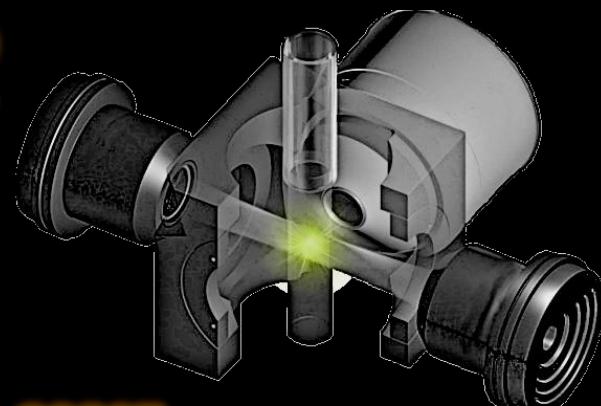
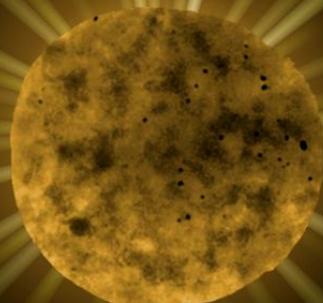




NUOVE FRONTIERE PER TESTARE FARMACI: INFORMATICA E COLTURE CELLULARI IN 3D

Eng. Filippo Piccinini, PhD
IRST IRCCS, Meldola, Italy



10/06/2020
“Ragazze Digitali - Summer Camp 2020”

Outline

- **Introduzione**
- **Approvazione di un farmaco**
- **Colture cellulari 3D**
- **Software per analisi in 3D**
- **3D High-Content Screening**
- **Conclusioni**

Outline

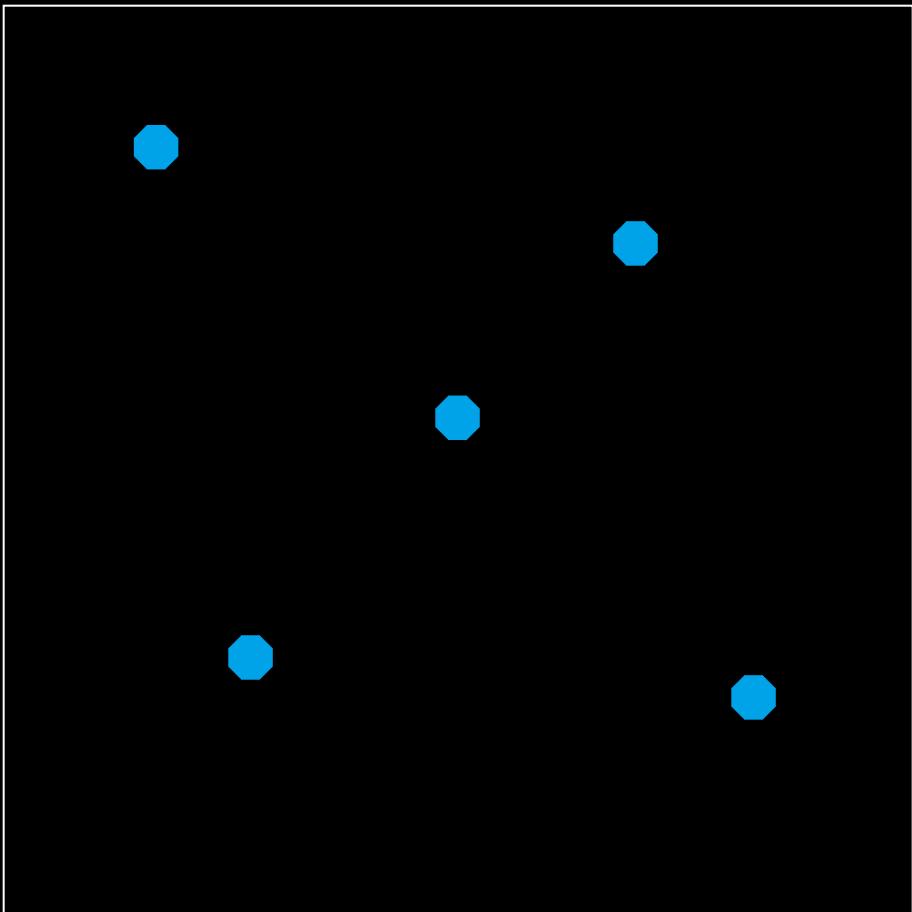
- **Introduzione**
- **Approvazione di un farmaco**
- **Colture cellulari 3D**
- **Software per analisi in 3D**
- **3D High-Content Screening**
- **Conclusioni**

Giochiamo!

Quanti puntini blu riesci a vedere?

Giochiamo!

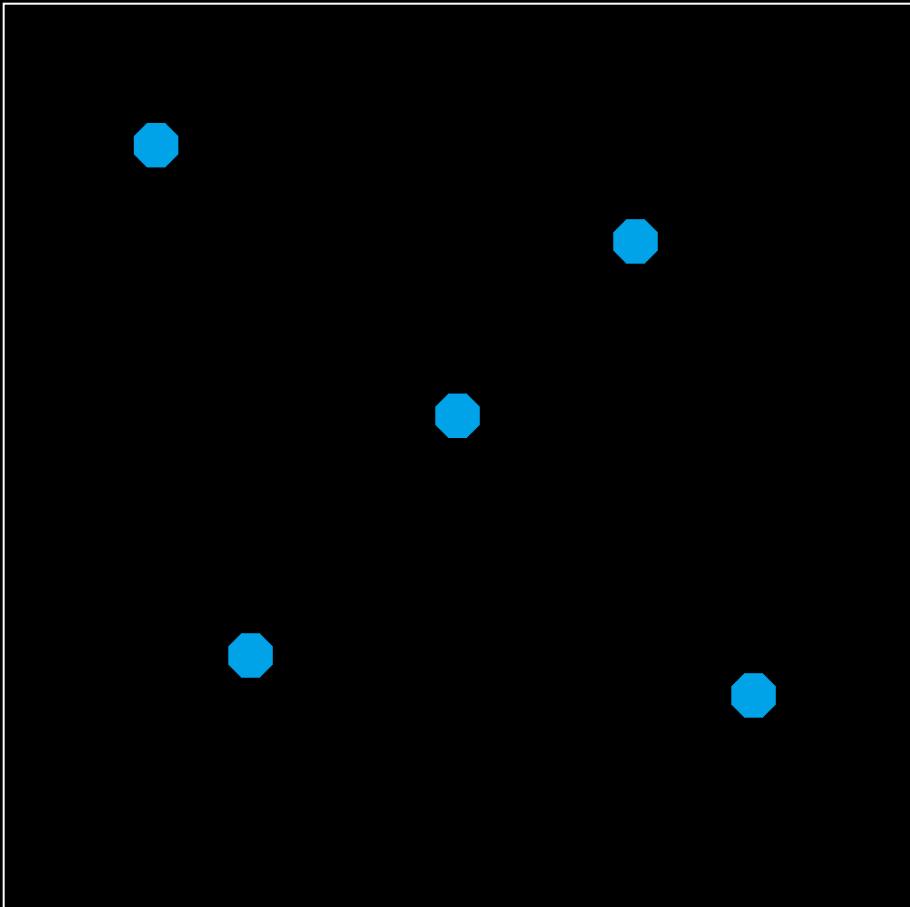
Quanti puntini blu riesci a vedere?



Giochiamo!

Quanti puntini blu riesci a vedere?

5 PUNTINI



PERFORMANCE:

Humans ~3 sec

Computers ~1 sec

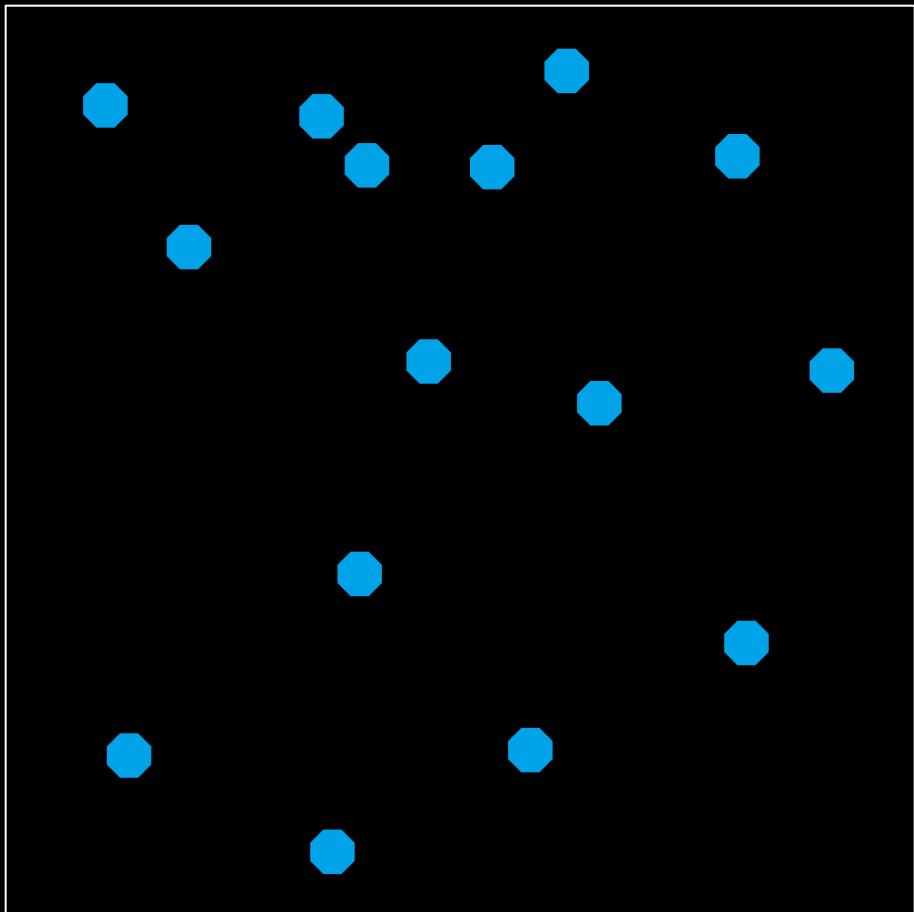
(using the standard Watershed segmentation algorithm)

Giochiamo!

Quanti puntini blu riesci a vedere?

Giochiamo!

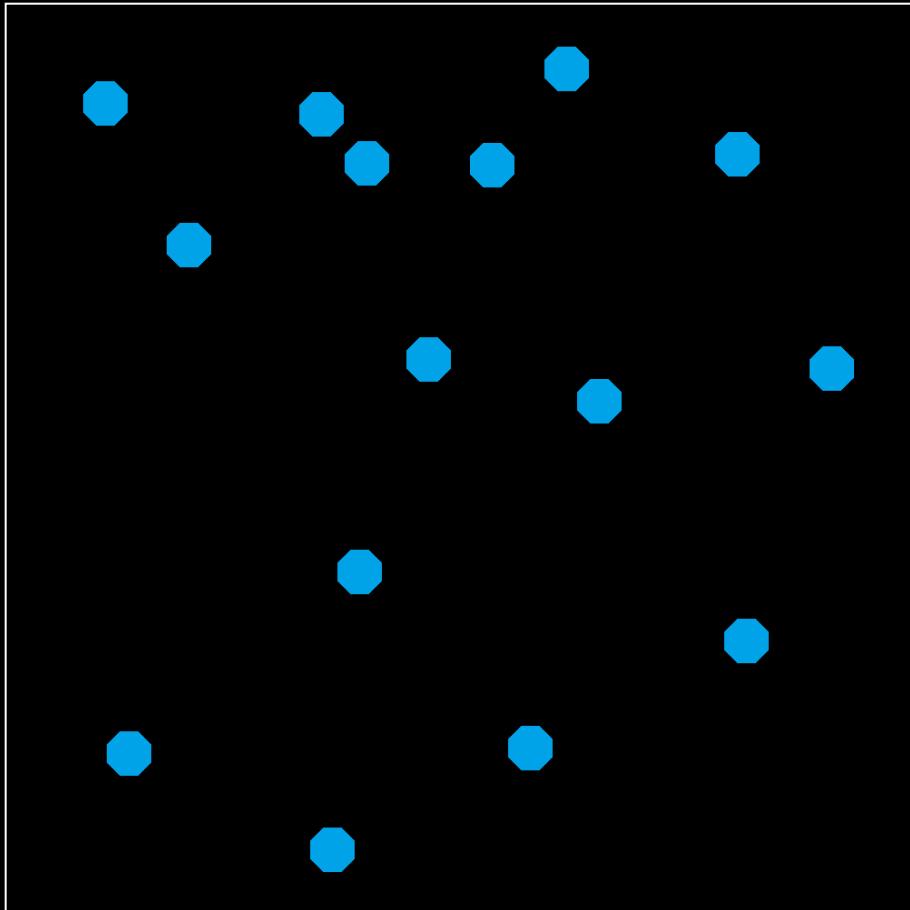
Quanti puntini blu riesci a vedere?



Giochiamo!

Quanti puntini blu riesci a vedere?

15 PUNTINI



PERFORMANCE:

Humans ~6 sec

Computers ~1 sec

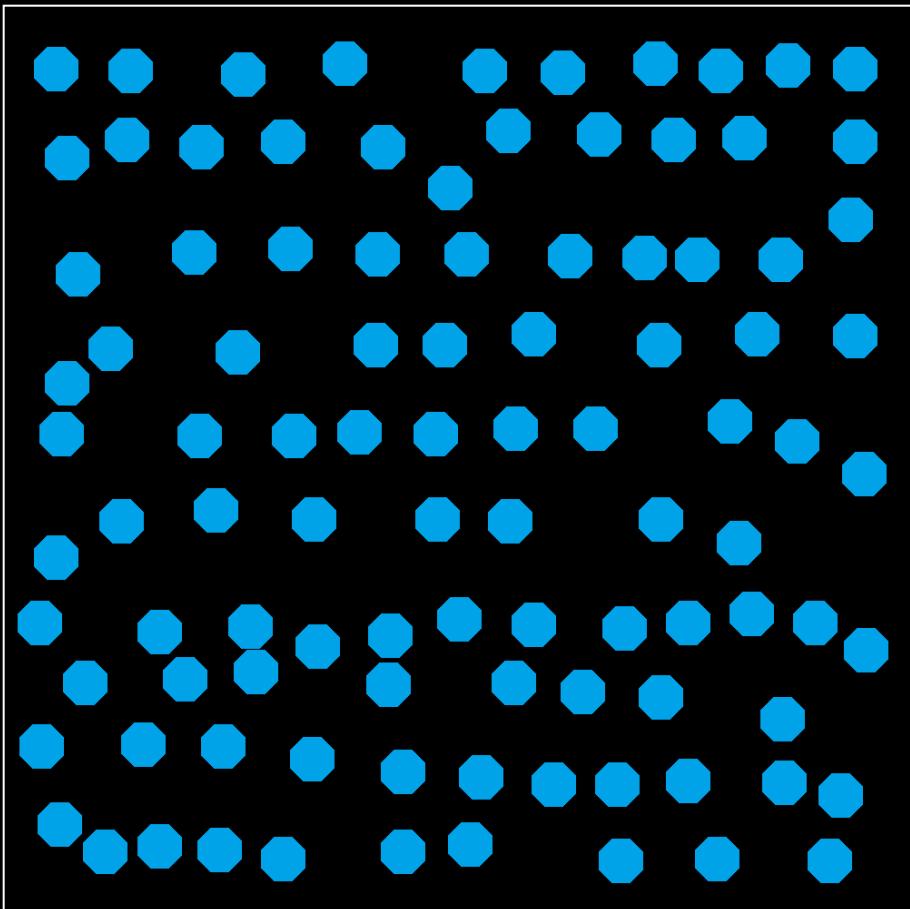
(using the standard Watershed segmentation algorithm)

Giochiamo!

Quanti puntini blu riesci a vedere?

Giochiamo!

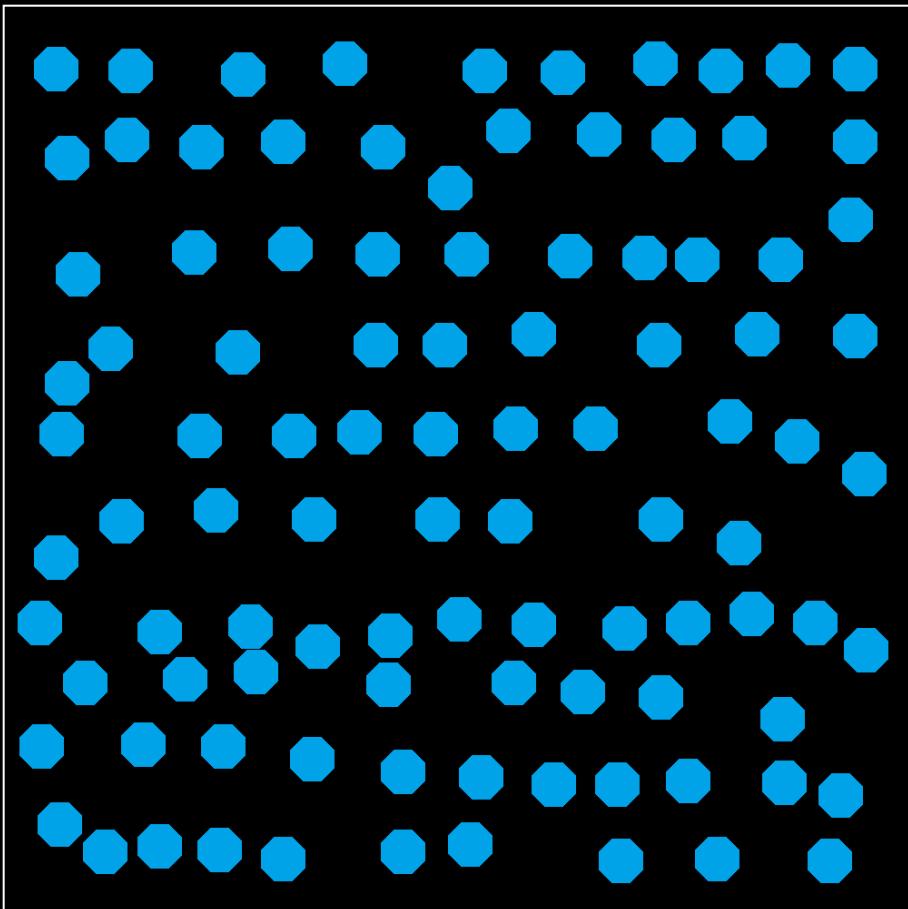
Quanti puntini blu riesci a vedere?



