגום תמונה, אך במאמרם [\[5\]](#) (Ounkomol et al 2018) הוכיחו כי רשת ה-UNET מתאימה גם למטרה זו.

יתרה מכך, ניתן להניח שעל מנת לאמן באופן יעיל רשתות נוירונים נדרשת כמות נתונים רבה, אך נכחו לגלות שגם עם כמות מצומצמת אפשר להגיע לתוצאות מספקות. ברשותנו כ-120 צמדי תמונות ברייטפילד ופלורסנט, לכן UNET תהיה בחירה מתאימה, כיוון שהוכחה במאמר כי עיליה עם כמות נתונים מוגבלת. יש לשים לב, שמעבר לאתגר היקף הנתונים, במאמרם השתמשו החוקרים בנתונים שאינם מעולם הביולוגיה המיקרוסקופית ולכן יתכנו אתגרים נוספים שלא צוינו במאמר.

בדומה לעבודתם של [\[5\]](#) (Ounkomol et al 2018) אשר התמודדו עם אתגרים אילו והציגו שיטה לחיזוי תמונות פלורסנטיות תלת מימדיות מתוך תמונות ברייטפילד, לפיה ניתן לייצר ולחזות תמונות של מבנים ביולוגיים מורכבים. כדי להשיג את מטרותם, כותבי המאמר אימנו רשת מסוג UNET לצורך משימת תרגום התמונה באמצעות צמדי תמונות שהוכנו מראש – תמונת ברייטפילד כתמונת המקור ותמונת פלורסנט התואמת לה כתמונת היעד. מטרותם הייתה לאמן את הרשת באמצעות השוואה של תמונת היעד שהרשת ייצרה לתמונת הפלורסנט המתאימה לתמונת המקור. המאמר מציג גישה לפיה במקום להשתמש בתמונות פלורסנטיות, שהפקתן גוררת אילוצים רבים, כפי שצוין ברקע, ניתן ליצור תמונה מסוג זה באמצעות תמונת ברייטפילד מתאימה ובכך לחסוך במשאבים אלו.

מהות ממצאיהם של כותבי המאמר היא שניתן לבצע חיזוי של תמונה פלורסנטית איכותית מתמונת ברייטפילד. יש להוסיף, כי ניתן להציג מספר מוגבל של סוגי אברונים מאותה מושבת תאים באמצעות תמונת ברייטפילד אחת. יחד עם זאת, ממצאיו מתארים שניתן לאמן את הרשת באמצעות 30 זוגות של תמונות עבור כל סוג תא, דבר המראה שאין צורך בסט אימון גדול המצופה בשימוש ב-Convolutional Neural Network (CNN) על מנת לבצע חיזוי איכותי.

מנגד, כותבי המאמר מציגים קשיים שבהם נתקלו, למשל שיש לאמן לכל סוג אברון מודל נפרד, משום שלכל אברון מאפיינים ויזואליים שונים. מעבר לכך, ישנם סוגי אברונים שהחוקרים לא הצליחו לחזות בהצלחה כגון: actomyosin. -i desmosomes

כותבי המאמר מהווים פריצת דרך במשימת תרגום התמונה בתחום המיקרוסקופיה הביולוגית וברצוננו להמשיך את חזונום ואף לשפר את תוצאותיו במספר דרכים שנפרט כעת. ראשית, בעוד שכותבי המאמר השתמשו אך ורק בארכיטקטורת U-Net, אנו מציעים ארכיטקטורות נוספות. בנוסף לרשת ה-U-Net, נציג ארכיטקטורות נוספות מסוג Auto Encoder אשר עובדות היטב עם בעיות של Super Resolution, כפי

שניתן לראות במאמרם ש [10] (Liu et al, 2020) מציע בנוסף ארכיטקטורה מסוג Generative Adversarial Network [14], אשר פופולרית עקב יכולתה ליצור תמונות איכותיות, עליה נרחיב בהמשך.

במאמרם [2] (LaChance et al, 2020) התמודדו עם אתגרים דומים והציגו טכניקה דומה לחיזוי תמונות פלורסנטיות של תאים מתמונות אור שדה-בהיר (ברייטפילד) באמצעות תהליך ה-FRM. לפי תהליך זה, בהינתן תמונות ברייטפילד של דגימות ביולוגיות, ניתן לבנא כיצד הדגימה הייתה נראית לו היה נעשה שימוש בחלבונים או בצבעים כדי לסמן מרכיבים מהתא, כפי שניתן לראות בתמונות פלורסנט.

המטרה העיקרית של המאמר הוא לספק מימוש סטנדרטי של תהליך ה-FRM, כאשר התמונות המשוחזרות ישמשו למשימות יומיומיות של ביולוגיים, כמו לוקליזציה ומעקב אחר רכיבים גרעיניים, אפיון מורפולוגי של תאים, זיהוי וניתוח של רכיבים שמחברים בין תאים וניתוח מחדש של מידע על תאים שכבר נאספו.

החידוש שמציג השיטה במאמר הוא שבניגוד למחקרים קודמים אשר ביססו את מסקנותיהם על תמונות ברייטפילד שצולמו בקירוב גבוה, דבר המחייב שימוש בכלים מתקדמים יותר, מאמר זה מתמקד בתמונות בצילום מרחוק ובזווית רחבה יותר. השימוש בארכיטקטורת U-Net מאפשר תהליך FRM איכותי, למרות מגבלות האיכות על תמונות הברייטפילד.

כותבי המאמר מציגים מספר יתרונות של השימוש בתהליך FRM, החל מחסכון במשאבים וכלה באיכות התוצאות, אשר נזכרו גם במאמרם של ([5] Ounkomol et al 2018).

על אף היתרונות אלו, כותבי המאמר גרסו כי ישנו קושי להעריך את איכות ומהימנות התחזית מתהליך ה-FRM. קשה להשוות בין תמונות פלורסנט המיוצרות באופן מלאכותי לבין אילו המיוצרות בתהליך הידני, כיוון שיש צורך להתאים בין מדדי הדיוק המופשטים של FRM לבין מדדי הדיוק של השימוש במיקרוסקופ פלורסנטי אמיתי. אם כך, הקושי המהותי מתבטא בנושא הדיוק, כיוון שהיכולת לחזות בצורה מושלמת היא בלתי אפשרית וכדי להגיע לרמות דיוק גבוהות נדרשים הן תנאי מעבדה והן משאבים ויכולות חישוב. כדי ליישב סוגיה זו, כותבי המאמר טוענים ששיטת ה-FRM מתאימה למקרים מסוימים בעולם הביולוגי, כאשר מידת הדיוק לא חייבת להיות מושלמת, אלא מספיק דיוק ברמה גבוהה.

כותבי המאמר השתמשו במדדים כמותיים על מנת להעריך את איכות התהליך. אלו האחרונים השתמשו במדד ה-MSE ומדד פירסון. הם תיארו כי מבחינה ויזואלית, ניתן היה לראות כי נעשתה עבודה טובה. יחד עם זאת, הם עשו מאמץ ניכר לכמת את הפערים בתחזיות של גרעין התא בין תמונה מקורבת לתמונה מרוחקת. עם זאת, משום שתמונות המקור הכילו בעיקר רקע מסביב לאזור אותו שאפו לחזות, נוספו גורמי רעש לחיזוי ורכיבי היעד ששוחזרו בתהליך ה-FRM היו מעט מטושטשים.

בהמשך, החוקרים העריכו את תוצאות התהליך עבור תמונות ברייטפילד באיכות שונה, כתלות במידת קירוב וזווית הצילום. החוקרים מצאו שככל שאיכות התמונה יורדת, מה שהתבטא בריחוק המצלמה וצילום בזווית

רחבה יותר, מדד פירסון יורד, אך הדיוק נשאר קרוב לזהה. הם ציינו שעבור מקרים מסוימים, ניתן לתעדף את מדד הדיוק על פני מדד פירסון ולכן במקרים אילו, תוצאות השחזור יעילות.

לאחר סקירה מקיפה, ניתן לזהות דמיון רב בין תהליך המחקר שלנו לבין זה שהוצע במאמר - המרה של תמונות מתחום המיקרוסקופיה הביולוגית, תמונות ברייטפילד של תאים, לתמונות פלורסנציה התואמות להם. עיקר השוני בין התהליכים מתבטא בכך שהיקף תחום המחקר שלנו רחב יותר ולכן נפצה על עובדה זו בכך שנתנסה במספר ארכיטקטורות שונות, כפי שצינו לעיל, במטרה לבצע את תהליך השחזור למספר רב של רכיבי תאים.

בעת נסקור מודל נוסף הנקרא [\[14\]](#) Generative Adversarial Network (GAN) המכיל שני רכיבים - generator ו-discriminator, הבנויים מרשת נוירונים. רכיב ה-generator מקבל רעש רנדומלי וממנו מייצר תמונות הדומות ככל האפשר לתמונות המקור במטרה לשטות ב-discriminator, שמטרתו להבדיל בין תמונות שה-generator ייצר לבין תמונות המקור. שני הרכיבים מתחרים ביניהם, כאשר מטרת המודל היא לאמן את רכיב ה-generator באופן אופטימלי, כך שיהיה מסוגל לייצר מרעש תמונות שדומות ככל הניתן לתמונות המקור.

למודל זה התווספו הרחבות שמתאימות אותו לבעיית תרגום התמונה כך שבמקום לקבל רעש רנדומלי, רכיב ה-generator מנסה לייצר מתוך תמונות המקור את תמונות היעד. ארכיטקטורת [\[13\]](#) Pix2Pix מיישמת שיטה זו, כאשר רכיב ה-generator הוא רשת ה-U-Net. [\[ראה נספח א'\]](#)

חידוש בולט בשיטה זו הוא התאמת הארכיטקטורה למספר שימושים שונים כמו למשל סגמנטציה, הורדת טשטוש ותרגום תמונה. בנוסף, הארכיטקטורה מציעה חלוקה של התמונה לטלאים (patches) – חלקי תמונה, כאשר הזנת התמונה לכל אחד מהרכיבים נעשית בתור אוסף של חלקיה. שיטה זו הוצגה לראשונה במחקרם של (C. Li et al, 2016) [\[12\]](#).

למודל זה יתרון דומה לזו של רשת ה-U-Net, המערכת המציעה לשמר את הקשר בין תמונות המקור לתמונות היעד. כפי שהזכרנו לעיל, תכונה זו מתבטאת בביצועים טובים. יתרון נוסף בא לידי ביטוי בחלוקה לטלאים - באופן זה ניתן לעבד גדלים שונים של תמונות עבור סט האימון וסט המבחן, מה שמגדיל את גמישות הבחירה בגודל התמונה. יש לציין ששימוש בטלאים שומר על המידע הקונטקסטואלי של הפיקסלים, אבל לא מבכיד מדי מבחינה חישובית.

על אף היתרונות שמציע המודל, ישנו קושי בהערכת התוצאות ולעתים המדד המתאים להערכה משתנה כתלות במקרה. במאמר נעשה ניסיון להעריך את תוצאות המודל באמצעות שיקול הדעת של אנשים, אשר נדרשו לשחק את תפקיד ה-discriminator במודל. כוח אדם הוא אמנם מדויק, אך מנגד, מדובר במשאב יקר.

בנוסף, נעשה ניסיון להשתמש בתוכנה לזיהוי עצמים כדי להעריך את איכות התמונות, אותה כותבי המאמר מתארים כשיטה שלוקה בחוסר דיוק במידת מה.

כפי שהוזכר לעיל, ממצאי המאמר מציגים את יישומה של הארכיטקטורה עבור תחומים שונים, מה שהתאפשר בעקבות הפשטות היחסית של הארכיטקטורה והפתיחות של כותבי המאמר לקהילה. באופן מפתיע, ממצאי המאמר מעידים על כך שעל אף מגוון היישומים של המודל, ביצעו לא נפגעים והוא מניב אחוזי דיוק גבוהים לכל אלה.

מכיוון שהמודל בנוי מרשתות נוירונים עמוקות, ניתן להחליט על פונקציית הפסד עבור כל אחד ממרכיבי המודל, ה-generator וה-discriminator, אשר תוביל לתוצאות אופטימליות. כותבי המאמר הציעו שימוש בפונקציית ההפסד אשר לטענתם, מצמצמת טשטוש בנוסף לשחזור יעיל של התמונה. יחד עם זאת, כותבי המאמר הציעו גודל טלאים של 70X70. כותבי המאמר מתארים מבחנים אמפיריים בהם קבעו את פונקציית ההפסד וגודל הטלאים.

ארכיטקטורה זו מתאימה לתחום המחקר שלנו, מכיוון שאנו מבצעים משימה של image to image translation, כאשר מודל זה בנוי להתמודד עם משימה זו ומניב ביצועים טובים. בנוסף, רכיב ה-generator הוא רשת U-Net שיתרונותיה והתאמתה לתחום המחקר שלנו הוזכרו לעיל. למרות ההתאמה, ישנם פערים בין תמונות המקור שבהן נעשה שימוש במאמר לבין תמונות המקור בתחום המחקר שלנו, כפי שניתן לראות בטבלה הבאה:

השפעה	Segmentation of – Pix2Pix buildings	Brightfield to Fluorescent	
גודל patch האופטימלי לא ידוע.	2D	3D	ממדים
לא ידוע.	צבע	Grayscale	צבע
עלול לגרור מורכבות חדשה שלא תוארה במאמר.	כללי	ביולוגיה מיקרוסקופית	תחום
תהליך האימון עלול להיות מאתגר ויציף בעיות חדשות.	מעל ל-700 תמונות שכל תמונה מפוצלת ל-110 פאצ'ים, מספר דאטה סטים שונים.	120-500 תמונות שכל אחת מפוצלת לכ-140 פאצ'ים.	כמות התמונות

עקב פערים אילו, נרצה לדעת כיצד נעשה שימוש בארכיטקטורה זו גם בנתונים שמקורם בתחום המחקר שלנו או בתחום המיקרוסקופיה הביולוגית, אתגר עימו התמודדו במחקרם של [15] (Zhuge et al, 2021). במאמרם, מציגים אתגר בתחום הביולוגיה המחקרית יצירת תמונות אשר נלקחו באמצעות מיקרוסקופ תאורה מובנית (SIM), המשחזר תמונות בחתך אופטי של דגימה ממספר תמונות פלורסנט רחבות שדה. תמונות הפלורסנט פשוטות יותר ליצירה מכיוון שבהן כל נפח הדגימה נחשף לאור בעוד שבתמונות ה-SIM מתקדדות במישור מצומצם יותר על גבי התמונה, מה שמקטין טשטוש ומגדיל את חדותה.

כותבי המאמר מציעים דרך ליצור את תמונות ה-SIM באמצעות תמונות מיקרוסקופיה פלואורסנטית, על ידי שימוש בארכיטקטורת Pix2Pix הנזכרה לעיל. במישור הדו מימדי, כותבי המאמר מציגים יכולת תרגום מתמונת פלורסנט דו מימדית רחבת שדה לתמונת SIM דו מימדית ובמישור התלת מימדי, מראים את הפוטנציאל לשחזור תמונת SIM תלת מימדית מתוך ערימת תמונות פלורסנט דו מימדיות בשדה רחב. ביצועי המודל נבדקו על מגוון דגימות, הכוללות חרוזים פלורסנטיים ודגימות רקמות אנושיות טריות.

בנוסף, [15] (Zhuge et al (2021 במאמרם מציגים את כוחה של ארכיטקטורת Pix2Pix במשימת תרגום התמונה וטוענים כי בעקבות היחס האדברסריאלי בין רכיב ה-generator לרכיב ה-discriminator בארכיטקטורה, ניתן להשיג תוצאות טובות יותר משל ארכיטקטורה אחרת, מורכבת יותר, שתספק את תרגום התמונה.

לעומת זאת, חסרון בולט של הארכיטקטורה במשימת תרגום התמונות הינו האפקט הנוצר בתהליך הפענוח של רשת ה-U-Net על ידי רכיב ה-generator בארכיטקטורת Pix2Pix. האפקט משפיע על חדות האובייקטים בתמונה ויוצרת חפיפה לא שווה ביניהם, מה שמשפיע לרעה על איכות התמונה. כותבי מאמר השקיעו מאמץ רב כדי להקל על השפעות האפקט והראו תמונות המראות שיפור ניכר באמצעות שימוש בשיטות שונות שהוצגו במאמר.

באשר להערכת התוצאות, כותבי המאמר השתמשו במטריקות MSE, PNSR (מדד רעש) ומדד אינפורמציה הדדית והשוו את התמונות שיוצרו לתמונות המקוריות באמצעות בחינה ויזואלית. בנוסף, התוצאות הושו לתוצאות שנרכשו באמצעות ארכיטקטורת U-NET, עליה פירטנו בהרחבה, כאשר ארכיטקטורת ה-Pix2Pix עם ידה על העליונה.