Giochiamo!

Quanti puntini blu riesci a vedere?

99 PUNTINI



PERFORMANCE:

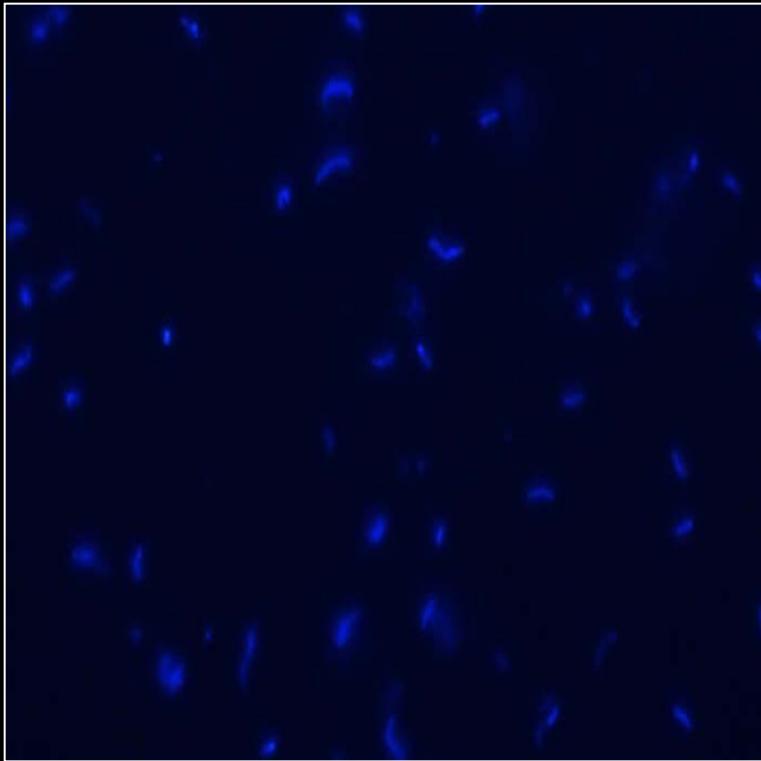
Humans :-(
:-)

Computers ~1 sec

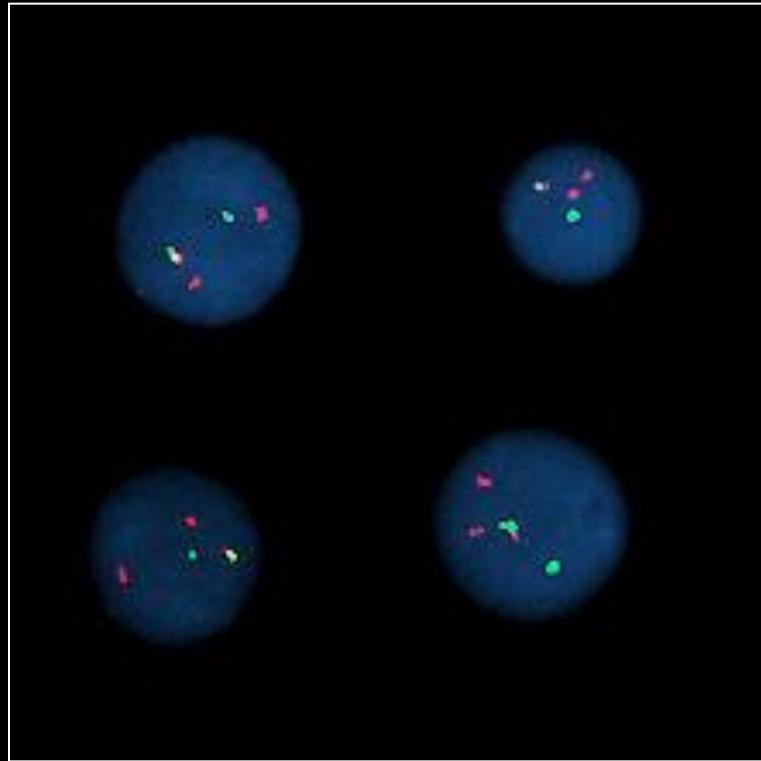
(using the standard Watershed segmentation algorithm)

Per essere competitivi abbiamo bisogno di software!

Cell counting applications



FISH analysis



Giochiamo!

Leggendo alcune lettere sparse sarai in grado di comprendere una frase intera...

Giochiamo!

Leggendo alcune lettere sparse sarai in grado di comprendere una frase intera...

La ruota della fortuna, condotto dal 1989 al 2003 da Mike Bongiorno

Giochiamo!

RIPETI DOPO AVER LETTO

Giochiamo!

RIPETI DOPO AVER LETTO

COM T CH ?

Giochiamo!

RIPETI DOPO AVER LETTO

OG E' U BE A
NATA!

Giochiamo!

RIPETI DOPO AVER LETTO

LA DOM CA E' IL
PU' B GIO LA
SE NA.

Giochiamo!

RIPETI DOPO AVER LETTO

SE LA SME CON
QUE STU DO GI O
RA' U GIO
MI ORE!!!

Giochiamo!



Our fast brain!

- According to a research at Cambridge University, it doesn't matter in what order the letters in a word are, the only important thing is that the first and last letter be at the right place. The rest can be a total mess and you can still read it without problem. This is because the human mind does not read every letter by itself, but the word as a whole...
- Secondo uno studio dell'Università di Cambridge, non importa come sono scritte le parole, tutte le lettere possono essere al posto sbagliato, è importante solo che la prima e l'ultima lettera siano al posto giusto, il resto non conta. Il cervello è comune sempre in grado di decifrare tutto questo cosa, perché non legge ogni singola lettera, ma legge la parola nel suo insieme...

Dalla presentazione del Prof. Giovanni Emanuele Corazza (Università di Bologna), durante il seminario:



LEONARDO DA VINCI: APOTEOSI DELLA CREATIVITÀ MULTIDISCIPLINARE

500° anniversario della morte di Leonardo da Vinci
(15 aprile 1452 - 2 maggio 1519)

2 maggio 2019 - DAMSLab/Auditorium



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Giochiamo!

Con questo video vedremo come le immagini possono essere usate per produrre informazione...

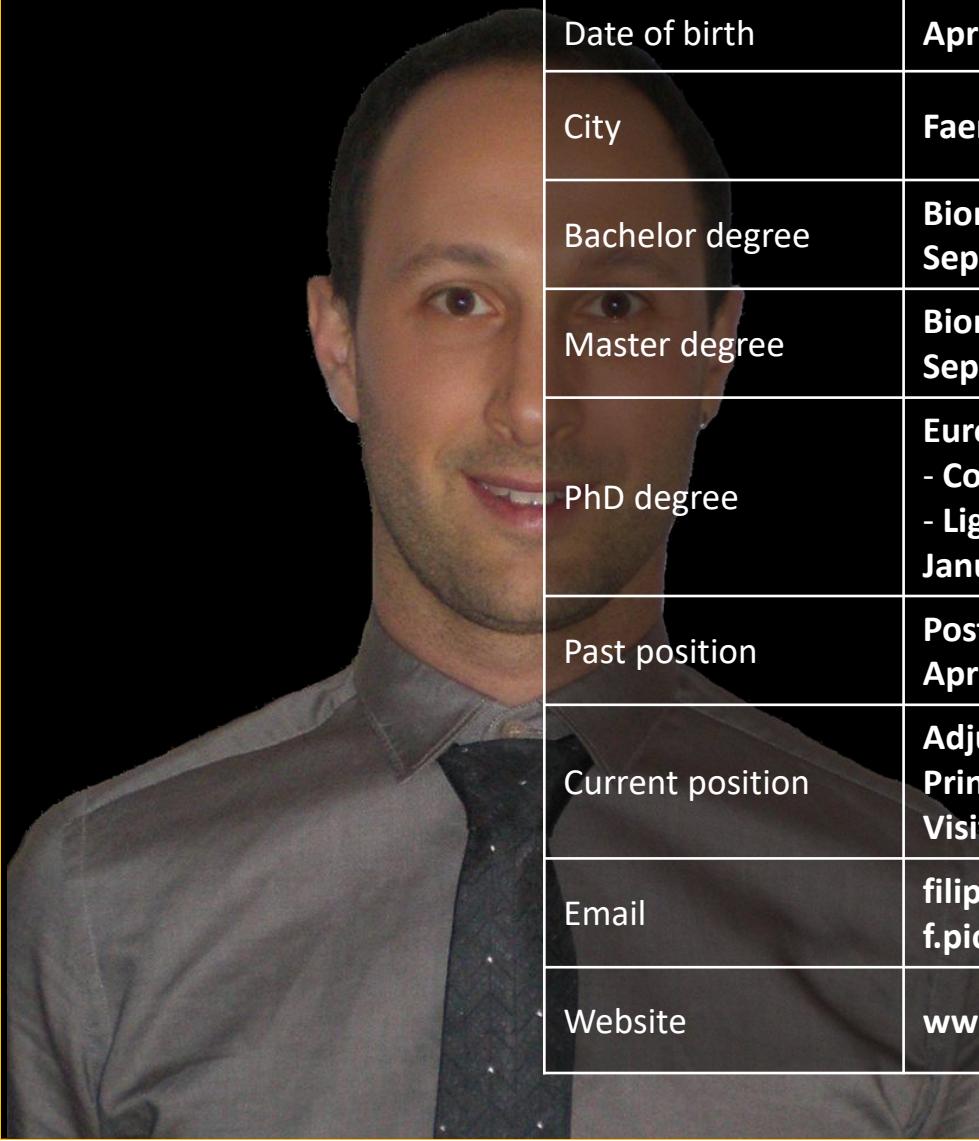
Giochiamo!



UNA RANA AFFAMATA

<http://www.youtube.com/watch?v=WCOqLdDlwE>

Filippo Piccinini



Date of birth	April 20, 1985
City	Faenza (RA), Italy
Bachelor degree	Biomedical Engineer, University of Bologna, September 2004 - July 2007, score: 110/110 cum LAUDE
Master degree	Biomedical Engineer, University of Bologna September 2007 - October 2009, score: 110/110 cum LAUDE
PhD degree	European Doctorate in Information Technology - Computer Vision Group, University of Bologna - Light Microscopy and Screening Center, ETH Zurich January 2010 – April 2013 (3 years)
Past position	Postdoc Research Fellow, University of Bologna April 2013 – February 2017 (4 years)
Current position	Adjunct Professor, University of Bologna, Italy Principal Investigator, IRCCS-IRST, Meldola, Italy Visiting Scientist, BIOMAG, HAS-BRC, Szeged, Hungary
Email	f.piccinini@irst.emr.it f.piccinini@unibo.it
Website	www.filippopiccinini.it

Eng. Filippo Piccinini, PhD

filippo.piccinini@irst.emr.it
f.piccinini@unibo.it



0 0 2 2 0 4 3

[Curriculum Vitae](#)

[Publications](#)

[Awards and Honours](#)

[Collaborations](#)

[Teaching](#)

[Seminars and Theses](#)

[Download Tools](#)

[NEWS \(and movies\)](#)

[Other Websites](#)

[Privacy Policy](#)

Website creation: 09/10/2008;
Last update: 08/06/2020.

LIST OF PUBLICATIONS:

To check the citations to my articles you can see my public profile in Google Scholar. [Go to my profile.](#)

PUBLICATION STATISTICS (last update: May 05, 2020; source: SCOPUS) :

ORCID:	0000-0002-0371-7782
Peer reviewed scientific articles:	48
- Journal publications (with IF):	29
- Journal publications (without IF):	3
- Conference proceedings:	16
Books/Book-chapters:	1
First author publications (in journals with IF):	15
Last author publications (in journals with IF):	3
Corresponding author publications (in journals with IF):	6
Total impact:	167.9680 IF
Average impact:	5.7920 IF
Total number of citations:	711
H-index:	14

JOURNALS (with official IF):

29. V. Turri, O.S. Latinovic, M. Bonafè, N. Toyang, M. Parigi, M. Calassanzio, P.L. Martelli, A. Vagheggi, G. Abbati, A. Sarnelli, R. Casadio, C. Ratti, P. Massi, J.E. Schoelz, M.S. Salvato, F. Piccinini, G. Martinelli. *Cauliflower mosaic virus TAV, a plant virus protein that functions like ribonuclease H1 and is cytotoxic to glioma cells*. **BioMed Research International**, 2020: 7465242, March 2020, DOI: 10.1155/2020/7465242. IF(2018): 2.197/Q3. [Download](#) -OPEN ACCESS-
28. E.A. Tasnadi, T. Toth, M. Kovacs, A. Diosdi, F. Pampaloni, J. Molnar, F. Piccinini, P. Horvath. *3D-Cell-Annotator: an open-source active surface tool for single cell segmentation in 3D microscopy images*. **Bioinformatics**, btaa029, January 2020, DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa029. IF(2018): 4.531/Q1. [Download](#) -OPEN ACCESS-

Periodi all'estero

CIMST Interdisciplinary Summer School on Bio-medical Imaging, ETH Zurich, Switzerland
September 2010 (1 mese)

Light Microscopy and Screening Center, ETH Zurich, Switzerland
May 2011 – August 2011 (4 mesi)

Light Microscopy and Screening Center, ETH Zurich, Switzerland
May 2012 – August 2012 (4 mesi)

EMBO Short-Term Fellowship, Biological Research Centre, Szeged, Hungary
May 2015 – July 2015 (3 mesi)

FEBS Short-Term Fellowship, Biological Research Centre, Szeged, Hungary
April 2016 – July 2016 (4 mesi)

Samsung Medical Center and Bioconvergence Research Center, Seoul, South Korea
August 2016, Prof. Do-Hyun Nam and Prof. Sunghoon Kim (1 mese)

EACR Travel Grant, Biological Research Centre, Szeged, Hungary
May 2017 – July 2017 (3 mesi)

NEUBIAS Short Term Scientific Mission, Biological Research Centre, Szeged, Hungary
May 2018 – July 2018 (3 mesi)

UICC Technical Fellowship, Biological Research Centre, Szeged, Hungary
May 2019 – July 2019 (3 mesi)

IRST IRCCS, Meldola (FC), Italy



Università di Bologna

The screenshot shows a university profile page for Filippo Piccinni. At the top, there is a navigation bar with links: Home, Curriculum vitae, Publications, **Teaching**, Research, Collaborations, Useful contents, and News. The **Teaching** link is underlined, indicating the current section. Below the navigation bar, there is a portrait of Filippo Piccinni, his name, and his title as Adjunct Professor. It also lists his departmental affiliations: Department of Economics, Department of Statistical Sciences "Paolo Fortunati", Department of Computer Science and Engineering, and Teaching tutor at the Department of Management.

Teaching

Course units **Exam sessions**

Course units

Academic Year 2018-2019 go

[76528 - Laboratory of Computer Programming](#)
FLAG Teaching activity in English
Degree programme: Second cycle degree programme (LM) in Quantitative Finance
[Course timetable](#)

[76528 - Laboratory of Computer Programming - 2 cfu](#)
FLAG Teaching activity in English
Degree programme: First cycle degree programme (L) in Economics and Finance
[Course timetable](#)

[00819 - Programming.\(A-L\).\(Module 2\)](#)
FLAG Teaching activity in Italian
Degree programme: First cycle degree programme (L) in Computer Science and Engineering
[Course timetable](#)

Prof. Peter Horvath, BIOMAG, Szeged, Hungary

Synthetic and Systems Biology Unit
Biological Research Centre

Peter Horvath Laboratory

Home

Research

Education

Publications

Lab Members

Contact

Peter Horvath, PhD

Group Leader, Principal Investigator

 horvath.peter@brc.mta.hu
 +36-62/599-696
 +36-70/512 0015
 +36-62-433-506



Jozsef Molnar, PhD

Senior Scientist

 molnar.jozsef@brc.mta.hu
 +36-62/599-696
 +36-62-433-506



Krisztina Buzás, Ph.D.

Senior Scientist



Tivadar Danka

Postdoctoral Researcher

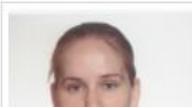
 danka.tivadar@brc.mta.hu
 +36-62/599-695



Mária Kovács

Postdoctoral Researcher

 kovacs.maria@brc.mta.hu



Krisztian Koos

Ph.D. student

 koos.krisztian@brc.mta.hu



Memberships

- Italian Mesenchymal Stem Cell Group (GISM), www.gismonline.it, **Founder Member**
- European Association for Cancer Research (EACR), www.eacr.org, **Ambassador**
- Association of Union for International Cancer Control (UICC), www.uicc.org
- Italian National Bioengineering Group (GNB), www.bioing.it
- Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB), www.biochimica.it
- European Light Microscopy Initiative (ELMI), <http://elmi.embl.org/home/>
- Network of European Bioimage Analysts (NEUBIAS), <http://eubias.org/neubias/>
- Register of Engineers, Chamber of Forlì: Engineer ID 2786, www.ordineing-fc.it



Software tools

- **CellTracker**, for tracking cells cultured in vitro
<http://celltracker.website/>
- **F-Tracker3D**, for tracking fluorescent cells/particles in 3D
<http://sourceforge.net/p/f-tracker3d/>
- **Advanced Cell Classifier**, for classifying cells in high-content screening images
<http://www.cellclassifier.org/>
- **CIDRE**, for correcting the illumination field of microscopy images
<http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n5/full/nmeth.3323.html>
- **MicroMos**, for building a panorama, starting from a set of overlapping images
<http://www.filippopiccinini.it/Mosaicing/index.html>
- **ReViSP**, for cancer spheroids Reconstruction and Visualization using a Single Projection
<http://sourceforge.net/p/revisp/>
- **AnaSP**, software suite to segment brightfield images of multicellular spheroids
<http://sourceforge.net/p/anasp/>
- **ReViMS**, for cancer spheroids Reconstruction and Visualization using Multiple Sections
<http://sourceforge.net/p/revims/>
-

How to share scientific data?

Open Data – Open Research
FIGSHARE
a free website application to:

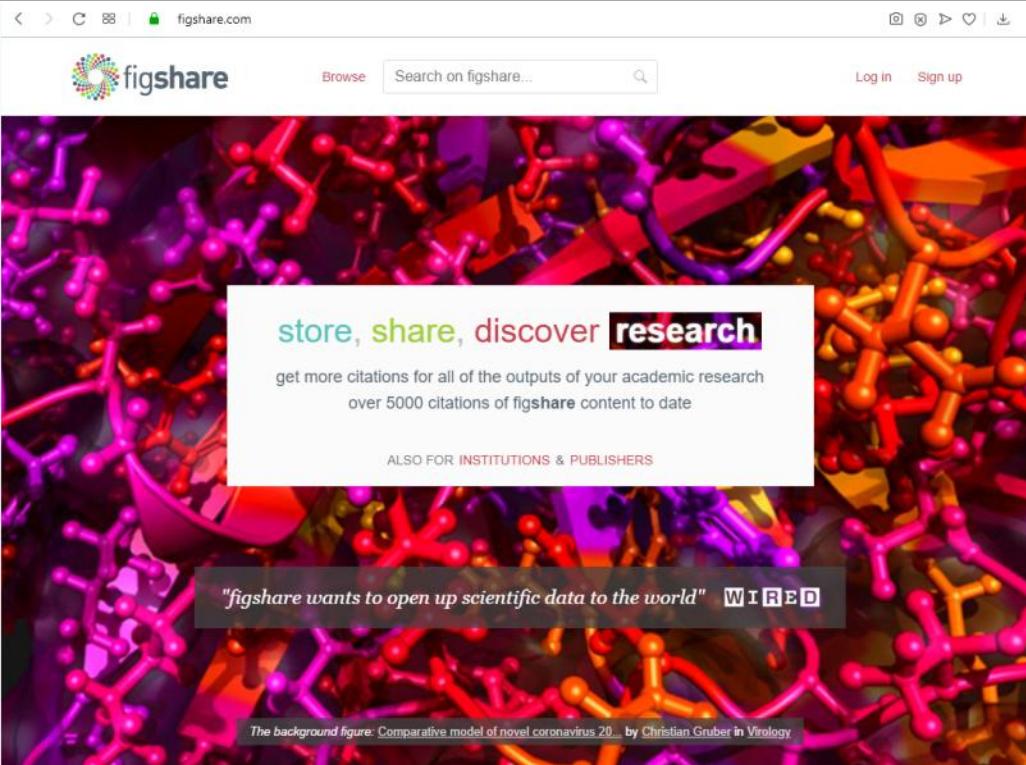
Upload files up to 5GB. We accept any file format and aim to preview all of them in the browser

Manage your research data. Easily access your items, sort them, add tags and other details, privately

Privately share your work. Share large files with colleagues and control access to your private data

Make it publicly available and citable. Get a DOI and gain more citations for the outputs of your academic research

www.figshare.com



The screenshot shows the Figshare homepage with a background image of a molecular structure. At the top, there's a navigation bar with links for 'Browse', 'Search on figshare...', 'Log in', and 'Sign up'. A central call-to-action box contains the text 'store, share, discover research' and 'get more citations for all of the outputs of your academic research over 5000 citations of figshare content to date'. Below this, another box says 'ALSO FOR INSTITUTIONS & PUBLISHERS'. A quote from WIRED is displayed: "'figshare wants to open up scientific data to the world'" WIRED. At the bottom, there's a section titled 'simplifying your research workflow' with a 'Upload' button followed by arrows pointing to 'Manage', 'Share', and 'Publish'. A checkmark icon is present. The footer includes links for 'About', 'Features', 'Tools', 'Blog', 'Ambassadors', 'Contact', 'FAQs', 'Privacy Policy', 'Cookie Policy', 'T&Cs', and 'Sitemap', along with social media icons for Facebook, Twitter, and YouTube.

Outline

- **Introduzione**
- **Approvazione di un farmaco**
- **Colture cellulari 3D**
- **Software per analisi in 3D**
- **3D High-Content Screening**
- **Conclusioni**

Processo per l'approvazione di un farmaco

“Un nuovo farmaco, dispositivo o altro intervento, può richiedere circa 14 anni ed 1 miliardo di dollari o anche più per il suo sviluppo, con un tasso di fallimento superiore al 95%.”

...tempo e soldi

“In media, sono tra 5.000 e 10.000 le sostanze che devono essere sottoposte a screening per scoprire una nuova molecola organica, che possa essere usata per trattare o curare una malattia.”

...grandi numeri, big data

“Il fatto che i candidati farmaci falliscono nei trials clinici a causa di una significativa tossicità illustra che il vecchio paradigma tossicologico sperimentale, nella fattispecie incentrato prevalentemente sull'utilizzo di animali da laboratorio per prevedere la sicurezza del farmaco per gli esseri umani, non è adeguato.”

...animali vs uomo

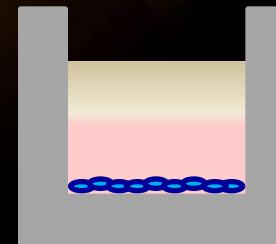
“Piccole differenze nei modelli potrebbero portare a vaste differenze nei risultati.”

...il modello scelto fa la differenza

Processo per l'approvazione di un farmaco

ANALISI PRE-CLINICHE

Studi *in vitro*



Studi *in vivo*



TRIAL CLINICI

Fase 1



Fase 2

Fase 3

Fase 4

Processo per l'approvazione di un farmaco



Agenzia Italiana del Farmaco
AIFA

L'Agenzia Italiana del FArmaco (AIFA) opera in autonomia, trasparenza ed economicità, sotto la direzione e la vigilanza del Ministero della salute e del Ministero dell'economia e delle finanze. AIFA è un ente di diritto pubblico, competente per l'attività regolatoria dei farmaci in Italia.

LA Sperimentazione preclinica

Questa fase della sperimentazione è utile per osservare come si comporta e qual è il livello di tossicità della molecola su un organismo vivente complesso: qual è la via di somministrazione, come viene assorbita e successivamente eliminata. Inizialmente sono eseguiti gli studi "in vitro" al fine di comprendere le caratteristiche della sostanza da cui si ritiene di poter ricavare un farmaco. La sostanza viene messa in provetta insieme a colture cellulari o a microrganismi e sottoposta a una serie di test, eseguiti in laboratori altamente specializzati. Soltanto quando si è appurato in laboratorio che la molecola possiede potenziali effetti terapeutici si può passare alla sperimentazione sugli animali. Gli studi "in vivo" hanno lo scopo di verificare se l'efficacia della sostanza attiva dimostrata in vitro viene confermata in specifici modelli animali di malattie umane. Tali studi hanno anche lo scopo di fornire dati preliminari sul comportamento della molecola sperimentale una volta presente nell'organismo in termini di assorbimento, distribuzione all'interno dei tessuti, metabolismo ed escrezione (farmacocinetica) e di dimostrare l'effettiva sicurezza prima di iniziare la sperimentazione nell'uomo (toxicologia).

FASE 1

Con lo studio di Fase 1 ha inizio la sperimentazione del principio attivo sull'uomo che ha lo scopo di fornire una prima valutazione della sicurezza e tollerabilità del medicinale. Questi studi sono condotti in pochi centri selezionati su un numero limitato di volontari sani per i quali è documentata l'assenza la non predisposizione a malattie. L'obiettivo principale è la valutazione dei potenziali effetti collaterali che possono essere attesi, in base ai risultati delle precedenti sperimentazioni sugli animali e la valutazione della modalità di azione e distribuzione del farmaco nell'organismo. I volontari vengono divisi in più gruppi, ciascuno dei quali riceve una diversa dose di farmaco, per valutare gli eventuali effetti indesiderati della sostanza in relazione alla quantità somministrata. Se l'oggetto della sperimentazione sono gravi patologie, questi studi possono essere condotti direttamente su pazienti che ne sono affetti e per i quali il farmaco è stato pensato. Se il farmaco dimostra di avere un livello di tossicità accettabile rispetto al beneficio previsto (il cosiddetto profilo beneficio/rischio), può passare alle successive fasi della sperimentazione.

Processo per l'approvazione di un farmaco

FASE 2

Nello studio di Fase 2 inizia a essere indagata l'attività terapeutica del potenziale farmaco, cioè la sua capacità di produrre sull'organismo umano gli effetti curativi desiderati. Questa fase serve inoltre a comprendere quale sarà la dose migliore da sperimentare nelle fasi successive, e determinare l'effetto del farmaco in relazione ad alcuni parametri (come, ad esempio, la pressione sanguigna) considerati indicatori della salute del paziente. Negli studi di Fase 2 la sostanza è somministrata a soggetti volontari affetti dalla patologia per cui il farmaco è stato pensato. I soggetti "arruolati" per lo studio vengono generalmente divisi in più gruppi, a ciascuno dei quali è somministrata una dose differente del farmaco e, quando eticamente possibile, un placebo (una sostanza priva di efficacia terapeutica). Per evitare che la somministrazione del placebo influenzi le aspettative dei partecipanti, le valutazioni dei parametri di attività e sicurezza sono condotte senza che paziente (studio in cieco singolo), o medico e paziente (studio in doppio cieco), conoscano il tipo di trattamento ricevuto o somministrato. Questa fase dura circa un paio d'anni ed è utile a dimostrare la non tossicità e l'attività del nuovo principio attivo sperimentale.

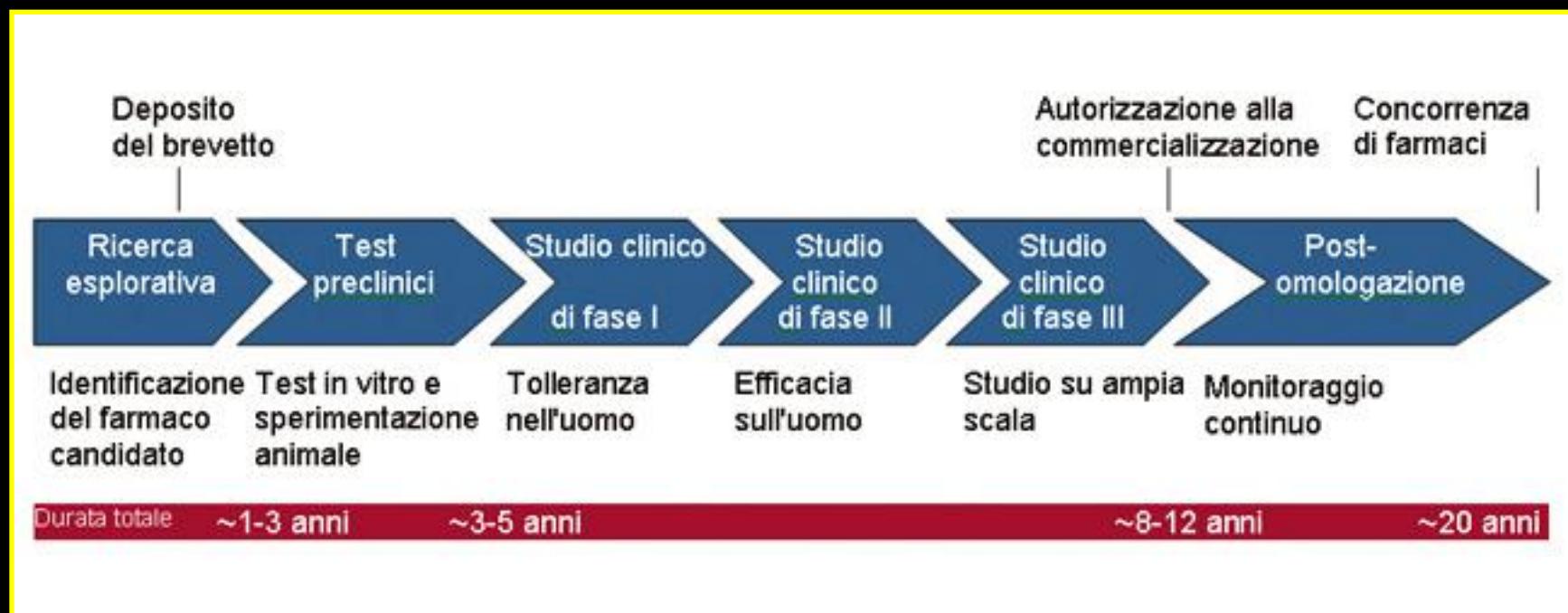
FASE 3

Lo studio di Fase 3 serve a determinare quanto è efficace il farmaco, se ha qualche beneficio in più rispetto a farmaci simili già in commercio e qual è il rapporto tra rischio e beneficio. In questo caso i pazienti "arruolati" sono centinaia o migliaia. L'efficacia del farmaco sui sintomi, sulla qualità della vita o sulla sopravvivenza è confrontata con un placebo, con altri farmaci già in uso o con nessun trattamento. La tipologia di studio di riferimento in questa fase è lo studio clinico controllato randomizzato. Si tratta di un tipo di studio in cui ai pazienti viene assegnato casualmente (random) il nuovo principio attivo o un farmaco di controllo (in genere il trattamento standard usato per la patologia oggetto della ricerca) ed è molto affidabile nel definire l'efficacia di un medicinale. Infatti, l'attribuzione casuale del nuovo farmaco o del farmaco di controllo garantisce che i due gruppi siano simili per tutte le caratteristiche salvo che per il medicinale assunto. Dunque, alla fine della sperimentazione, sarà possibile attribuire ogni differenza nella salute dei partecipanti esclusivamente al trattamento e non a errori o al caso. Durante questa fase vengono controllate con molta attenzione l'insorgenza, la frequenza e gravità degli effetti indesiderati. La durata della somministrazione del farmaco è variabile a seconda degli obiettivi che la sperimentazione si pone, ma in genere dura mesi. Il periodo di monitoraggio degli effetti del farmaco è invece spesso più lungo, arrivando in qualche caso a 3-5 anni.

Processo per l'approvazione di un farmaco

FASE 4

È la fase della sperimentazione clinica che include gli studi condotti dopo l'approvazione del farmaco nell'ambito delle indicazioni approvate e in piena osservanza di quanto contenuto nel Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto (RCP); è detta della "sorveglianza post marketing" perché viene attuata dopo l'immissione in commercio. In questa fase, che può durare qualche anno, si acquisiscono ulteriori e nuove informazioni e vengono valutate le reazioni avverse più rare, quelle che negli studi clinici non potevano emergere, ma che con l'uso di massa del nuovo farmaco possono diventare rilevabili.



Outline

- **Introduzione**
- **Approvazione di un farmaco**
- **Colture cellulari 3D**
- **Software per analisi in 3D**
- **3D High-Content Screening**
- **Conclusioni**

SFEROIDE

**Aggregato multicellulare 3D costruito
in vitro e utilizzato come modello per
testare farmaci e trattamenti di
radioterapia**

Nel 1970 il Prof. Sutherland propose aggregati multicellulari di forma "sferica", chiamati sferoidi, come modello di tumore 3D, affidabile e creato in vitro. Questi aggregati multicellulari assomigliano morfologicamente ai noduli osservati nei carcinomi animali e umani, e questa è la ragione dietro il nome sferoide.

Nomenclatura per colture cellulari 3D

AGGREGATI
MULTICELLULARI

[...] possono essere considerate le colture cellulari 3D più semplici, poiché sono caratterizzate da un'aggregazione cellula-cellula 3D priva di un obbligo strutturale definito

CO-COLTURA

[...] Se l'aggregato multicellulare è composto da più di un tipo di cellula ma che assieme non svolgono comunque una funzione specifica, può essere meglio identificato come aggregato di co-coltura

SFEROIDI

[...] Il termine sferoide, comunemente usato, dovrebbe essere riferito a quegli aggregati multicellulari di forma sferica

MICROTESSUTI

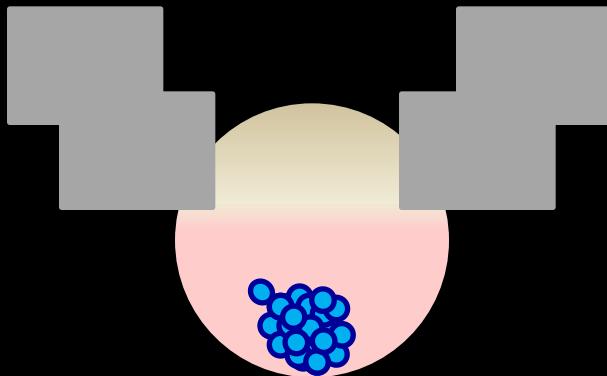
[...] Quando gli sferoidi comprendono più di un tipo di cellule che insieme svolgono una funzione specifica, è più appropriato riferirsi ad essi come microtessuti

ORGANOIDI

[...] Infine, gli aggregati multicellulari con cellule differenti organizzate in mini-organi sono chiamati organoidi

Colture cellulari: 3D VS 2D

3D CELL CULTURE



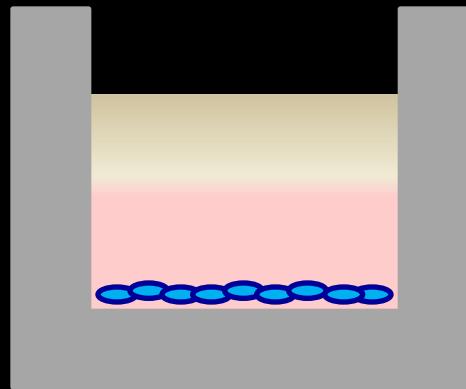
Contatto fisiologico cellula-cellula

Le cellule interagiscono con la matrice attorno

Gradienti di farmaci, gas, nutrienti e scarti

L'unione di più cellule diverse consente di mimare alcune funzioni degli organi

2D CELL CULTURE



Contatto cellula-cellula solo sui bordi della cellula, e cellule principalmente a contatto con la plastica

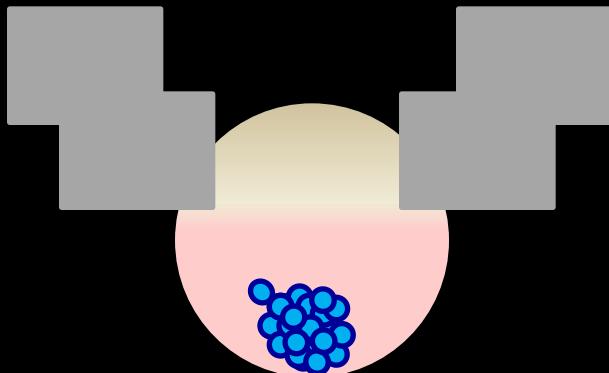
Le cellule sono in contatto con la matrice extracellulare principalmente su una sola superficie