חשוב לציין שבהתאם למטרתנו, כותבי המאמר מציגים יכולות תרגום תמונה בתחום הביולוגיה המיקרוסקופית באמצעות שימוש במודל Pix2Pix ולכן המאמר מספק אינדיקציה להצלחתנו העתידית בשימוש בארכיטקטורה זו בתחום המחקר שלנו. עם זאת, בתחומנו אנו עוסקים בתרגום תמונת ברייטפילד דו או תלת מימדית לתמונת פלורסנט דו או תלת מימדית בהתאמה, בעוד ש-[15] (Zhuge et al (2021 במאמרם מציעים תרגום תמונת פלורסנט דו או תלת מימדית לתמונת SIM דו או תלת מימדית, בהתאמה.

אם כך, למרות הדמיון, אנו נדרשים לבצע בדיקות נוספות בתחום המחקר שלנו, שבהן נבחן אם תוצאות ארכיטקטורת Pix2Pix יעילה גם כאשר תמונת הפלורסנט היא תמונת היעד ולא תמונת המקור.

על מנת להרחיב את מאגר המודלים בהם נשתמש נציג את cross domain autoencoder [\[ראה נספח א'\]](#) שפרסמו [18] Yoo et al. במאמרם הם מציעים שיטה נוספת לבצע המרה של תמונה מדומיין אחד לדומיין אחר. המשלבת מספר מודלים של autoencoder.

Autoencoder הינה שיטה המתמחה ב unsupervised feature learning, והינו מורכב משני חלקים מרכזיים: ה-encoder הלומד לתרגם את הקלט לתצורה דחוסה ומוקטנת שלו, הידוע גם בתור שכבת ה-embedding. ה-decoder הלומד לפענח ולשחזר את הקלט מתוך הפלט של ה-encoder.

Yoo et al במאמרם מציעים מודל כאשר מאמנים autoencoder אחד לדחוס את תמונת הקלט ולשחזר אותה בהצלחה, autoencoder שני על מנת לדחוס ולשחזר את תמונת הפלט. וכעת יש encoder שמומחה בלדחוס את תמונת הקלט (encoder zx) וdecoder אשר מומחה בלפענח את תמונת הפלט (decoder zy).

החוקרים אימנו מודל נוסף הנקרא "feature mapping layer" הממיר את הקלט הדחוס לפלט הדחוס באמצעות שכבת קונבולוציה אחת (zx -> zy). המוטיבציה שהובילה את כותבי המאמר, הינה להקטין ככל הניתן את המידע הנדרש על מנת להמיר בין הדומיינים. כאשר יש ייצוג דחוס של הקלט ושל הפלט ניתן להמיר את שכבת הembedding בלבד.

את המודל המאמר השווה מול מודל pix2pix שצוין לעיל ונראה שעובר אותו בביצועים עבור מספר רחב של דאטה סטים מוכרים שהמאמר בחר. עקב כך אנו רוצים להשתמש במודל ש [18] Yoo et al. פיתחו על הדאטה סט שלנו, כאשר המשימה הינה להעביר מדומיין של תמונת ברייטפילד לדומיין של תמונת פלורסנט.

ניהול נתונים

מאגר הנתונים שבו השתמשנו, שפורסם על ידי Allen Institute [16] כולל כ-20 קטגוריות שונות של תמונות מיקרוסקופית תלת ממדיות. כל קטגוריה כוללת מקבץ של עשרות תמונות תלת ממדיות שונות, באיכות גבוהה, בהן מסומן אברון אחד של התא. כל תמונה כזו כוללת ערוץ תמונת ברייטפילד וגם ערוץ תמונה פלורסנטית של אותם מושבות התאים.

נתונים אילו שמורים בפורמט TIFF (Tagged Image File Format), פורמט לאחסון קבצי תמונות וכולל תמיכה בריבוי שכבות. כאשר בחנו את הקבצים, הבחנו כי כל קובץ מכיל תמונה תלת ממדית של קבוצת תאים, וכן ארבעה ערוצים (ברייטפילד, פלורסנציה, תיחום התאים וערוץ דמה לבדיקה).

נחנו לגלות שלא כל ערוצי העומק מכילים מידע ובנוסף, ישנן מגבלות חומרה שלא מאפשרות לעבד את התמונות בשלמותן ובייחוד העבודה שלרשותנו מספר מצומצם של תמונות עבור כל אורגנלה. כל אלה הובילו אותנו לחלק את התמונות לעשרות טלאים תלת ממדיים כקלט למודלים שלנו, המהווים יחדיו דטא-סט עשיר הכולל אלפי ואף עשרות אלפי טלאים ממספר התמונות המצומצם יחסית. במאמר שפורסם על ידי Allen Institute [16] בחרו 32 שכבות מציר העומק באופן רנדומלי על מנת להתמודד עם אילוץ זה. בהתבוננות נוספת, גילינו שערוצי העומק בעלי המידע הם לרוב בעלי התפלגות פיקסלים בהירה יותר ורציפים, לכן בהשראתם, דגמנו 32 שכבות בהתבסס על הערוצים הבהירים ביותר.

בנוסף, התאמנו את גדלי התמונות באמצעות השלמת פיקסלים חסרים לפי השכנים הקרובים ביותר כדי שנוכל לחלק את התמונות לטלאים שווים בגודלם, תחת ההנחה שמדובר במספר פיקסלים נמוך יחסית שאינו משפיע משמעותית על איכות התמונה.

ניהול סיכונים

במהלך הפרויקט, עלו מספר סוגיות שנוגעות בניהול הסיכונים, עליהן נפרט כעת. ראשית, שקלנו התרחשות שבה הארכיטקטורות שבחרנו יתאימו באופן חלקי למשימה, וכן לא יניבו שחזור וחיזוי איכותי מספיק, בין אם עקב חוסר התאמה למודל חיזוי תמונה ובין אם חוסר ההתאמה של המודלים לעבודה עם תמונות מיקרוסקופיה ביולוגית.

כדי להתמודד עם התרחשות זו, חקרנו ופירטנו בסקר הספרות על דרכים רבות בהן ניתן לגשת לבעיה, הוכחנו כי נעשה בהן שימוש בעבודות דומות בתחום המחקר שלנו. נעזרנו במנחה מקצועי ובמספר מוקדי ידע לכל אורך הדרך על מנת להבטיח תהליך מחקר איכותי. הקדשנו מאמץ רב כדי לעבד את הנתונים באופן מיטבי ולבחור מודלי למידה עמוקה שיטיבו עם המשימה. חשוב לציין שלאחר סקירה ראשונית שאחריה יישמנו מודלים נבחרים, נוכחנו לגלות כי ה-Auto Encoder בעל ביצועים לא אופטימליים וכדי לפצות על כך, בחרנו להשתמש בארכיטקטורה נוספת - Cross Domain Auto Encoder, עליה פירטנו לעיל.

שנית, עקב חוסר בקיאותנו בעיבוד תמונה וב-Deep Learning, הערכנו שעל מורכבות המודלים להיות שיקול בבחירתם. יחד עם זאת, ישנם מודלים פשוטים מדי שלא יתמודדו היטב עם המשימה המורכבת שבפנינו. כדי להתמודד עם סוגיה זו, בחרנו במודלים בדרגות מורכבות שונות. בנוסף, כדי להעמיק את הבנתנו בתחום, השתמשנו במודלים שנבחרו עם מידע פחות מורכב. את המודלים המורכבים יותר בחרנו כך שיתבססו המודלים הפשוטים יותר. פעולות אילו הקלו על מורכבות ההבנה וההעמקה של הארכיטקטורות השונות והאימון של המודלים השונים.

נדבר נוסף לניהול הסיכונים כלול בהשקעת המשאבים במודלים השונים. עם משך ההתקדמות בפרויקט, מודלים מבטיחים שבחרנו היו בעלי ביצועים פחות טובים משציפינו ומודל ה-U-Net הניב תוצאות מצוינות, כפי שנפרט בהמשך. בשלב זה נאלצנו להחליט האם להשקיע את מיטב המאמצים במודל המבטיח ולנסות לשפר אותו אף יותר ועל אורגנלות נוספות או להתמקד במודלים האחרים ולהמשיך בניסיונות האופטימיזציה עד שיתקרבו או יעקפו את ביצועי ה-U-net. בסופו של דבר, החלטנו להשקיע את מאמצנו ב-U-net משיקולי עלות-תועלת. עקב חוסר היכולת להעריך את המשאבים הדרושים (זמן, כוח אדם) כדי להביא את המודלים האחרים לביצועים טובים יותר משמעותית ופוטנציאל ההצלחה של מודל ה-U-Net, הערכנו שמיקוד המאמצים בשיפורו תביא לתוצאות טובות אף יותר משל קודמנו.