Non ci sono gradienti

Co-colture incapaci di stabilire un vero microambiente

Colture cellulari: 3D VS 2D

3D CELL CULTURE



**PIU' SIMILI AI TUMORI
IN VIVO**

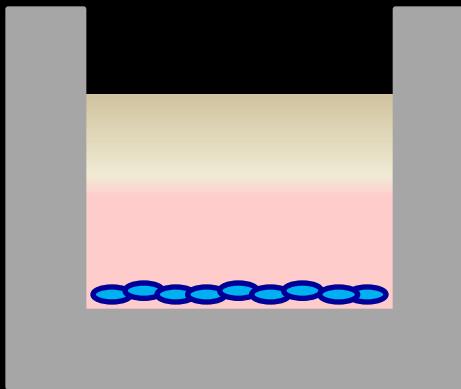
Contatto fisiologico cellula-cellula

Le cellule interagiscono con la matrice attorno

Gradienti di farmaci, gas, nutrienti e scarti

L'unione di più cellule diverse consente di mimare alcune funzioni degli organi

2D CELL CULTURE



Contatto cellula-cellula solo sui bordi della cellula, e cellule principalmente a contatto con la plastica

Le cellule sono in contatto con la matrice extracellulare principalmente su una sola superficie

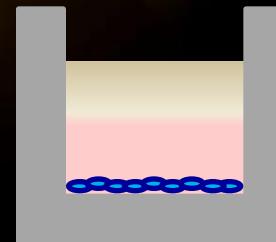
Non ci sono gradienti

Co-colture incapaci di stabilire un vero microambiente

Processo per l'approvazione di un farmaco

ANALISI PRE-CLINICHE

Studi 2D *in vitro*



Studi *in vivo*



Fase 1



Fase 2

TRIAL CLINICI

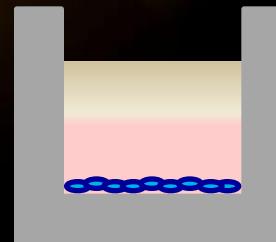
Fase 3

Fase 4

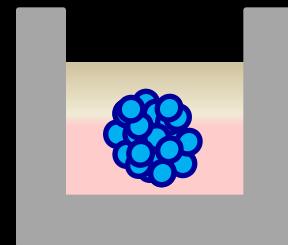
Processo per l'approvazione di un farmaco

ANALISI PRE-CLINICHE

Studi 2D *in vitro*



Studi 3D *in vitro*



Studi *in vivo*



TRIAL CLINICI

Fase 1



Fase 2



Fase 3



Fase 4

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained

Received: 18 August 2015

Accepted: 20 November 2015

Published: 11 January 2016

Michele Zanoni¹, Filippo Piccinini², Chiara Arienti¹, Alice Zamagni¹, Spartaco Santi^{4,5},
Rolando Polico⁶, Alessandro Bevilacqua^{2,3} & Anna Tesei¹

The potential of a spheroid tumor model composed of cells in different proliferative and metabolic states for the development of new anticancer strategies has been amply demonstrated. However, there

Sistemi per ottenere aggregati multicellulari

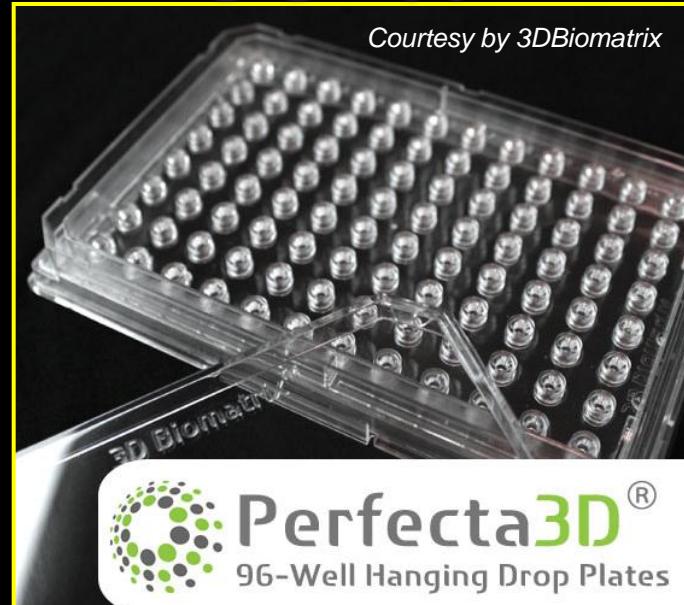
Antigravity bioreactor

Courtesy by Synthecon Inc.

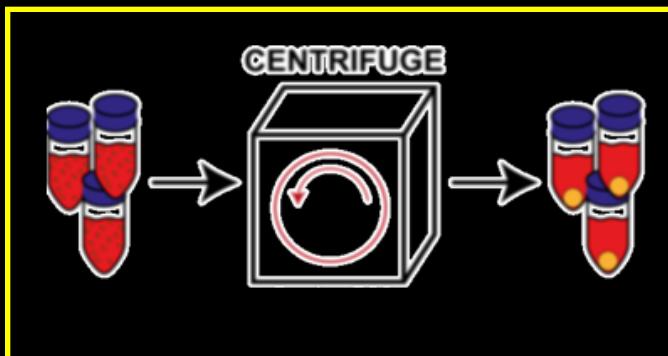


Hanging drop plates

Courtesy by 3DBiomatrix



Pellet culture method



Magnetic levitator

Courtesy by Hamilton

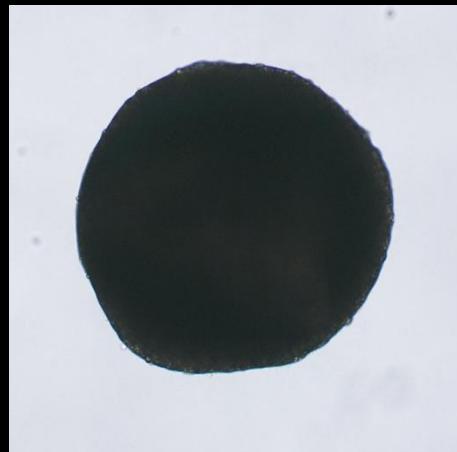


OPEN PROBLEM

Un modello utilizzato per testare farmaci e trattamenti di radioterapia, deve essere omogeneo tra i suoi replicati e stabile nel tempo. Altrimenti, i dati ottenuti non sono affidabili e dipendono dallo stato originale delle celle.

COME GENERARE SFEROIDI OMOGENEI E STABILI?

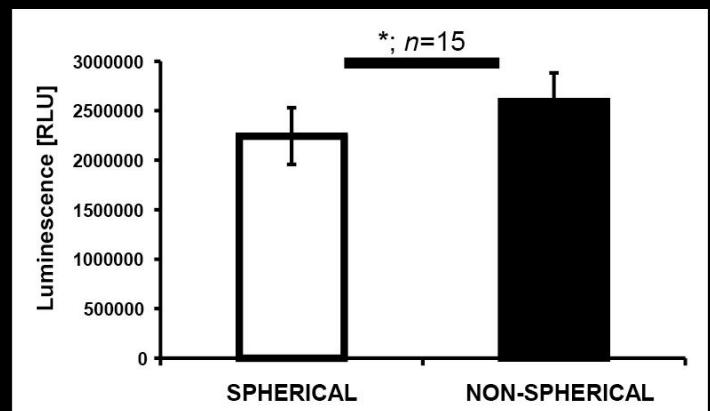
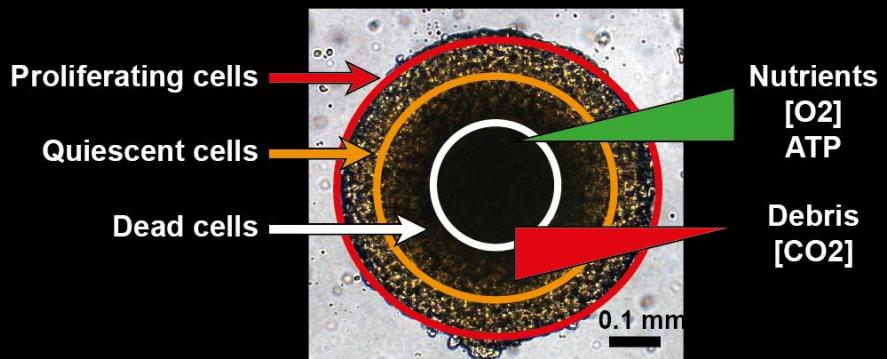
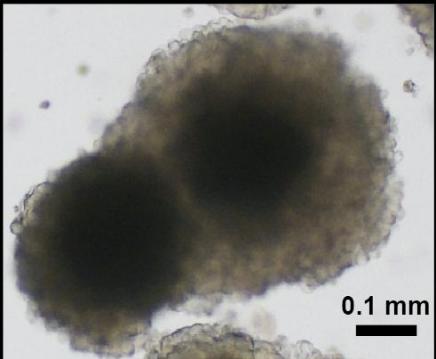
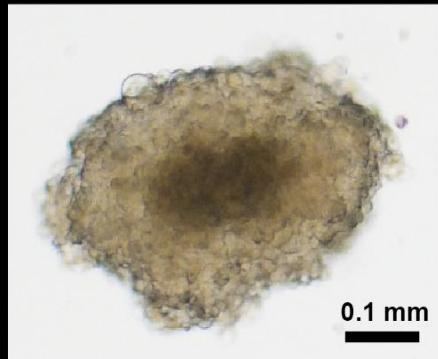
DAY07, spherical shape



DAY07, irregular shape

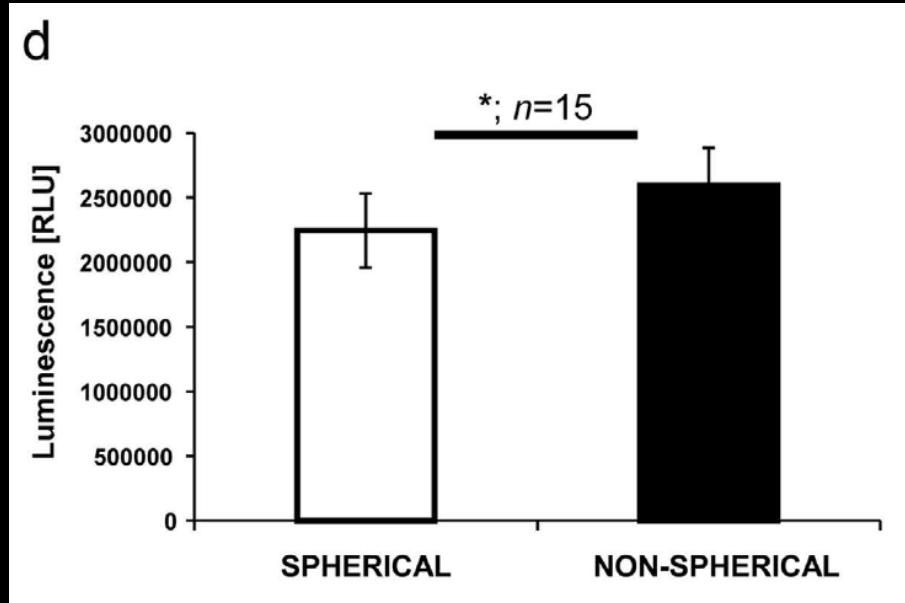


Spherical VS non-spherical

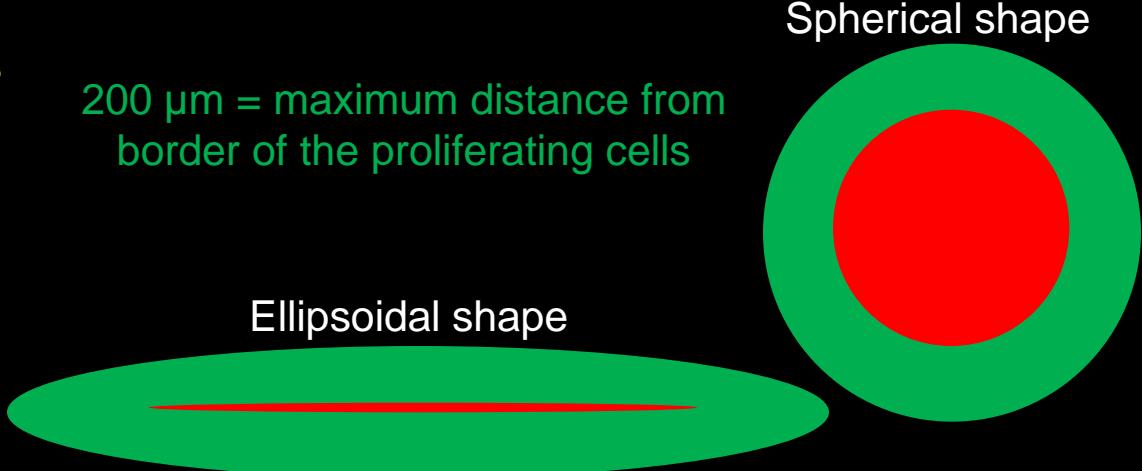


Correlation between viability and shape

We hypothesized that the 3D shape reflects a different general viability of the spheroids. To better investigate this correlation, we selected 30 spheroids of similar volumes ($0.112 \pm 0.013 \text{ mm}^3$) but belonging to the spherical ($n = 15$; sphericity ≥ 0.90) or non-spherical subtypes ($n = 15$; sphericity < 0.90) to analyze how different shapes influence the metabolic state of spheroids. The data obtained from the luminescence metabolic assay performed after one week of culture showed a significantly reduced viability of spherical spheroids with respect to the irregular-shaped group ($P = 0.045$). This was probably due to a reduced distance between each cell and the culture medium interface in the non-spherical subset, leading to a wider zone of active cell proliferation.



200 μm = maximum distance from border of the proliferating cells



Long term morphological characterization of mesenchymal stromal cells 3D spheroids built with a rapid method based on entry-level equipment

Chiara Bellotti · Serena Duchi ·
Alessandro Bevilacqua · Enrico Lucarelli ·
Filippo Piccinini

Received: 29 July 2015 / Accepted: 22 March 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

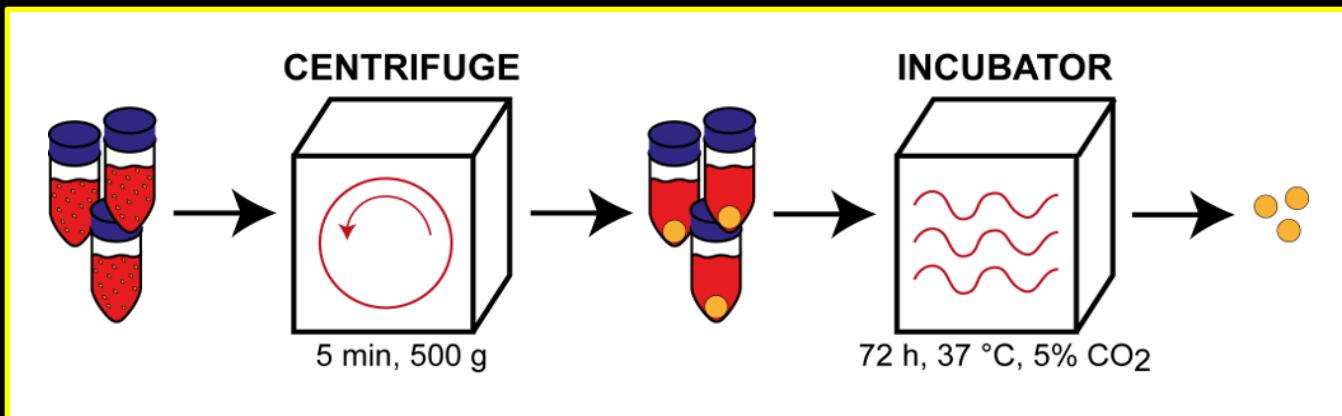
Abstract Three-dimensional (3D) spheroids of mesenchymal stromal cells (MSC) have been demonstrated to improve a wide range of MSC features, such

bioreactors or low-attachment plates, and each approach has its own disadvantages. Furthermore, an over-time analysis of morphological homogeneity and

Pellet culture method

Cost-effective and extremely **rapid** method to generate MSC spheroids proposed by Johnstone *et al.* (*In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 1998).

It only requires a benchtop **centrifuge** and sterile polypropylene conical **tubes**



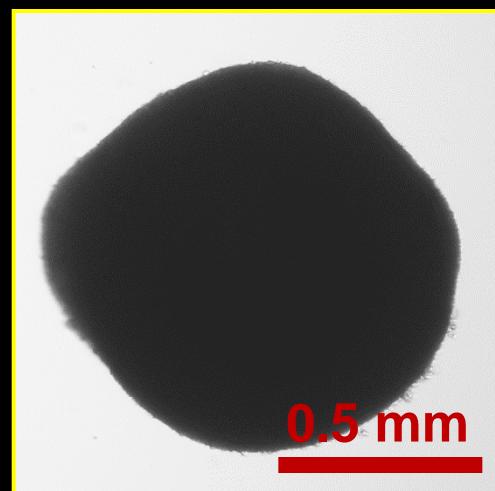
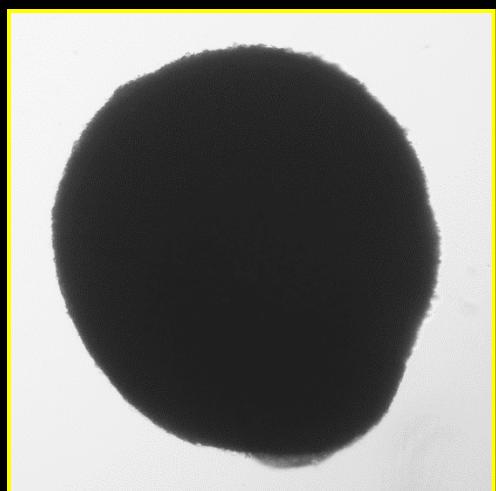
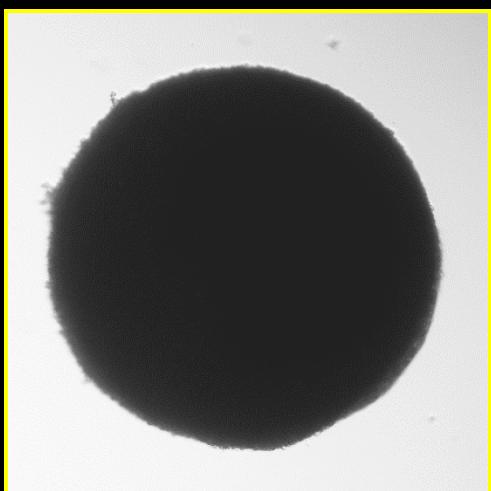
- ✓ Cost of the system
- ✓ Production efficiency
- ✓ Spheroid homogeneity
- ✓ Tunable spheroid size

The **efficiency** of the generation is particularly high (one spheroid per tube) and the **size** of the spheroids can be tuned by controlling the number of cells seeded in the tubes.

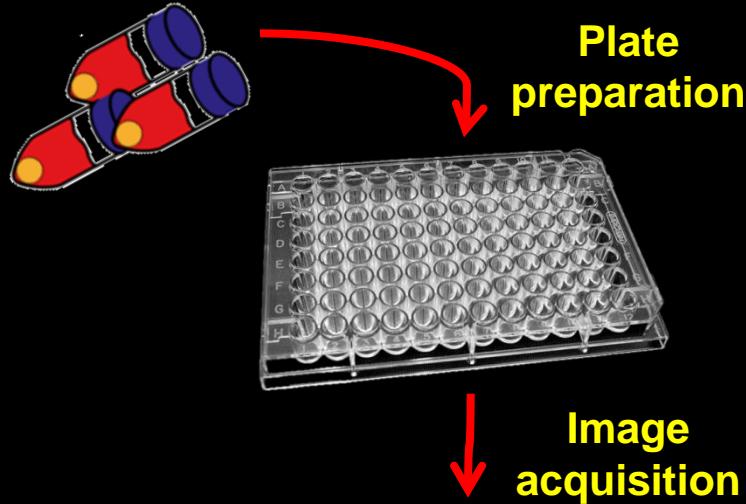
Pellet culture method

SPHEROIDS PRODUCTION

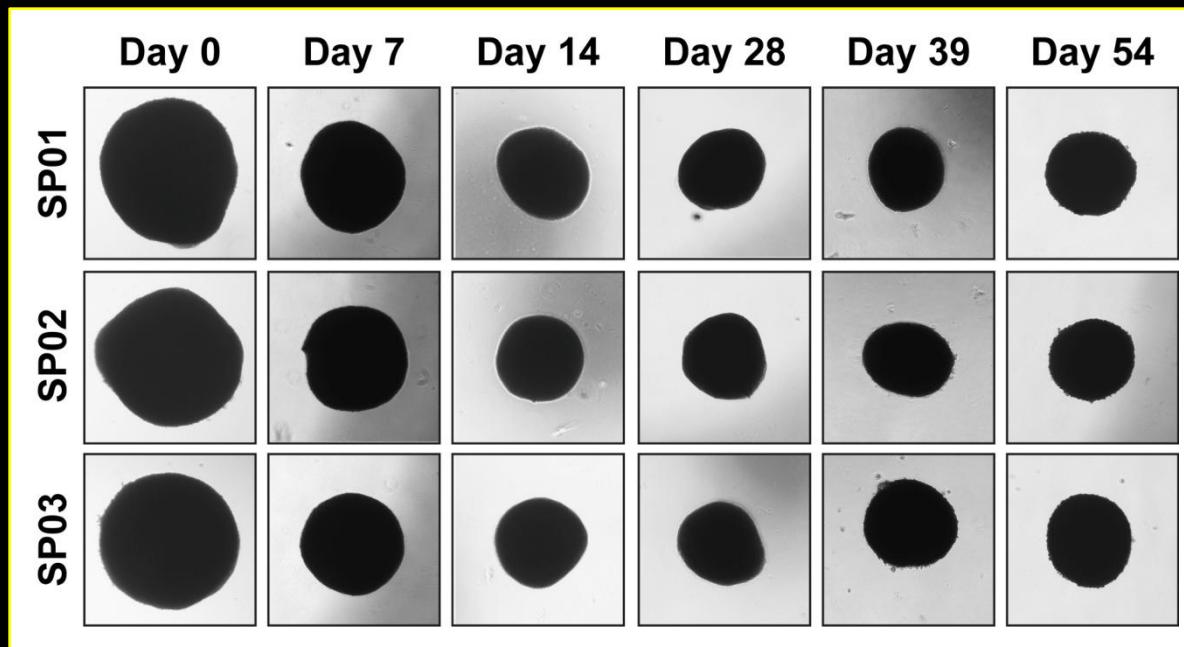
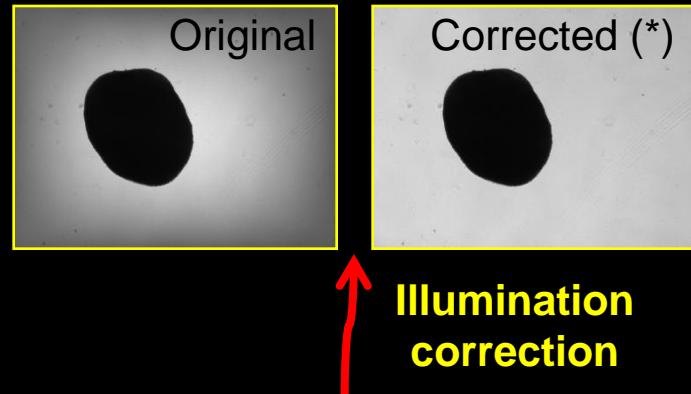
- 2.5×10^5 cells suspended in 0.5 ml DMEM-HG supplemented with 10% FBS and placed in a 1.5 mL polypropylene conical tube with a screw cap.
- Aliquots were spun in a benchtop centrifuge at 500 g for 5 min.
- Tubes incubated in humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO₂, with loosened caps to ensure adequate gas exchange.
- After 72 h the pellets become compact spherical aggregates.



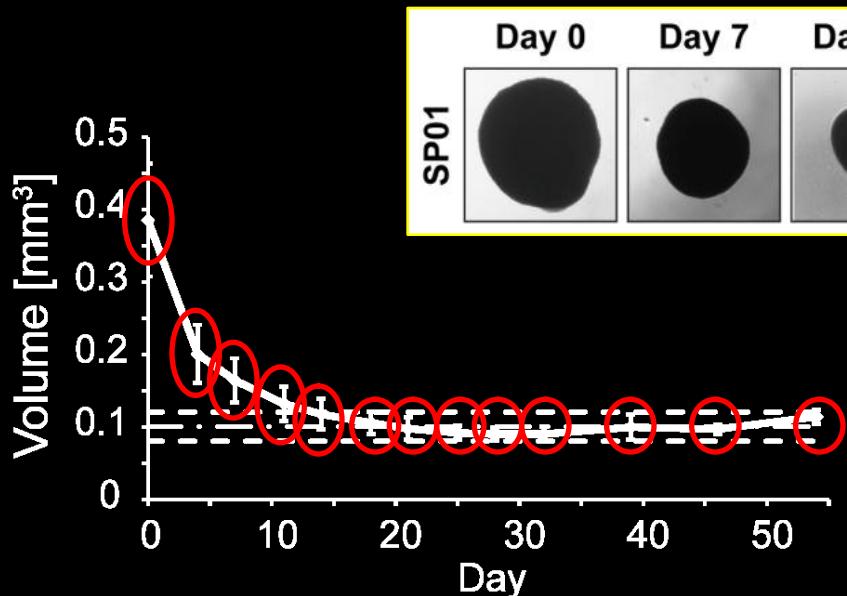
Volume, Sphericity, and Jagging Degree



(using CIDRE, K. Smith, Y. Li, F. Piccinini, G. Csucs, C. Balazs, A. Bevilacqua, P. Horvath, CIDRE: an illumination-correction method for optical microscopy. Nature Methods, 12(5):404-406, May 2015)

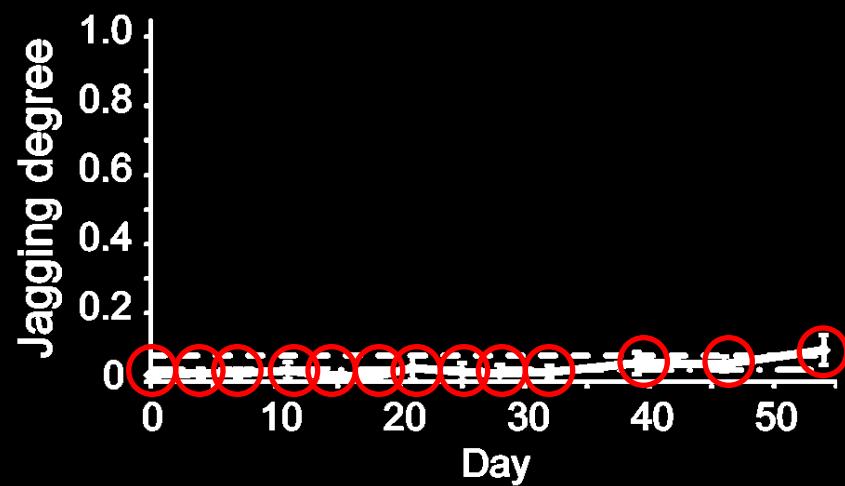
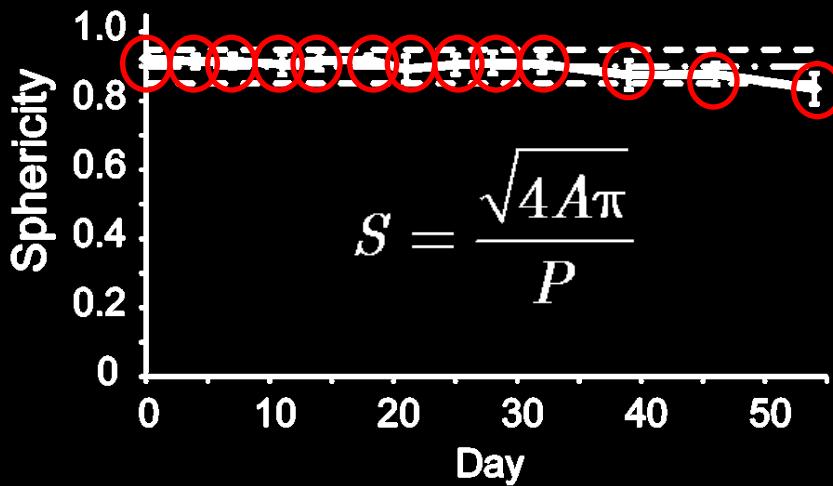


Volume, Sphericity, and Jagging Degree



25 MSC SPHEROIDS ANALYSED
FOR A TWO-MONTH PERIOD

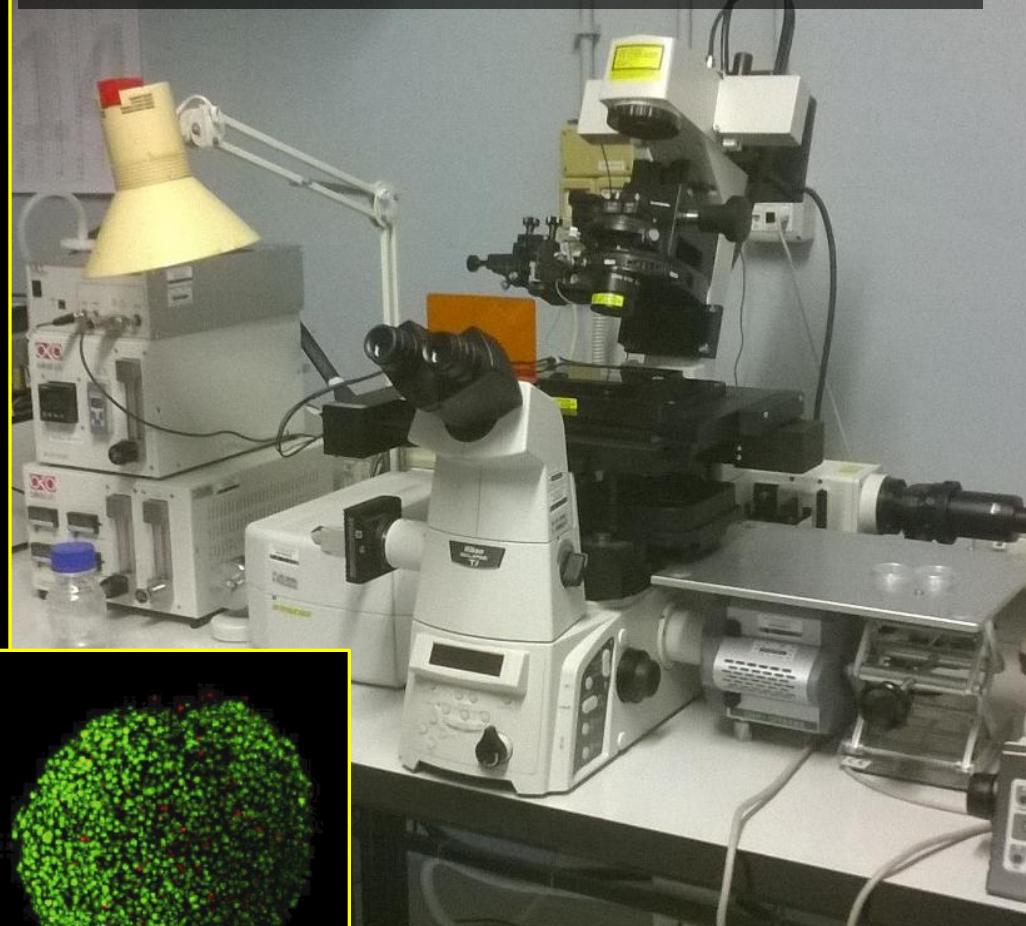
The intervals within the bounds represent $\mu \pm 2\sigma$



Analisi della architettura esterna ed interna

CONFOCAL ANALYSIS

Nikon Eclipse Ti microscope equipped with an A1R confocal laser



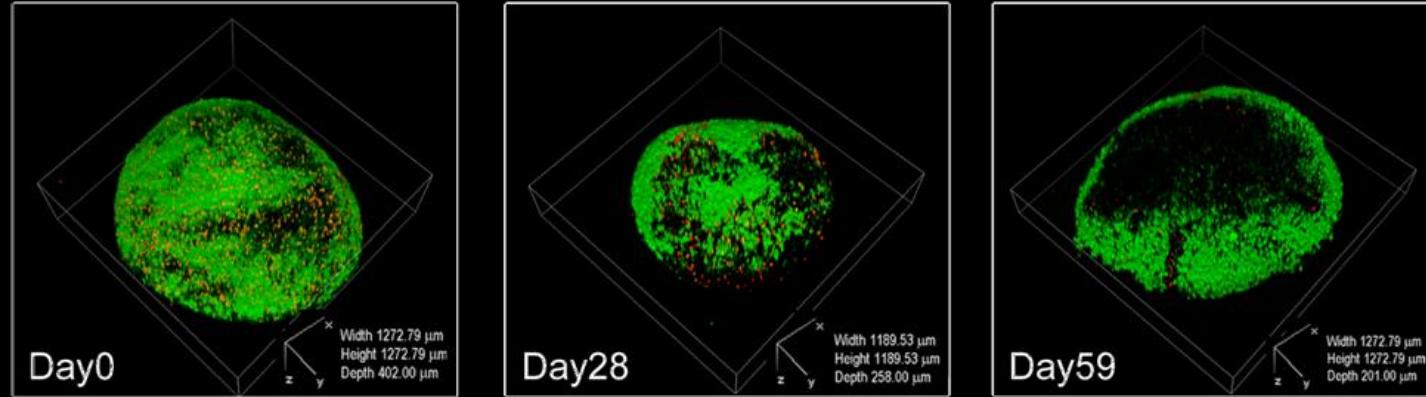
HISTOLOGICAL ANALYSIS

Cryostat Leica CM 1900

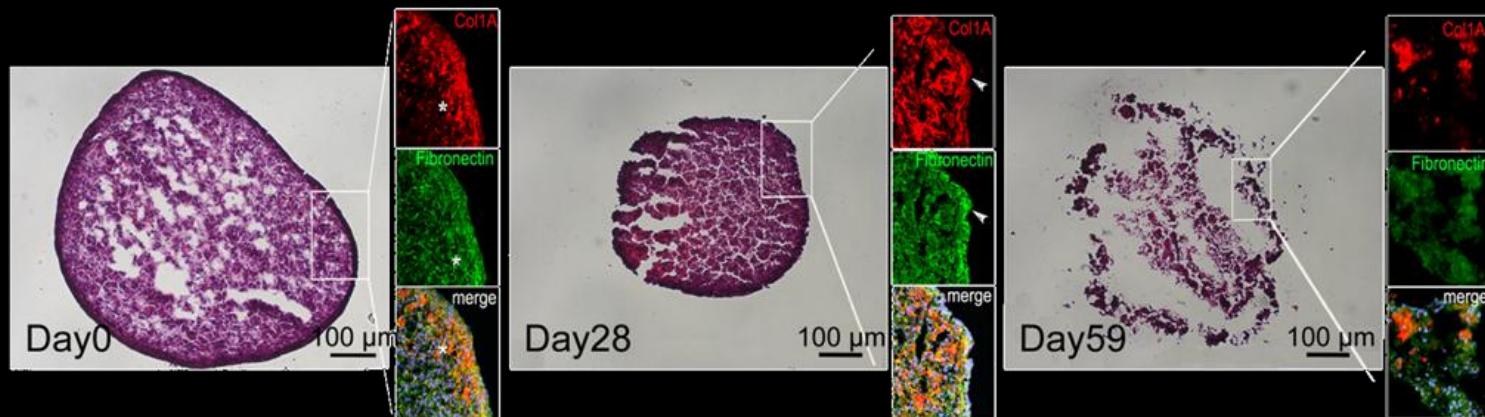


Analisi della architettura esterna ed interna

CONFOCAL ANALYSIS (Live&Dead assay)



HISTOLOGICAL ANALYSIS (H&E staining)

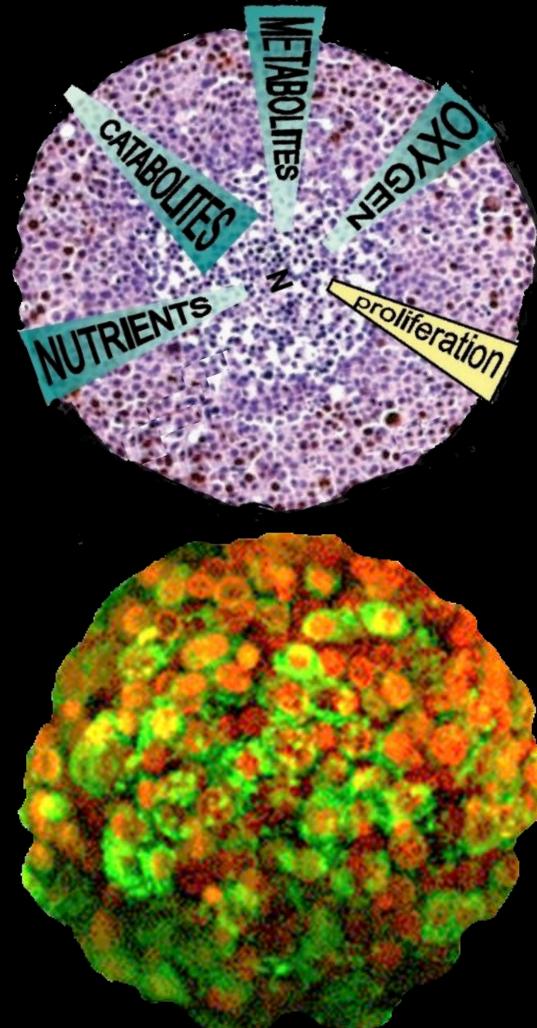


Analisi della architettura interna

LIGHT SHEET MICROSCOPE



PERFECTA3D and PROMEGA assays



Outline

- **Introduzione**
- **Approvazione di un farmaco**
- **Colture cellulari 3D**
- **Software per analisi in 3D**
- **3D High-Content Screening**
- **Conclusioni**