לסיכום, עלו מספר דילמות הנוגעות בניהול הסיכונים במהלך הפרויקט ובתחילתו. בכולן הערכנו את העלות על מול התועלת עבור החלופות השונות, אותן חקרנו לעומק. לאחר הערכת החלופות, קיבלנו החלטה שקולה ומחושבת, יחד עם המנחה המקצועי ומוקדי ידע נוספים, במידת הצורך.

מתודולוגיית המחקר

במהלך הפרויקט הגדרנו אבני דרך חשובים להצלחת הפרויקט והגדרנו אותם כמטרות משנה, אשר הצלחת הפרויקט הייתה חלק בלתי נפרד מהן. המטרה הראשונה שהצבנו הייתה הבנת הנתונים. בשלב הראשון בפרויקט למדנו על התחום הביולוגי אשר עטף את הפרויקט שלנו. למדנו על מרכיבי התא (אברונים) וכן על סוגי התמונות בהם השתמשנו.

תמונות אלו שמורות בפורמט TIFF (Tagged Image File Format), פורמט לאחסון קבצי תמונות הכולל תמיכה בריבוי שכבות. כאשר בחנו את הקבצים, הבחנו כי כל קובץ מכיל תמונה תלת ממדית של קבוצת תאים, וכן ארבעה ערוצים (ברייטפילד, פלורסנציה, תיחום התאים וערוץ דמה לבדיקה).

אבן דרך עם מטרת משנה נוספת שהצבנו לנו בדרכנו הייתה עיבוד התמונות. בכדי לעבד את התמונות, כהכנה לקלט למודלים, ביצענו קריאה לקבצי ה-TIFF של האברון המתאים והמרתן למערבי NumPy. עבור כל TIFF בחרנו את השכבות הרלוונטיות בציר העומק Z. לשם זאת, בדקנו היוריסטיקות שונות. בצענו מספר ניסויים בעיבוד הנתונים בכדי למצוא את מיקום השכבות (תמונות בציר ה-Z) הטובות ביותר, כאשר מטרתנו הייתה למצוא את השכבות בעלות המידע הרב ביותר. כחלק מניסיונות אלו בדקנו את אמצע הציר וכן את החלקים הבהירים ביותר בציר, מתוך הבנה ביולוגית של הנתונים כי שכבות בעלות מידע רב יותר יהיו בהירות יותר.

על מנת שסט האימון ותהליך האימון יוכל להיות מרוכז בטווח מוגדר וברור מראש, ביצענו נורמליזציה לנתונים. נרמלנו את הפיקסלים בתמונות לטווח שבין 0 ל-1 לפי התפלגות נורמלית. בנוסף, בכדי להקטין את כמות הנתונים לאימון בצענו המרה לפיקסלים, כך שנשמור 16 בייט במקום 64 בייט לפיקסל. בצענו בדיקות על מנת לוודא שפעולה זו אינה פוגעת באיכות הנתונים, כך שבמבחן הקורלציה שערכנו בין תמונות המקור לתמונה המוקטנת הבנו כי ההבדל בין התמונות זניח, וכן הערך הנוסף המתקבל מהמרה זו, בו אנו יכולים לעבד מספר רב יותר של תמונות במקביל מניב לנו תוצאות איכותיות יותר.

מפאת גודלן של התמונות ובשל הצורך בהרחבת סט האימון, החלטנו לחלק את התמונות למספר טלאים (patches) אשר יחדיו מהווים דאטה-סט עשיר הכולל אלפי ואף עשרות אלפי טלאים ממספר התמונות המצומצם יחסית. לאחר קריאת המחקר המקדים, ולאחר ניסיונות רבים, ביחד עם המנחה המקצועי שלנו הגענו לגודל טלאי $(X \times Y \times Z)$ $64 \times 64 \times 3$ אשר הניב לנו תוצאות איכותיות במדד פירסון וברורות במדד העין האנושית. בנוסף, בכדי להתייחס לאפשרויות רבות בהם ניתן לחלק את התמונות הוספנו 2 פיצ'רים אשר אפשרו לנו להגדיל את כמות הנתונים וכן לנצל את המגוון הרחב של טלאים שאפשר לחלק כל תמונה. הפיצ'ר הראשון אותו פיתחנו והשתמשנו היה חפיפת טלאים (overlapping patches) כאשר יצרנו אפשרות להוסיף עשרות טלאים חופפים כך שנוכל לקבל תמונות שונות ככל האפשר המתנהגות למעשה כאוגמנטציות לנתונים. הפיצ'ר הנוסף אותו פיתחנו הוא בחירת מספר רב של תמונות תלת ממדיות $64 \times 64 \times 3$ מאותו קובץ

TIFF. כאמור, בתחילה התרכזנו רק בשכבות הטובות ביותר על פי הגדרתנו. בכדי להמשיך את קו המחקר הנעשה לפנינו, בו השתמשו ב 32 שכבות בציר העומק, הוספנו את האפשרות לעבד מספר תמונות תלת ממדיות בגודל 64x64x3. פיצ'רים אלו, הוסיפו לאימון המודלים שלנו מידע בעל ערך רב, בכדי שנוכל לקבל חיזוי מדויק ואיכותי יותר.

ניסויים

במסגרת המחקר שלנו, מימשנו ארבעה מודלי למידה עמוקה שונים המתאימים למשימת שחזור תמונה: UNET, Image to Image Autoencoder, Pix2Pix, Cross Domain Autoencoder.

ארבעת המודלים מימשנו בעצמנו, בהתאם למאמרים שנעשו שפורסמו בעבר והוכיחו שהם מתאימים למטרת המחקר.

בנוסף לבחירת המודלים, היינו צריכים לבחור את האורגנלות (אברונים) אותם נרצה לחזות. תא מכיל מספר רב של אורגנלות ולרשותנו היה נתונים על למעלה מ-20 אורגנלות שונות. בחרנו 4 אורגנלות שונות אותם נרצה לחזות והם - Mitochondria, Nuclear Envelope, Actin Filaments, Endoplasmic Reticulum.

בדומה למודלים, האורגנלות לא נבחרו באופן אקראי. הבחירה באורגנלות אלו התבססה על תוצאות מחקר שנעשה בעבר על אותו מקור נתונים ולפיו אלו ארבעת המודלים עם הסיכויים הגבוהים ביותר לשחזור מוצלח.

במהלך הפרויקט, הכנו תשתית מתאימה לבניית המודלים, בצורה גנרית עד כמה שאפשר. תוך הקפדה על תיעוד, פלטים ותוצרים משמעותיים על מנת שנוכל ללמוד ולתעד את תוצאות המודלים שלנו. לאחר מכן, בנינו את אבי הטיפוס של המודלים, בזה אחר זה, תוך שימוש במאמרים שקראנו בזמן המימוש. במהלך העבודה על המודלים נתקלנו בקשיי חומרה, ונאלצנו לחזור מספר רב של פעמים אל שלב הכנת הנתונים בכדי להצליח להריץ את המודלים. תהליך הכנת הנתונים, כפי שתואר בפסקאות לעיל, הינו תוצר של עבודה מרובה של ניסיון וטעיה אל מול מגבלות החומרה שניצבו בפנינו. לאחר בניית רב טיפוס ראשוני למודל, נעזרנו במנחה המקצועי שלנו ובידע שרכשנו למען הפרויקט בכדי לבצע אופטימיזציה למודל.