Software tools

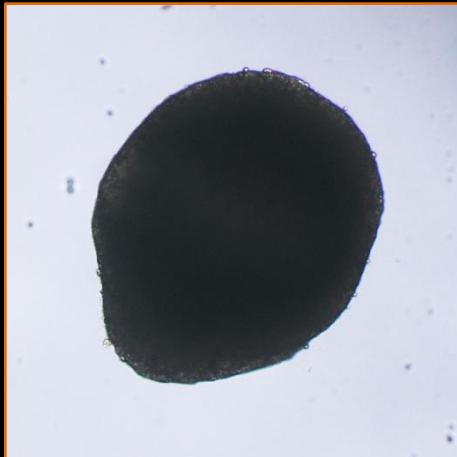
- **CellTracker**, for tracking cells cultured in vitro
<http://celltracker.website/>
- **F-Tracker3D**, for tracking fluorescent cells/particles in 3D
<http://sourceforge.net/p/f-tracker3d/>
- **Advanced Cell Classifier**, for classifying cells in high-content screening images
<http://www.cellclassifier.org/>
- **CIDRE**, for correcting the illumination field of microscopy images
<http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n5/full/nmeth.3323.html>
- **MicroMos**, for building a panorama, starting from a set of overlapping images
<http://www.filippopiccinini.it/Mosaicing/index.html>
- **ReViSP**, for cancer spheroids Reconstruction and Visualization using a Single Projection
<http://sourceforge.net/p/revisp/>
- **AnaSP**, software suite to segment brightfield images of multicellular spheroids
<http://sourceforge.net/p/anasp/>
- **ReViMS**, for cancer spheroids Reconstruction and Visualization using Multiple Sections
<http://sourceforge.net/p/revims/>
-

ReViSP: per stimare il volume da una proiezione

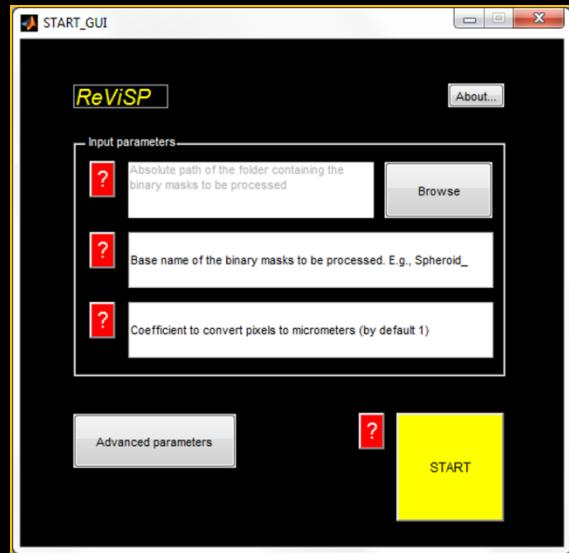


Reconstruction and Visualization
from a Single Projection (*ReViSP*)

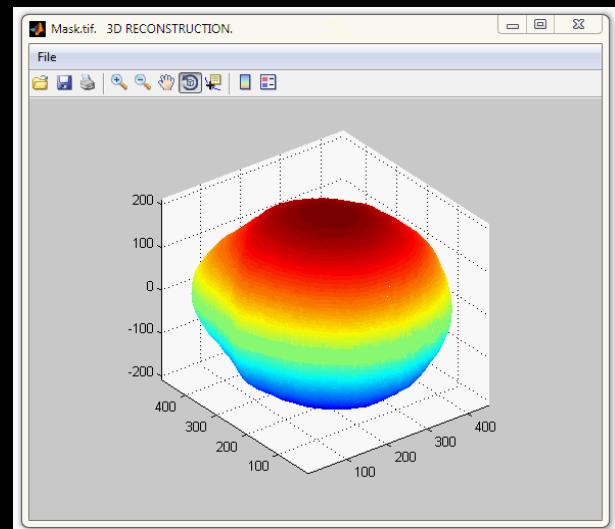
Widefield microscope



GUI of ReViSP



3D mesh of the spheroid



ReViSP non richiede alcuna informazione tranne la maschera binaria dello sferoide da ricostruire

COMPUTER METHODS AND PROGRAMS IN BIOMEDICINE 118 (2015) 95–106

 ELSEVIER

journal homepage: www.intl.elsevierhealth.com/journals/cmpb



Cancer multicellular spheroids: Volume assessment from a single 2D projection

 CrossMark

Filippo Piccinini^a, Anna Tesei^b, Chiara Arienti^b, Alessandro Bevilacqua^{a,c,*}

^a Advanced Research Center on Electronic Systems (ARCES) for Information and Communication Technologies “E. De Castro”, University of Bologna, Italy

^b Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) s.r.l., IRCCS, Biosciences Laboratory, Meldola, FC, Italy

^c Department of Computer Science and Engineering (DISI), University of Bologna, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2014

Received in revised form

3 December 2014

Accepted 15 December 2014

Keywords:

Pre-clinical oncology

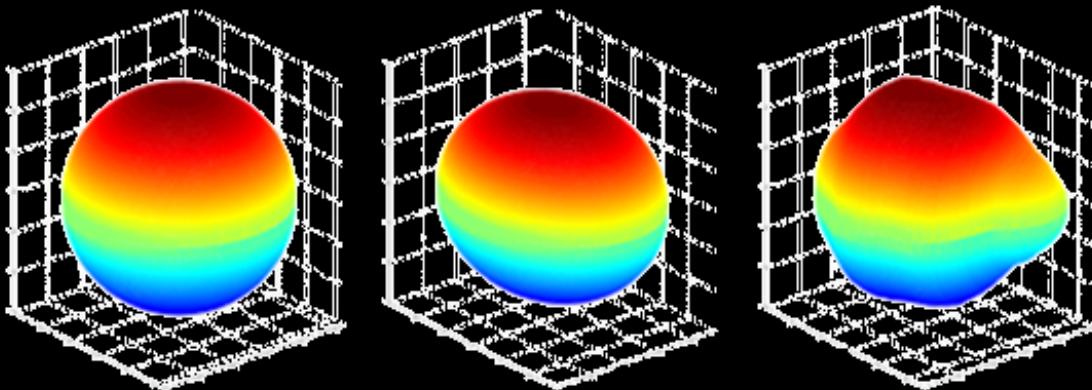
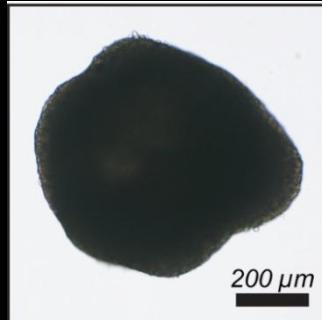
ABSTRACT

Volume is one of the most important features for the characterization of a tumour on a macroscopic scale. It is often used to assess the effectiveness of care treatments, thus making its correct evaluation a crucial issue for patient care. Similarly, volume is a key feature on a microscopic scale. Multicellular cancer spheroids are 3D tumour models widely employed in pre-clinical studies to test the effects of drugs and radiotherapy treatments. Very few methods have been proposed to estimate the tumour volume arising from a 2D projection of multicellular spheroids, and even fewer have been designed to provide a 3D reconstruction of the tumour shape. In this work, we propose Reconstruction and Visualization from a Single Projection (RVS) – a two-step method designed to reconstruct the 3D surface and

State-of-the-art per la stima del volume

MODEL ASSUMPTIONS

- Local spherical symmetry
- Force of gravity



FORMULAS TYPICALLY USED

$$V_{sphere} = \frac{\pi}{6} D^3$$

SPHERE method

$$V_{ellipsoid} = \frac{\pi}{6} D_m D_p^2$$

ELLIPSOID method

Metodi da altri campi applicativi

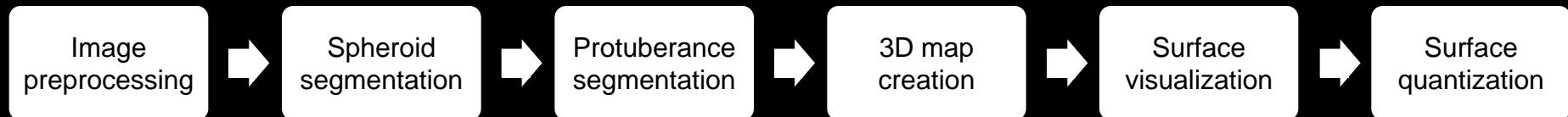
SIERACKI method

M.E. Sieracki, C.L. Viles, K.L. Webb, “Algorithm to estimate cell biovolume using image analyzed microscopy”, **Cytometry Part A** 10(5):551-557, **1989**

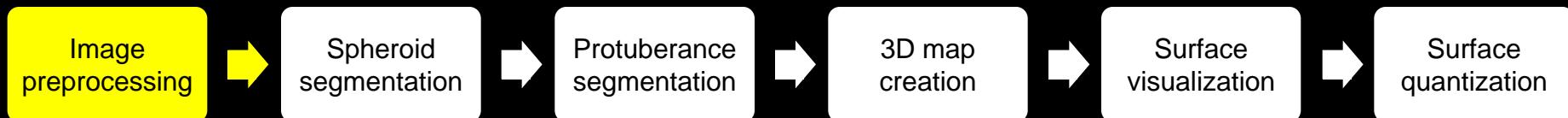
ZEDER method

M. Zeder, E. Kohler, L. Zeder, J. Pernthaler, “A novel algorithm for the determination of bacterial cell volumes that is unbiased by cell morphology”, **Microscopy and Microanalysis** 17(5):799-809, **2011**