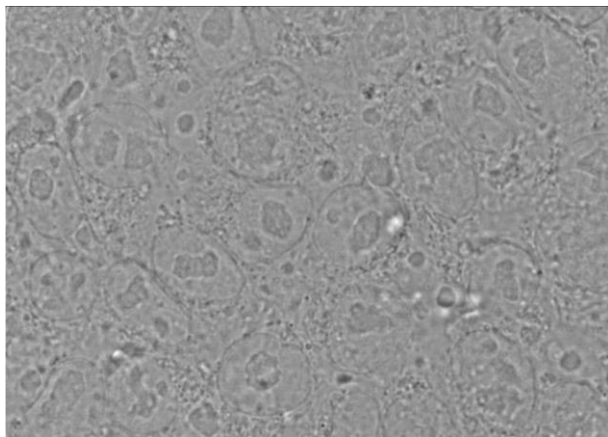
בסיום הניסויים, בנינו טבלת השוואה בין המודלים השונים ומידת הצלחת השחזור של כל אחת מהאורגנלות מבוסס על מדד פירסון, אותה ניתן לראות בפרק התוצאות.

תוצאות

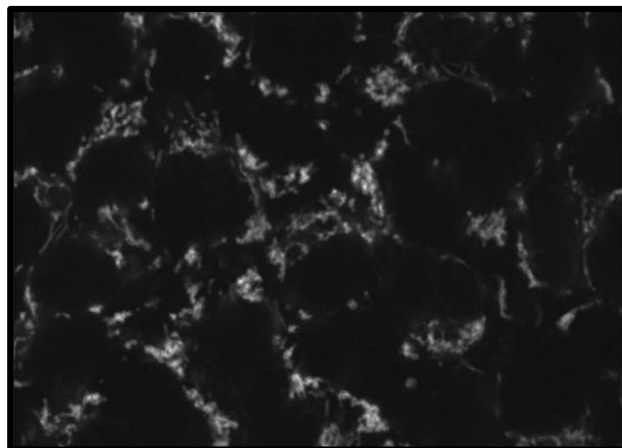
תוצרי המודלים - תמונות

Mitochondria

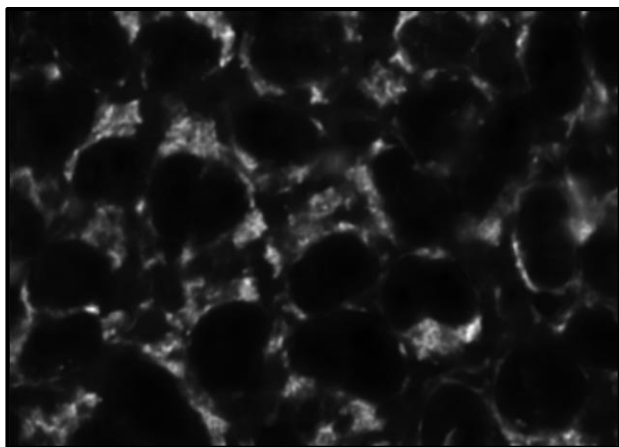
Input



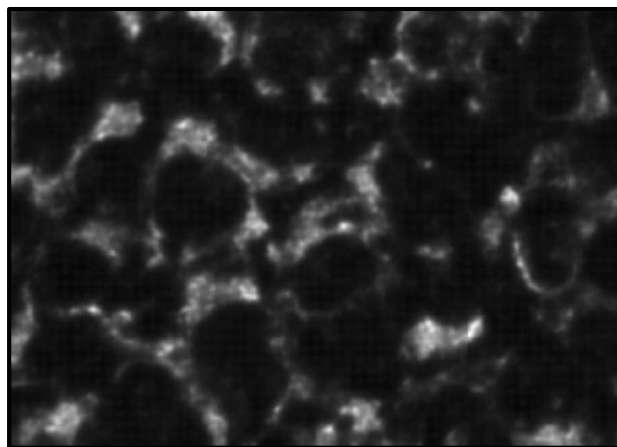
Ground Truth



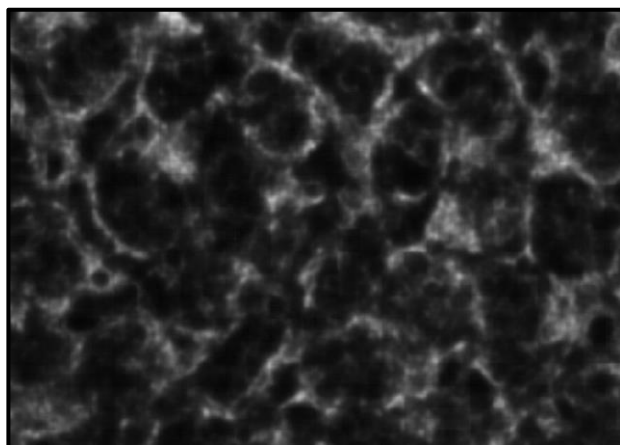
UNET



Img2Img Autoencoder

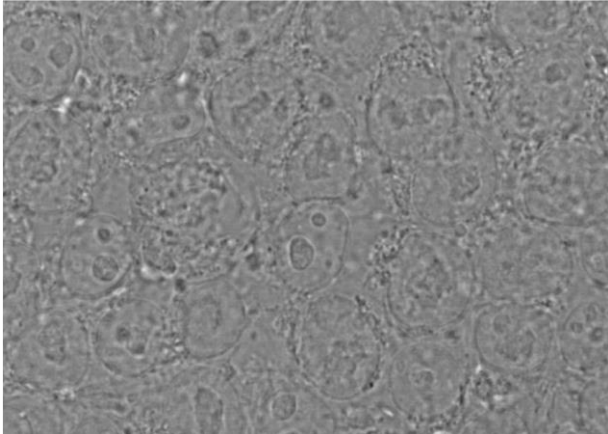


Pix2Pix

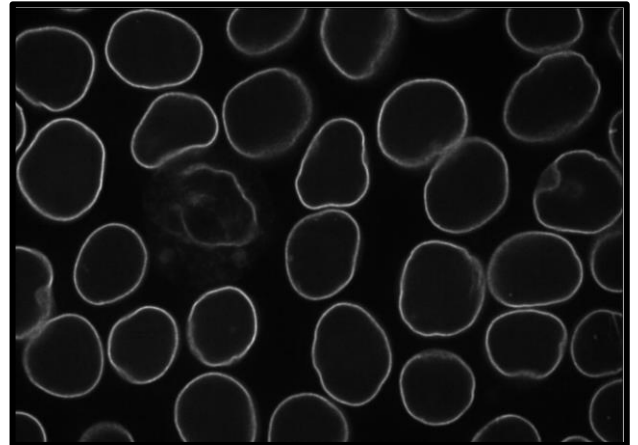


Nuclear Envelope

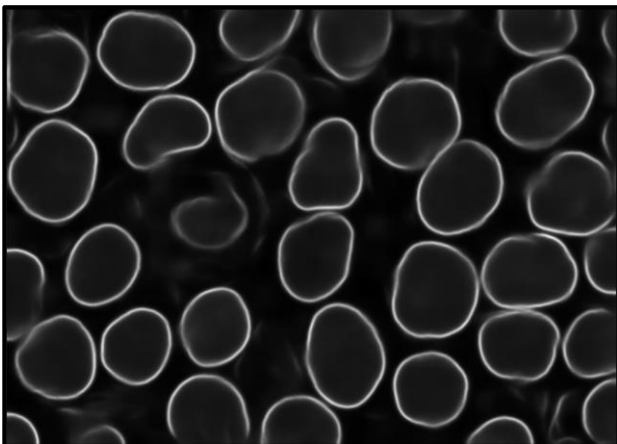
Input



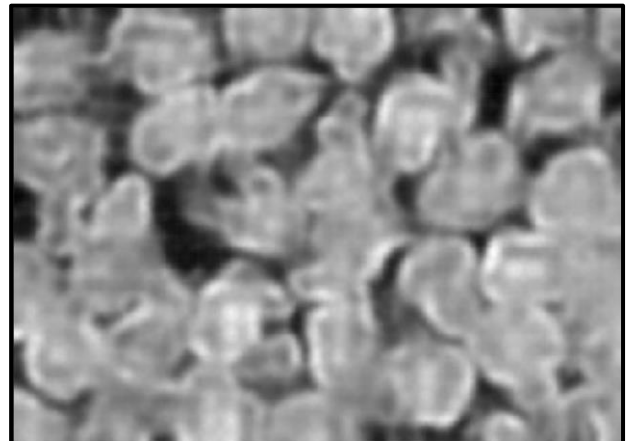
Ground Truth



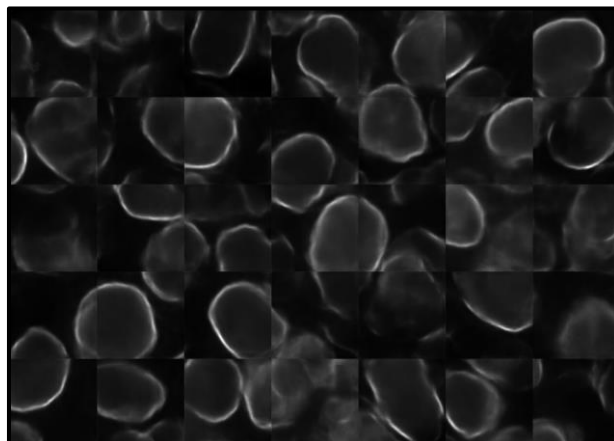
UNET



Img2Img Autoencoder

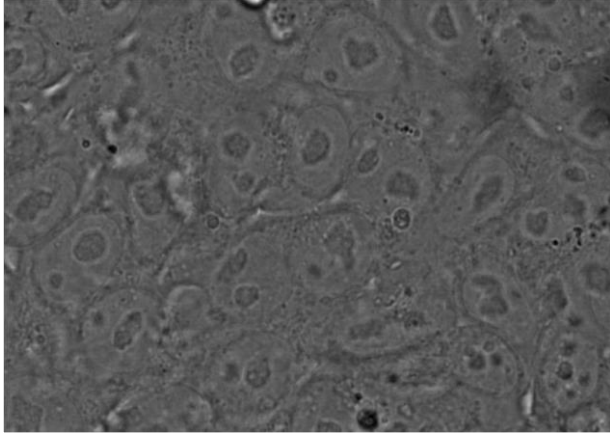


Pix2Pix

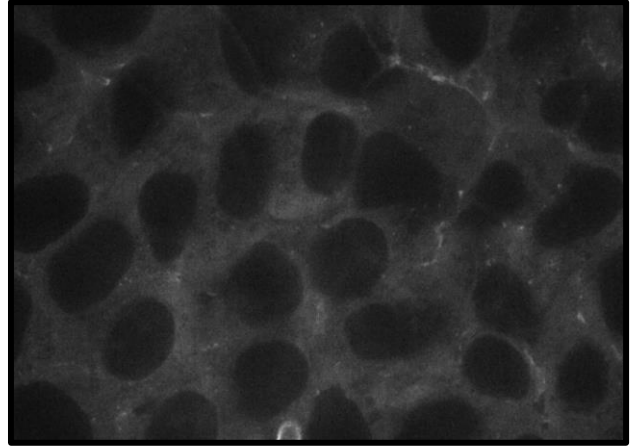


Actin Filaments

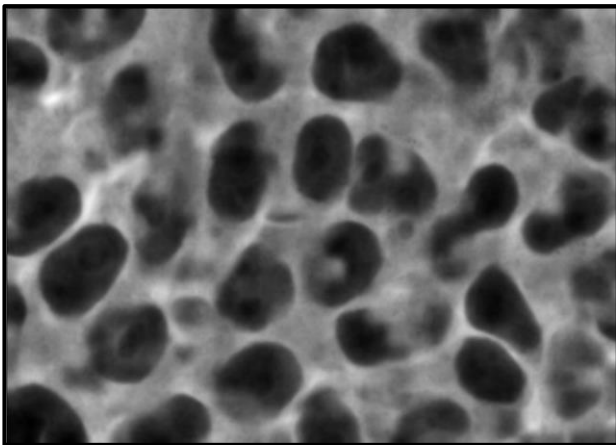
Input



Ground Truth



UNET



Img2Img Autoencoder

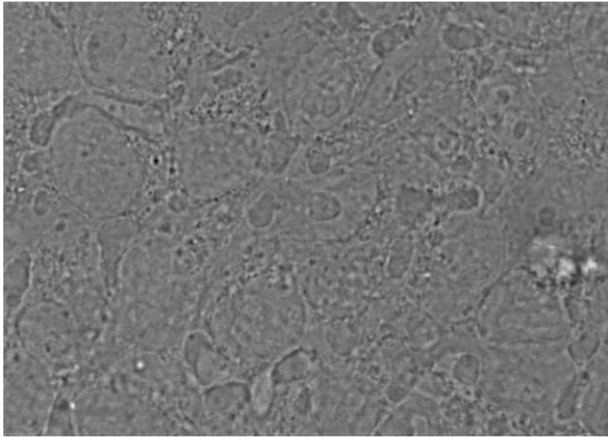


Pix2Pix

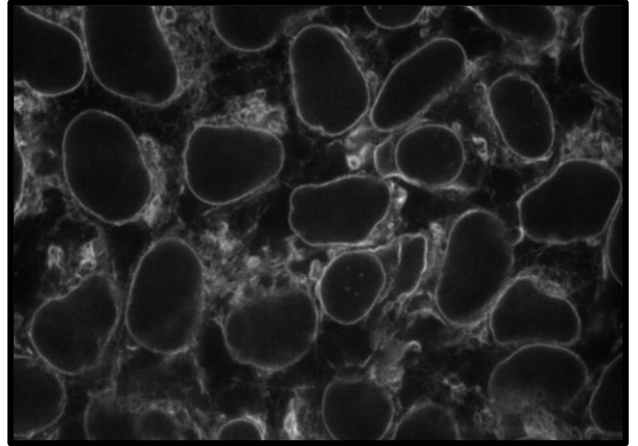


Endoplasmic Reticulum

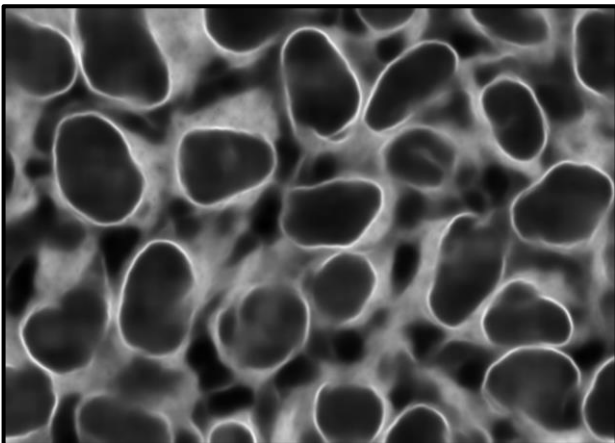
Input



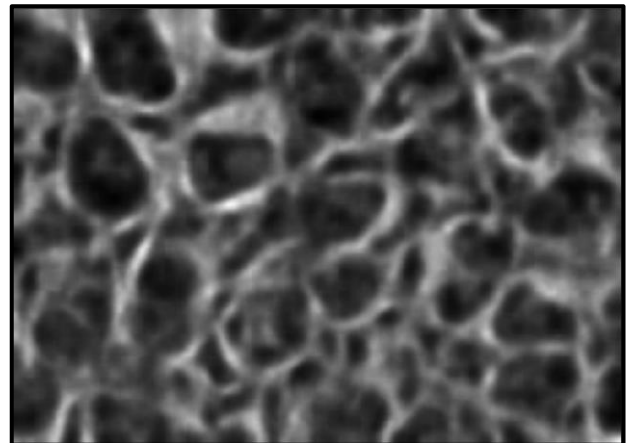
Ground Truth



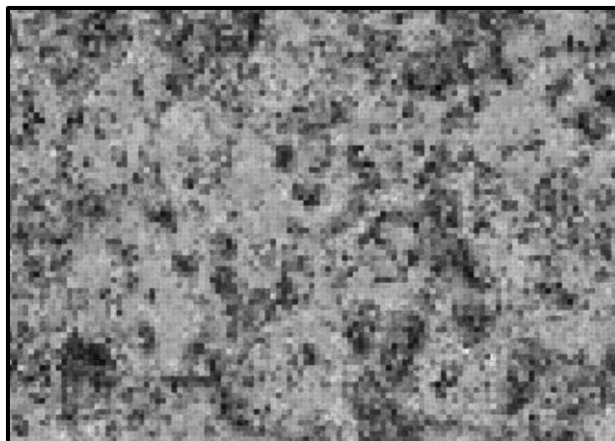
UNET




Img2Img Autoencoder



Pix2Pix



תוצאות – טבלה מסכמת

Organelle / Model	Image 2 Image Autoencoder	UNET	Pix2Pix	Cross Domain Auto Encoder	 ALLEN INSTITUTE for CELL SCIENCE
Mitochondria	0.625	<u>0.753</u> *	0.393	0.264	0.742
Nuclear Envelope	0.177	<u>0.781</u>	0.142	0.311	0.864
Actin Filaments	0.541	<u>0.734</u> *	0.344	0.395	0.709
Endoplasmic Reticulum	0.342	<u>0.716</u>	0.399	0.172	0.721

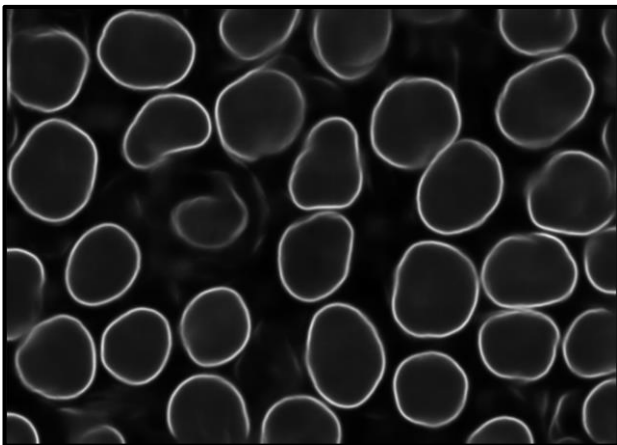
* מודל שתוצאת מדד הפירסון שלו עבור האורגנלה המסוימת גבוה יותר במודל שלנו מאשר של Allen Institute.