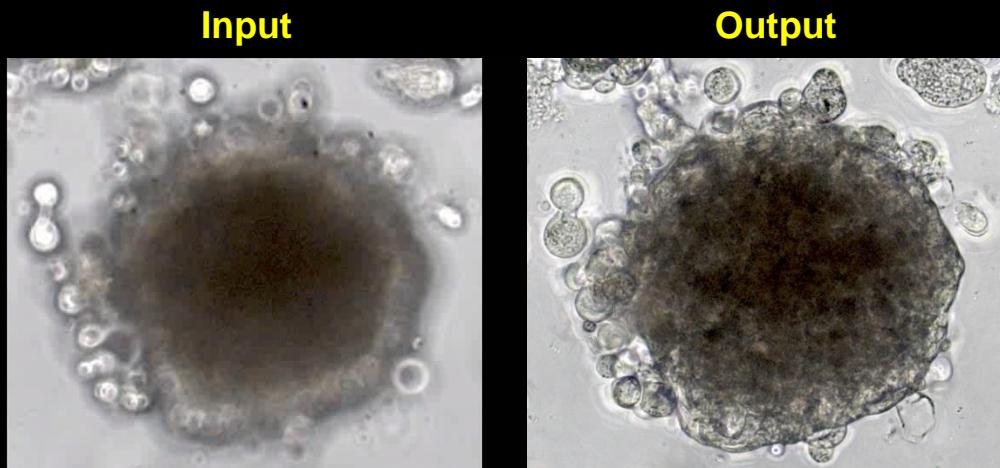
3D RECONSTRUCTION METHOD



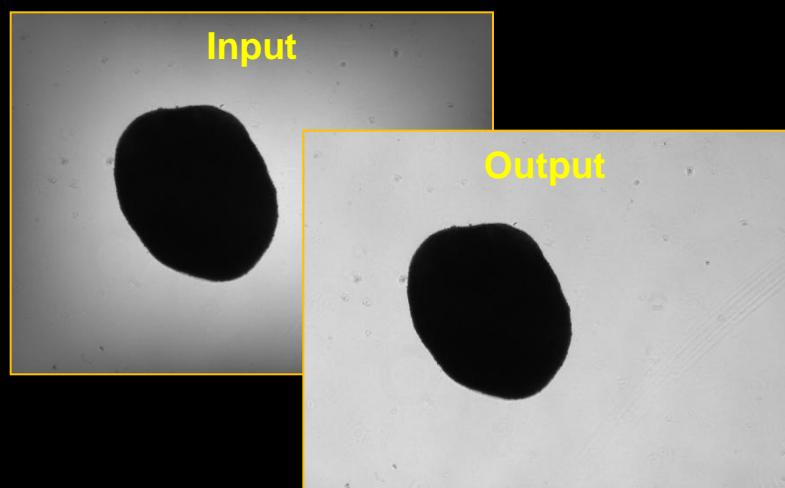
3D RECONSTRUCTION METHOD



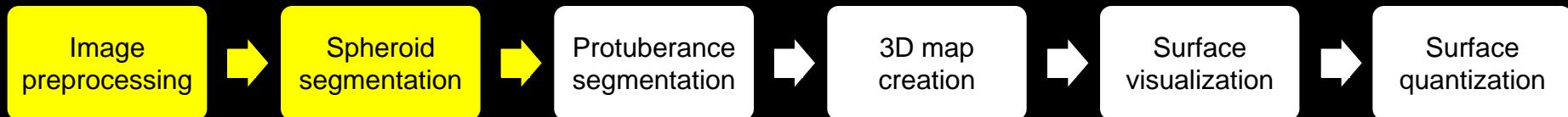
DEPTH-OF-FOCUS RECONSTRUCTION



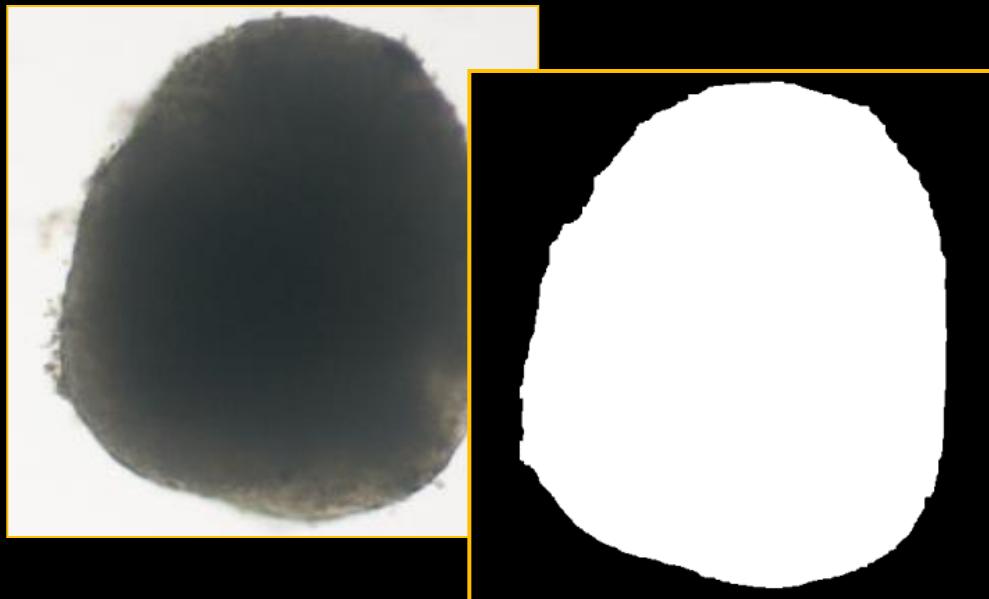
VIGNETTING CORRECTION



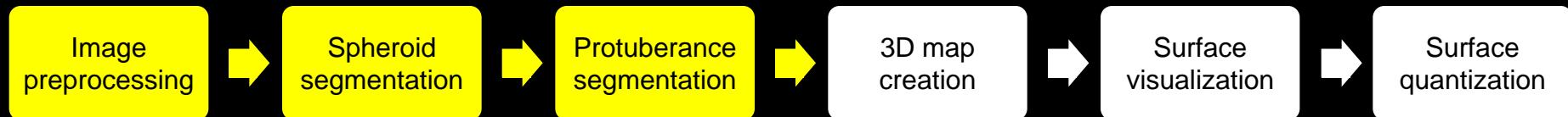
3D RECONSTRUCTION METHOD



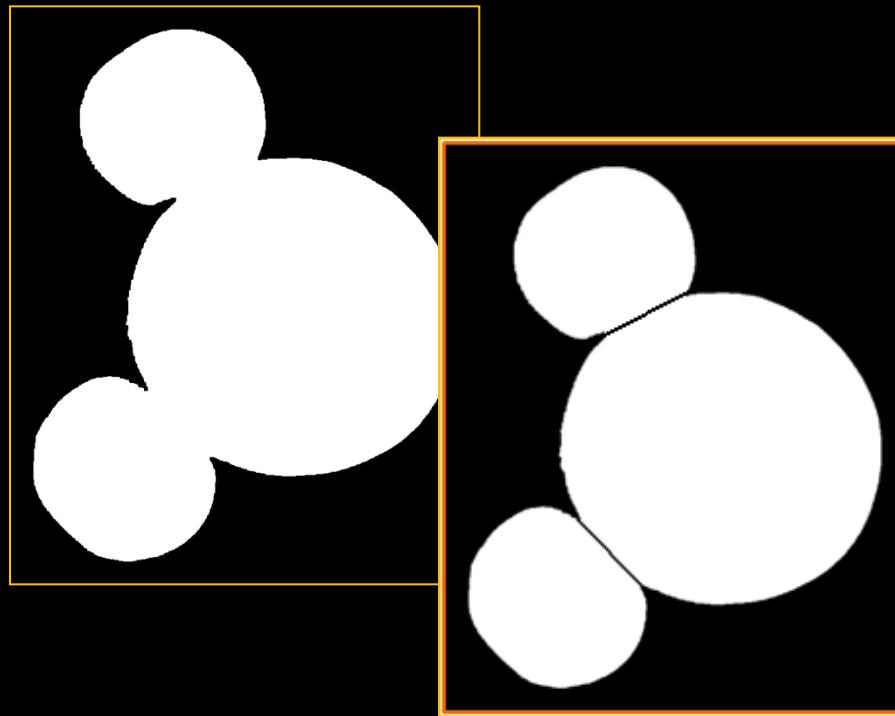
SPHEROID SEGMENTATION



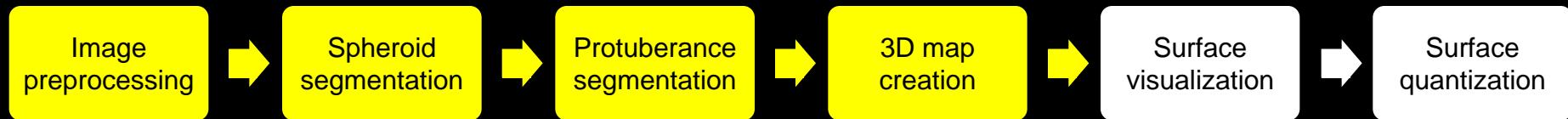
3D RECONSTRUCTION METHOD



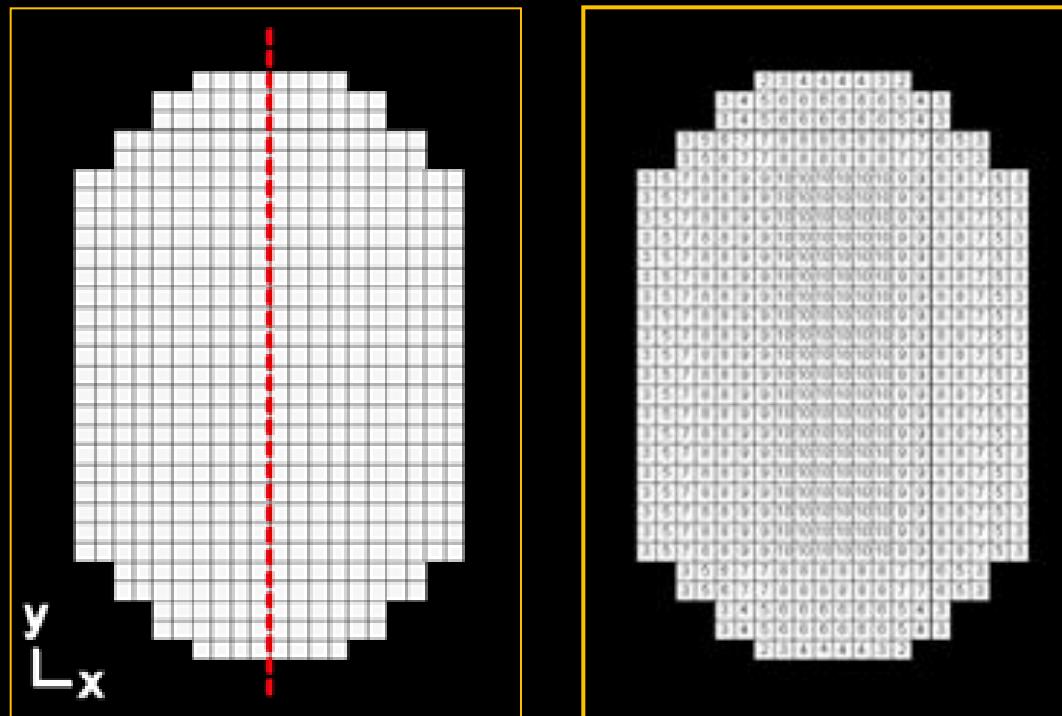
PROTUBERANCE SEGMENTATION



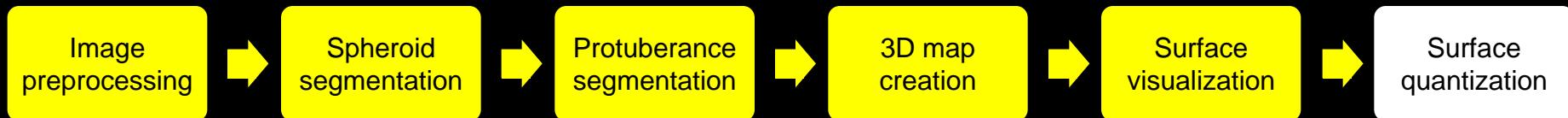
3D RECONSTRUCTION METHOD



3D MAP CREATION

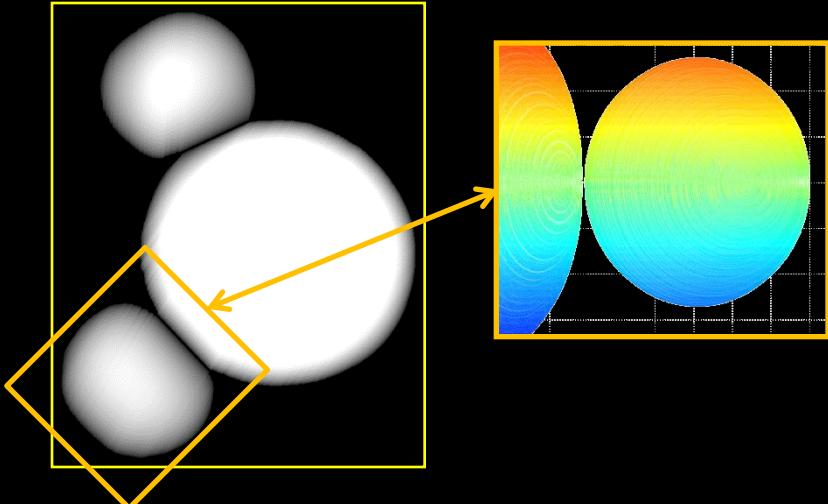


3D RECONSTRUCTION METHOD

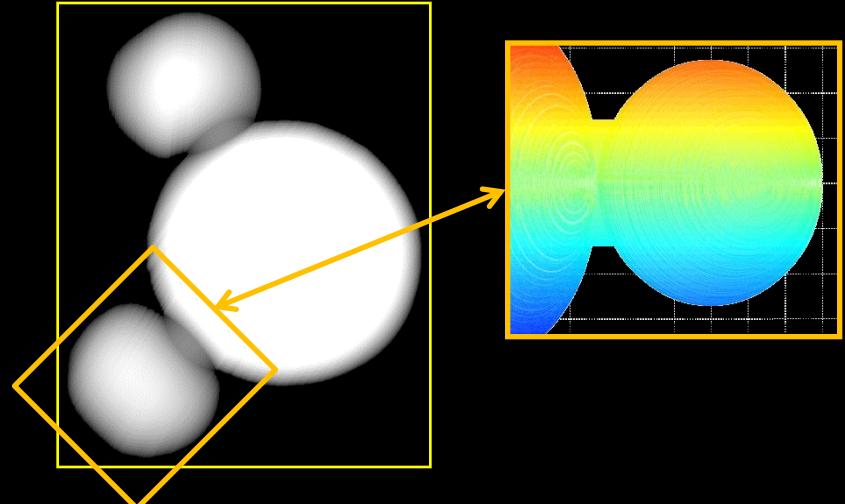


INTERCONNECTING THE 3D PARTS

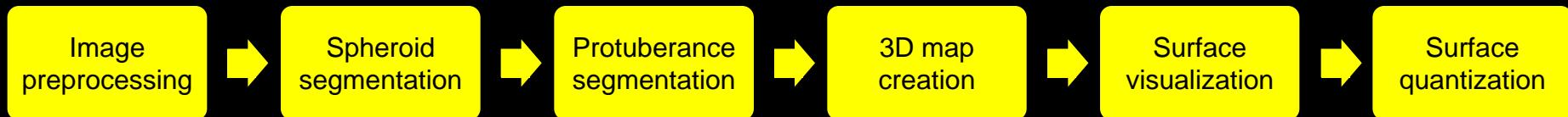
Single connection



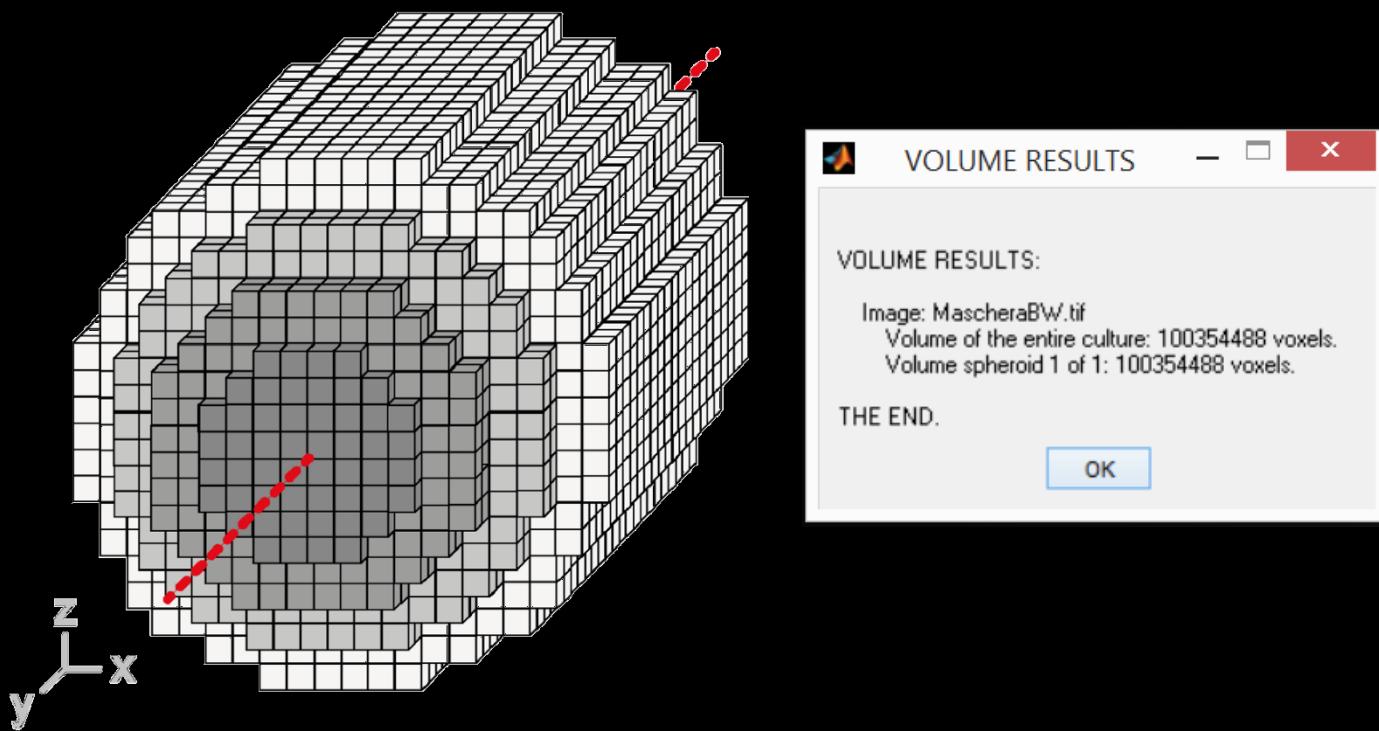
Parts interconnected with cylinders



3D RECONSTRUCTION METHOD



SURFACE QUANTIZATION



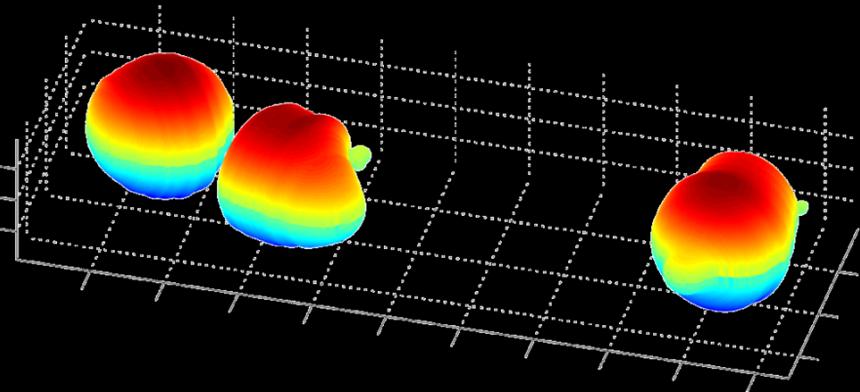
Analisi di un insieme di sferoidi

INPUT

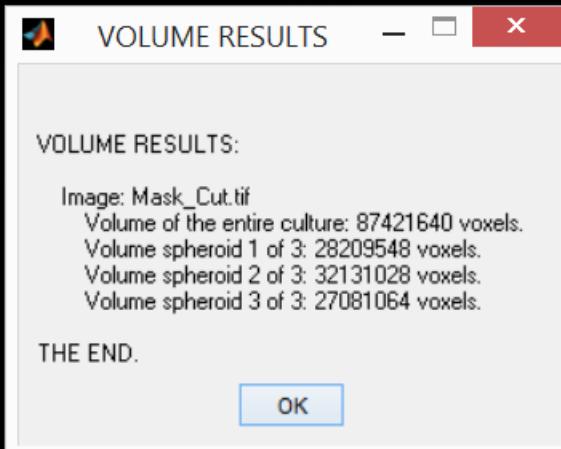


OUTPUT

3D reconstruction of all the spheroids



Volume of the single spheroids



Ground truth volume

A: VOLUME BY OBJECT WEIGHTING

B: DENSITY

C: CONVERSION COEFFICIENT (voxels/mm³)



Sample object



Precision balance



Graduated cylinder

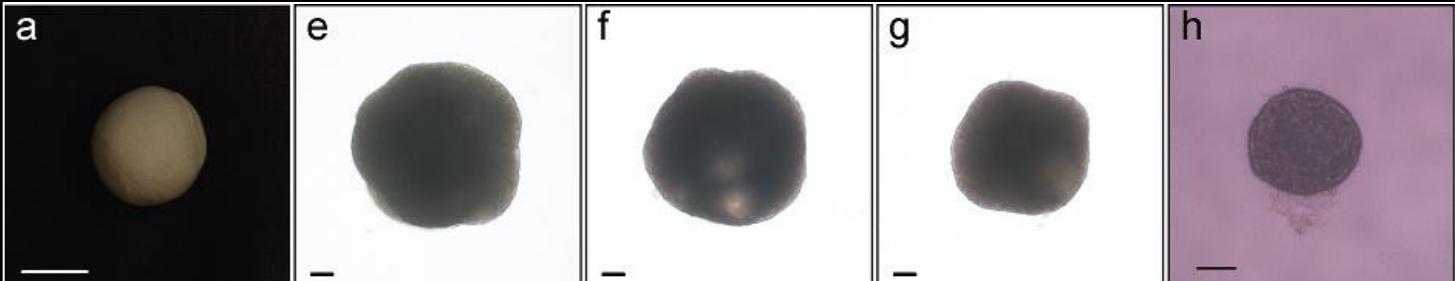


Camera calibration grid



Synthetic objects (Group1)

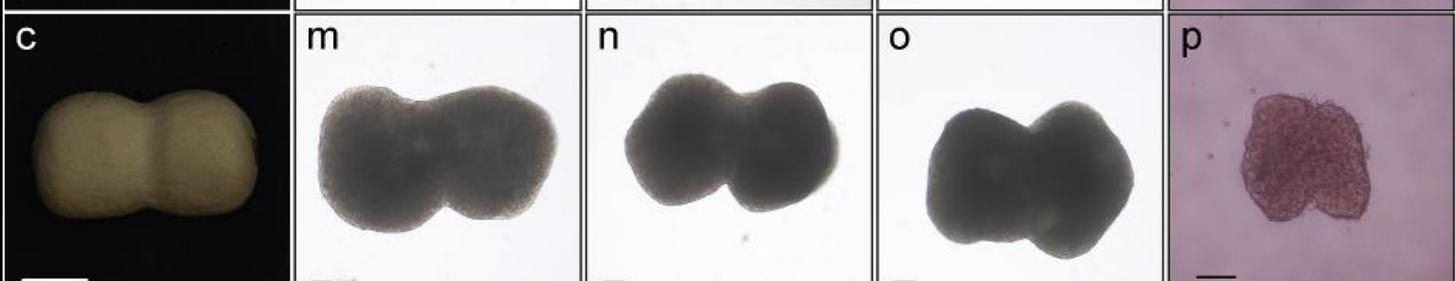
SPHERICAL



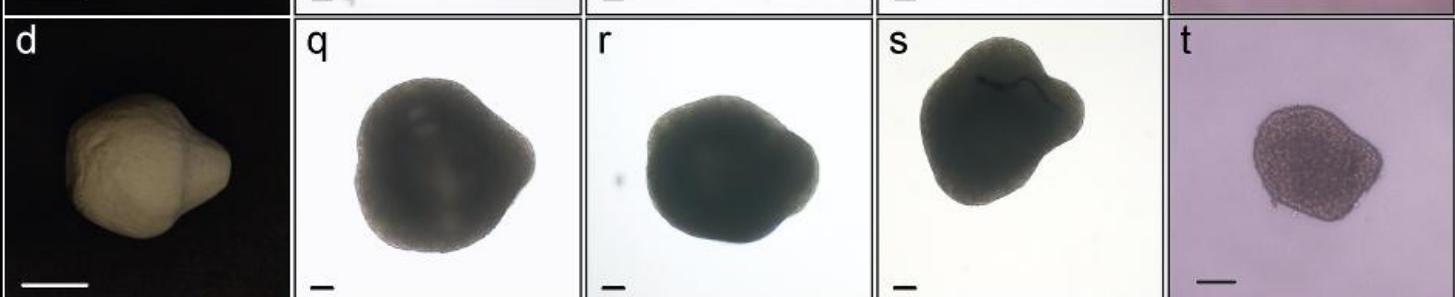
OVOID



EIGHT



IRREGULAR



Synthetic objects (Group2 with protuberances)