מסקנות

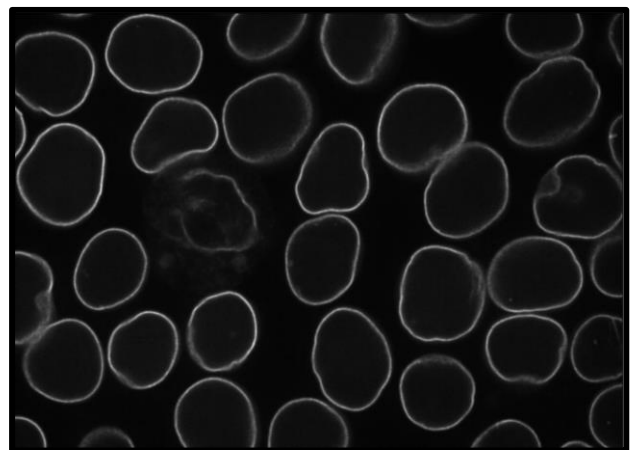
ניתן לראות מהתוצאות שלנו כי בניגוד להשערה של המחקר שלנו, UNET הינו המודל המתאים ביותר למשימה עבור כלל האורגנלות. התוצאות של UNET עקפו באופן משמעותי את התוצאות של שאר המודלים, כאשר image2image Autoencoder נמצא אחריו בתוצאות, ניתן להסביר זאת שמודל UNET מותאם יותר למשימה שלנו, בעוד ש-Autoencoder לרוב משמש על מנת לדחוס ולשחזר את אותה התמונה, UNET נוצר על מנת לבצע סגמנטציה לתמונות, פעולה שיותר קרובה ומתאימה למשימה שלנו, לUNET יש יתרון על ה-Autoencoder מכיוון שיש לו את ה-SKIP Connections. פעולה שעוזרת רבות למשימה.

למרות זאת, ניתן לראות כי באורגנלה nuclear-envelope ישנו חיסרון של מודל UNET שאנו פיתחנו, בעוד שהתמונות הנחזות עוברות את מבחן הנראות הפיזית, בציון המתמטי הן לוקות בחסר. לאימון המודל השתמשנו במדד MSE על מנת לחשב את פונקציית ההפסד עבור כל batch, מדד זה נוטה להעדיף ערכים קיצוניים. לכן, אנו מבינים כי עלול לקרות מצב בו פיקסלים בהירים בתמונה המקורית יהיו בהירים אף יותר בתמונה החזויה. באורגנלה של nuclear-envelope ישנם קווי מעטפת בהירים רציפים בתמונה המקורית, ובעוד בתמונה החזויה הפיקסלים מקבלים ערכים בהירים עוד יותר. דבר זה הוביל אותנו להבנת התוצאות כי למרות שבמבחן העין התמונות נראות איכותיות במבחן המספרי ישנו חיסרון בולט.

UNET



Ground Truth



ניתן לראות שלמרות הציפיות הגדולות שלנו מ-pix2pix התוצאות לא היו מרשימות ולרוב הציון המתקבל היה מתחת ל-0.5. הפאצ'ים(טלאים) לא יתחברו באופן קוהרנטי אחד עם השני ובעוד פאצ' אחד נחזה באופן איכותי, אחר נחזה באופן לא מספק, דבר שגרם לתמונה המחוברת להראות משובצת.

אנו עדיין מאמינים כי מודל זה מתאים למשימה ויכול לעבור בתוצאות UNET והתוצאות הירודות המתקבלות ממנו הן ככל הנראה עקב המורכבות והניסיון הנדרש בלפתח מודל שכזה.

בנוסף, נציין גם את מודל ה-Cross Domain שבמאמר הציג תוצאות טובות עבור משימות של מעבר בין דומיינים שונים, אך עבור המשימה שלנו הציג תוצאות חסרות. למרות שכל אחד משני Autoencoders המרכיבים אותו ביצע את המשימה שלו בהצלחה יתרה עם ציון פירסון של 0.997 המעבר בין הדומיינים בשלב ה-Feature mapping layer אינו הצליח להתאמן באופן איכותי וההמרה נשארה החלק החסר במודל.

בנוסף הבחנו כי בניגוד להבחנה של אלן אינסטיטוט [5] הצלחנו להגיע לתוצאות חיזוי דומות אם לא יותר טובות עם מודל ה-UNET שלנו כאשר השתמשנו במשמעותית פחות שכבות Z, כאשר במאמר המקורי כל קלט למודל היווה 32X64X64 הקלט אצלנו היווה 3X64X64. באופן זה הראנו כי ניתן לצמצם את גודל הקלט של פאץ' בודד למודל.

בדומה להבחנה הקיימת במחקר של אלן [5] כאשר מאמנים מודל המשלב מספר רב של אורגנולות התוצאות יורדות שכן כל אורגנולה דורשת מודל ייחודי המכיר את התכונות הספציפיות שלה.

השתמשנו בתכונה זו על מנת לזהות אורגנולות אשר אינן חלק מסט הדאטה של האורגנולות איתן אנו רוצים לאמן את המודל, שכן התמונות הנחזות עבור האנומליות בסט קיבלו ציון פירסון נמוך בכ-3 סטיות תקן מהממוצע. לדוגמה הצלחנו לזהות שבתוך הדאטה שלנו Mitochondria היו כמה תמונות של Microtubules (ככל הנראה טעות אנוש בתיג עקב השם הדומה), המודל לא חזה את התמונות של Microtubules באופן איכותי ולכן יכולנו למצוא אותם בקלות יחסית לנקות אותם לתיקיה המתאימה. פעולה זו העלתה את תוצאות החיזוי שכן המודלים כעת מתאמנים רק על הדאטה המתאים.

המטרה המרכזית של המחקר שלנו הינה השוואה בין מודלים נוספים איתם ניתן להשתמש על מנת לבצע את המשימה החשובה הזאת, אשר יכולה לתרום המון לעולם הביולוגיה. בעזרתה, המדען הבא שמתעסק בנושא זה יוכל להשתמש במודלים שאנו ממליצים למשימה. בעוד שהמודלים שמצאנו לא הראו שיפור ניכר למשימה, מבטיחים ככל שיהיו, הראנו כי מודל ה-UNET מתאים כמעט לכל חיזוי של אורגנולה (מבין אלו שחקרנו). לכן ההשוואה שביצענו כאן תוכל לעזור למדען העתידי, ונמליץ לו להשתמש במודל ה-UNET על מנת לבצע את החיזוי עבור האורגנולה שברצונו לחזות.

אתגרים לעתיד

1. הרחבה לכלל האורגנלות המרכיבות את התא - בפרויקט הרצנו את המודלים על מספר מצומצם של אורגנלות, כמשימה להמשך, ניתן להרחיב לכלל האורגנלות.
2. שיפור המודלים - תמיד יש מקום לשפר את ביצועי המודלים תוך ביצוע אופטימיזציה שתעלה את מדד דיוק החיזוי.
3. הרחבה למודלים נוספים - בחרנו ארבעה מודלים לביצוע המשימה, פורסמו מאמרים נוספים למודלים אחרים ברמת מורכבות שונה שיכולים להתאים ולכן כדאי לבחון את התאמתם.
4. פרסום מאמר אשר יכול להשפיע משמעותית על עולם הביולוגיה המיקרוסקופית.

Journal Article (paginated by issue), more than seven authors .1

Zaritsky, A., Jamieson, A., Welf, E., Nevarez, A., Cillay, J., Eskiocak, U., Cantarel, B., Danuser, G. (2020)
Interpretable deep learning of label-free live cell images uncovers functional hallmarks of highly-metastatic melanoma. Cell systems, 2021-07-21, Vol.12 (7), p.733-747.e6

Journal Article (continuous pagination throughout volume) .2

LaChance, Julianne ; Cohen, Daniel J, (2020),
Practical Fluorescence Reconstruction Microscopy for Large Samples and from transmitted light microscopy, Low-Magnification Imaging. United States: Public Library of Science, PLoS computational biology, 2020-12-23, Vol.16 (12), p.e1008443-e1008443

Journal Article (paginated by issue) .3

Ronneberger, Olaf ; Fischer, Philipp ; Brox, Thomas, (2015),
U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation, Cornell University

Journal Article (continuous pagination throughout volume) .4

Belthangady, Chinmay ; Royer, Loic A, (2019),
Applications, promises, and pitfalls of deep learning for fluorescence image reconstruction.
United States: Nature Publishing Group Nature methods, 2019-12-01, Vol.16 (12), p.1215-1225

Journal Article (paginated by issue), more than seven authors .5

Ounkomol, Chawin ; Seshamani, Sharmishtaa ; Maleckar, Mary M ; Collman, Forrest ;
Johnson, Gregory R (2018)

Label-free prediction of three-dimensional fluorescence images from transmitted-
light microscopy

LONDON: NATURE PUBLISHING GROUP

Nature methods, 2018-11-01, Vol.15 (11), p.917-920

Journal Article (paginated by issue) .6

Angermueller, Christof ; Pärnamaa, Tanel ; Parts, Leopold ; Stegle, Oliver, (2016)

Deep learning for computational biology

HOBOKEN: WILEY

Molecular systems biology, 2016-07, Vol.12 (7), p.878-n/a

Publication Type: Book .7

Hastie, Trevor author -- Tibshirani, Robert author -- Friedman, J. H. (Jerome H.)
author,(2015)

The Elements of statistical learning : data mining, inference, and prediction.

New York, NY : Springer -- 2016

Second edition, corrected at 11th printing 2016.

Publication Type: Book .8

Murphy, Kevin P., 1970- author, (2012)

Machine learning: a probabilistic perspective

Cambridge, MA : MIT Press -- 2012

Journal Article (paginated by issue) .9

Michalski, Pinter, Gergo ; Mosavi, Amir ; Felde, Imre, (2013)

Machine learning: an artificial intelligence approach. Berlin Heidelberg: Springer

Science & Business Media BASEL: MDPI

Entropy (Basel, Switzerland), 2020-12-01, Vol.22 (12), p.1-14

Journal Article (paginated by issue) .10

Liu, Zhi-Song ; Siu, Wan-Chi ; Wang, Li-Wen ; Li, Chu-Tak ; Cani, Marie-Paule ; Chan,

Yui-Lam (2020)

Unsupervised Real Image Super-Resolution via Generative Variational AutoEncoder

Publication Type: Book .11

Rumelhart, D.E., Hinton, G.E., Williams, R.J.: (1986). Parallel distributed processing:

Explorations in the microstructure of cognition, vol. 1. chap. Learning Internal

Representations by Error Propagation, pp. 318–362. MIT Press, Cambridge, MA, USA

Journal Article (paginated by issue) .12

C. Li and M. Wand, (2016).

Precomputed real-time texture synthesis with markovian generative adversarial

networks. ECCV. 2, 4

Journal Article (paginated by issue) .13

Isola, Phillip ; Zhu, Jun-Yan ; Zhou, Tinghui ; Efros, Alexei A (2016)

Image-to-Image Translation with Conditional Adversarial Networks

Journal Article (paginated by issue), more than seven authors .14

oodfellow, Ian J ; Pouget-Abadie, Jean ; Mirza, Mehdi ; Xu, Bing ; Warde-
Farley, David ; Ozair, Sherjil ; Courville, Aaron ; Bengio, Yoshua (2014)
Generative Adversarial Networks

Journal Article (paginated by issue) .15

Zhuge, Huimin ; Summa, Brian ; Hamm, Jihun ; Brown, J. Quincy (2021)
Deep learning 2D and 3D optical sectioning microscopy using cross-modality Pix2Pix
cGAN image translation
Biomedical optics express, 2021-12-01, Vol.12 (12), p.7526

Web Page .16

Allen Institute, available at: <https://alleninstitute.org/>

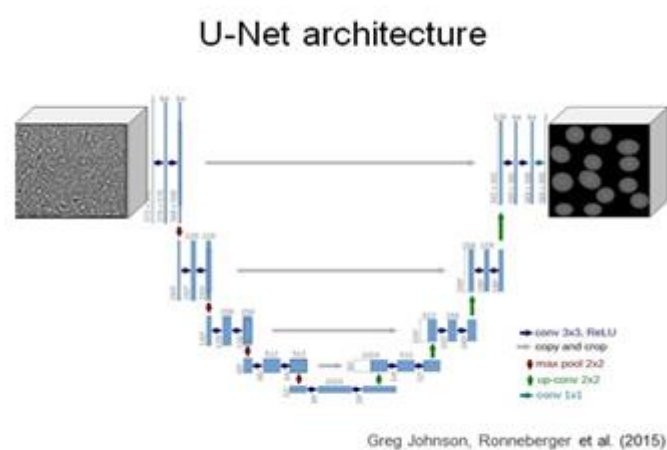
Web Page .17

Organelle, Wikipedia available at: <https://en.wikipedia.org/wiki/Organelle>

Journal Article (paginated by issue) .18

Yoo, Jaechang ; Eom, Heesong ; Choi, Yong Suk
Basel: MDPI AG
Applied sciences, 2019-11-08, Vol.9 (22), p.4780

UNET



Pix2Pix

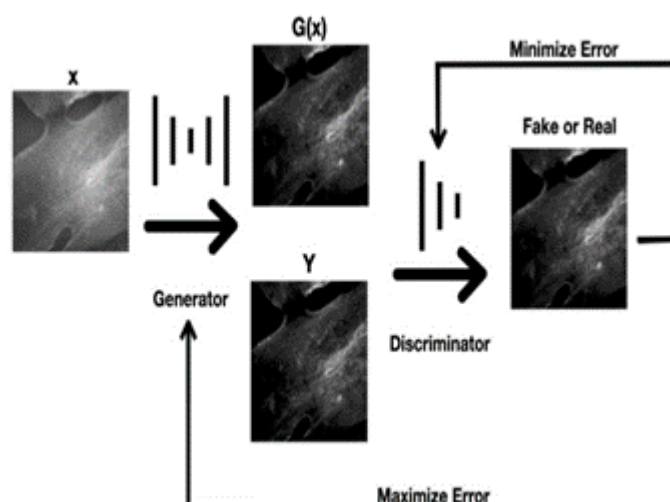
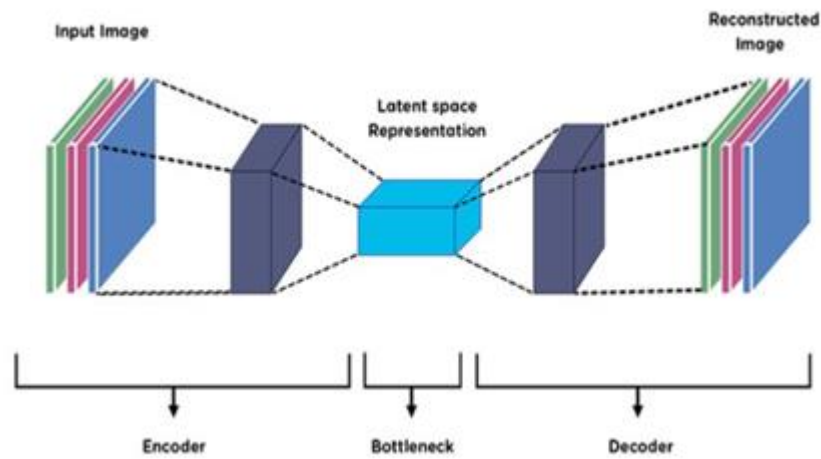


Image2Image Autoencoder



Cross-Domain Autoencoder