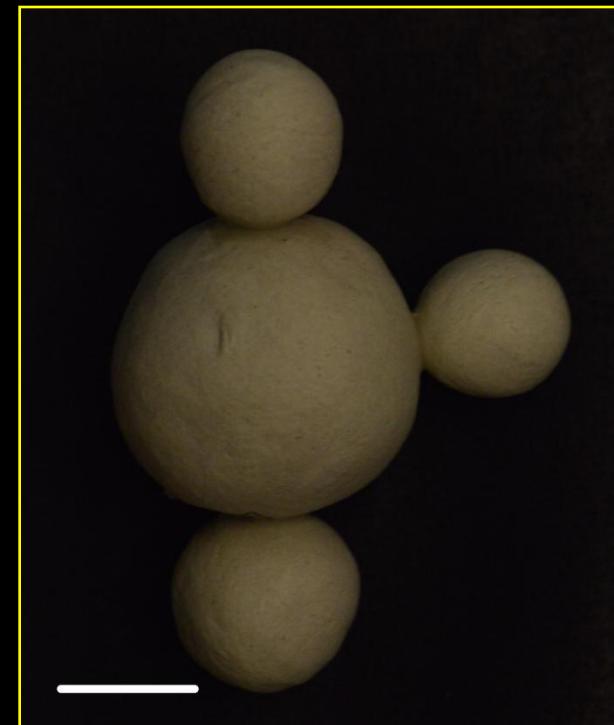
ONE PROTUBERANCE



TWO PROTUBERANCES



THREE PROTUBERANCES



Volume assessment: Experimental results

Absolute percentage error, objects Group1

	<i>SPHERE</i>	<i>ELLIPSOID</i>	<i>SIERACKI</i>	<i>ZEDER</i>	<i>ReViSP</i>
Spherical	0.69	1.99	1.09	0.74	1.26
Ovoid	23.97	8.15	2.45	2.01	2.08
Eight	21.91	33.12	4.34	4.96	1.65
Irregular	9.00	16.10	3.79	7.34	3.55
Average E%	13.89	14.84	2.92	3.76	2.14

Absolute percentage error, objects Group2

	<i>SPHERE</i>	<i>ELLIPSOID</i>	<i>SIERACKI</i>	<i>ZEDER</i>	<i>ReViSP</i>
One protuberance	17.89	23.03	5.28	7.16	1.02
Two protuberances	11.79	6.45	13.77	9.35	5.89
Three protuberances	19.23	162.96	37.88	10.66	6.55
Average E%	16.30	64.15	18.98	9.06	4.49

Software tools

- **CellTracker**, for tracking cells cultured in vitro
<http://celltracker.website/>
- **F-Tracker3D**, for tracking fluorescent cells/particles in 3D
<http://sourceforge.net/p/f-tracker3d/>
- **Advanced Cell Classifier**, for classifying cells in high-content screening images
<http://www.cellclassifier.org/>
- **CIDRE**, for correcting the illumination field of microscopy images
<http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n5/full/nmeth.3323.html>
- **MicroMos**, for building a panorama, starting from a set of overlapping images
<http://www.filippopiccinini.it/Mosaicing/index.html>
- **ReViSP**, for cancer spheroids Reconstruction and Visualization using a Single Projection
<http://sourceforge.net/p/revisp/>
- **AnaSP**, software suite to segment brightfield images of multicellular spheroids
<http://sourceforge.net/p/anasp/>
- **ReViMS**, for cancer spheroids Reconstruction and Visualization using Multiple Sections
<http://sourceforge.net/p/revims/>
-

AnaSP: software suite to analyse several features

15th July 1606



Rembrandt, 1629



Rembrandt, 1634



Rembrandt, 1640



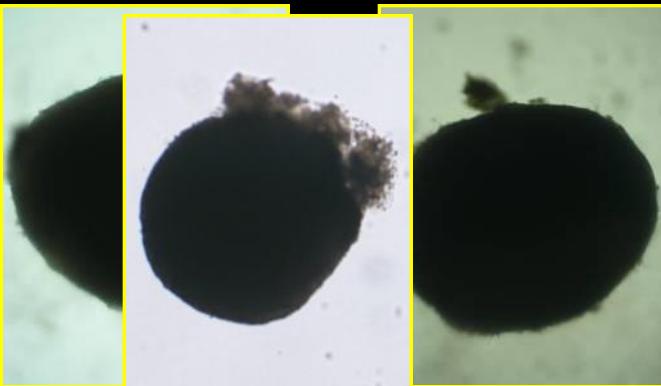
Rembrandt, 1669



DAY01



DAY08 DAY08



DAY15



COMPUTER METHODS AND PROGRAMS IN BIOMEDICINE 119 (2015) 43–52



ELSEVIER

journal homepage: www.intl.elsevierhealth.com/journals/cmpb



AnaSP: A software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids



Filippo Piccinini*

Advanced Research Center on Electronic Systems (ARCES) for Information and Communication Technologies "E. De Castro", University of Bologna, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2014

Received in revised form

11 February 2015

Accepted 16 February 2015

Keywords:

High-content screening

Widefield microscopy

Cancer 3D model

Multi-cellular aggregates

Pre-clinical oncology

ABSTRACT

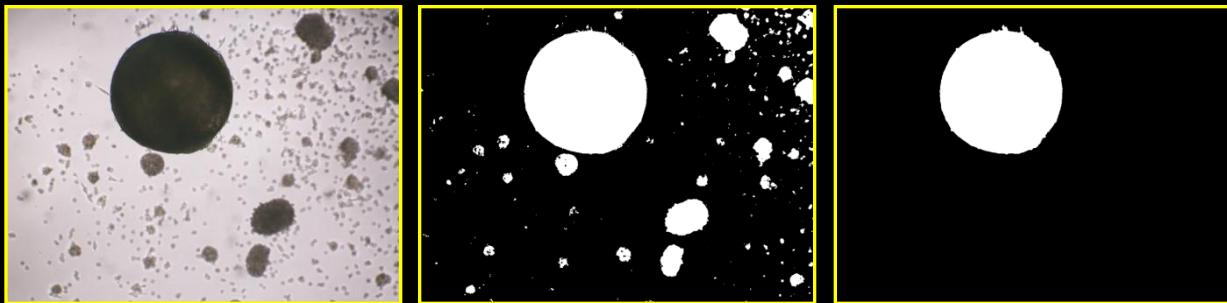
Today, more and more biological laboratories use 3D cell cultures and tissues grown *in vitro* as a 3D model of *in vivo* tumours and metastases. In the last decades, it has been extensively established that multicellular spheroids represent an efficient model to validate effects of drugs and treatments for human care applications. However, a lack of methods for quantitative analysis limits the usage of spheroids as models for routine experiments. Several methods have been proposed in literature to perform high throughput experiments employing spheroids by automatically computing different morphological parameters, such as diameter, volume and sphericity. Nevertheless, these systems are typically grounded on expensive automated technologies, that make the suggested solutions affordable only for a limited subset of laboratories, frequently performing high content screening analysis. In this work we propose AnaSP, an open source software suitable for automatically estimating several morphological parameters of spheroids, by simply analyzing brightfield images

AnaSP: software suite to analyse several features

AnaSP GUI



SPHEROID SEGMENTATION



MORPHOLOGICAL FEATURES COMPUTATION

	MaskName	Area	EquivalentDiameter	Length	MajorDiameter	ThroughCentroid	Length
1	Spheroid_001.tif	143263	427.0926				466.0005
2	Spheroid_002.tif	186113	486.7920				649.2158
3	Spheroid_003.tif	264805	580.6550				598.9132
4	Spheroid_004.tif	134667	414.0813				438.8093
5	Spheroid_005.tif	244386	557.8189				564.1842
6	Spheroid_007.tif	221820	531.4414				548.4932
7	Spheroid_008.tif	156073	445.7783				465.7298
8	Spheroid_009.tif	224229	534.3194				589.2852
9	Spheroid_010.tif	141357	424.2421				451.8466
10	Spheroid_011.tif	179166	477.6204				552.0326
11	Spheroid_012.tif	265727	581.6650				616.7861
12	Spheroid_013.tif	200783	505.6133				520.0509
13	Spheroid_014.tif	124937	398.8417				461.8781
14	Spheroid_015.tif	139214	421.0140				456.1877
15	Spheroid_016.tif	184088	484.1365				543.6356
16	Spheroid_017.tif	281535	588.7165				612.0149

Software freely available on:
<http://sourceforge.net/p/anasp>

Download

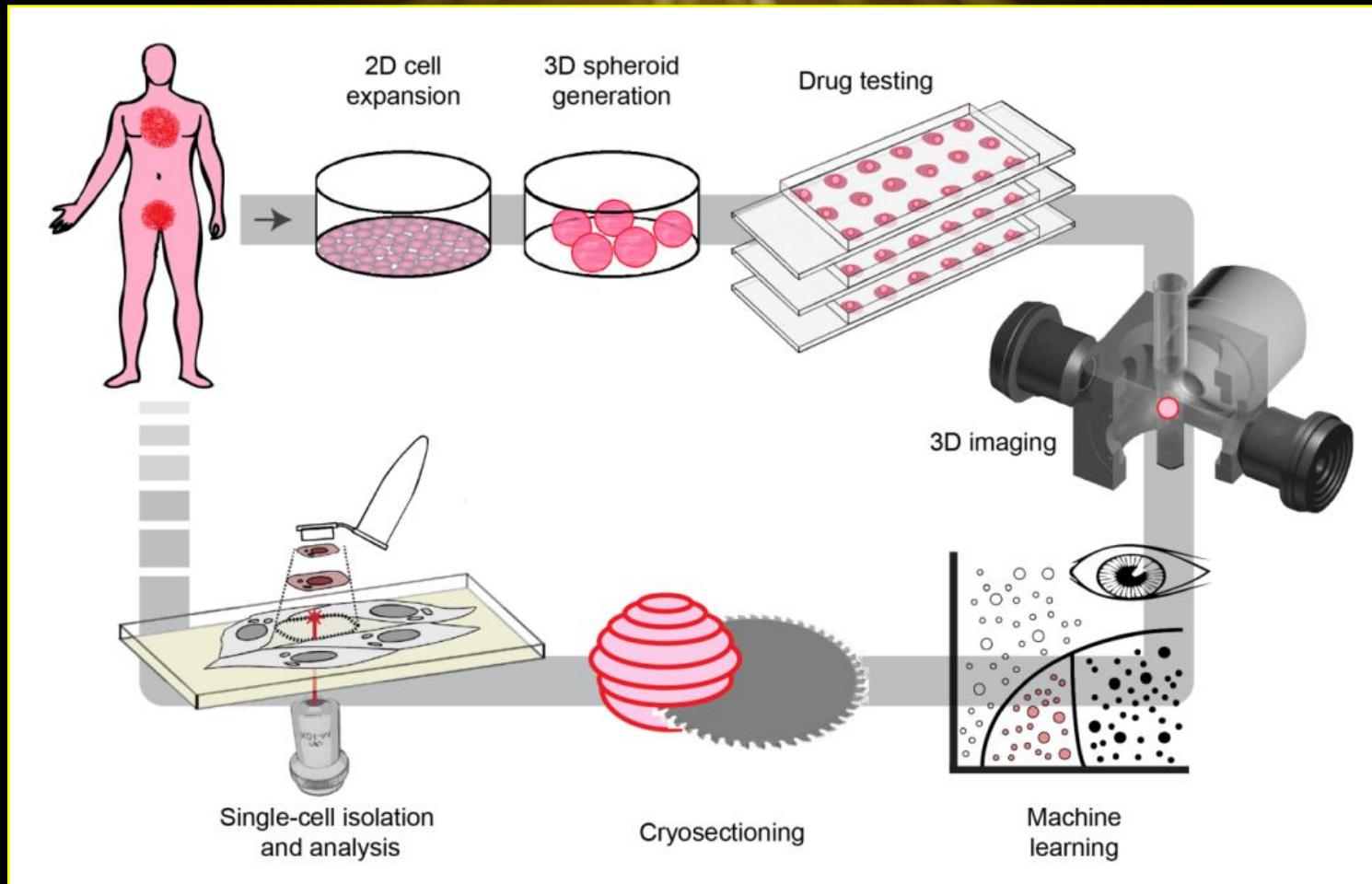
AnaSP_v_1_0_StandaloneVersion_84bit.zip

Outline

- **Introduzione**
- **Approvazione di un farmaco**
- **Colture cellulari 3D**
- **Software per analisi in 3D**
- **3D High-Content Screening**
- **Conclusioni**

High-Content Screening (HCS) in 3D

OVERVIEW



Aziende europee che stanno lavorando su 3D HCS di farmaci

Ocello, Leiden, The Netherlands, <http://ocello.nl/>

Cytoo, Grenoble, France, <https://cytoo.com/>

Cell2Sphere, Derio, Spain, <http://www.stemtektherapeutics.com/>

e altre stanno comparendo...

Sferoidi posizionati in piastre multi-pozzetto a bassa capacità di attrazione usati anche per testare diversi trattamenti di radioterapia

Round-bottom 96-well low attachment plates

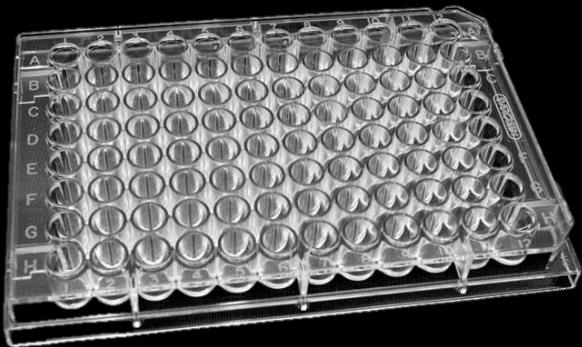
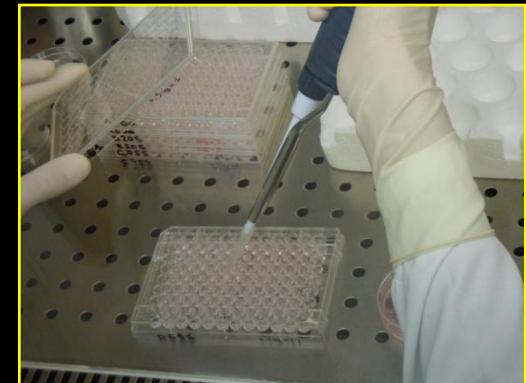
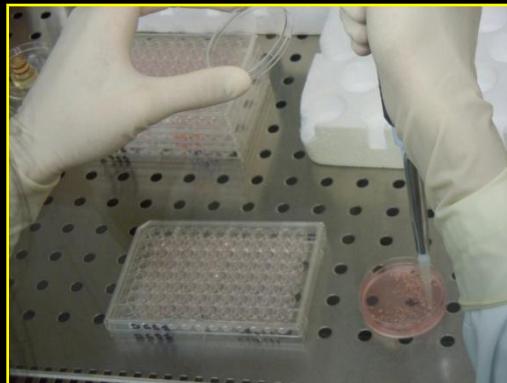
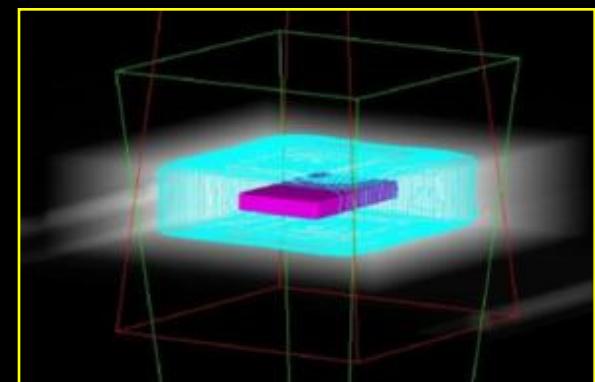


Plate preparation

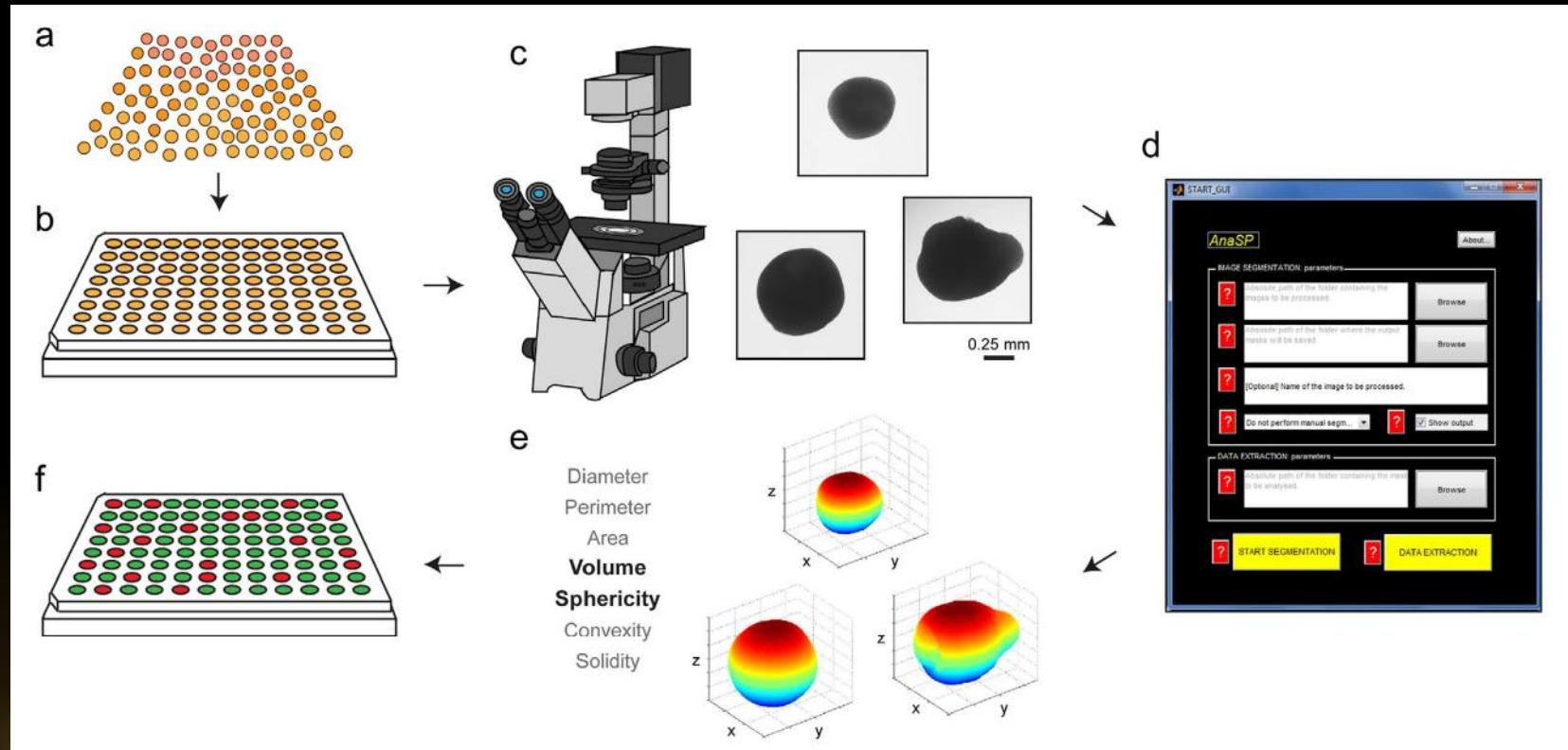


Phantoms for linear accelerator



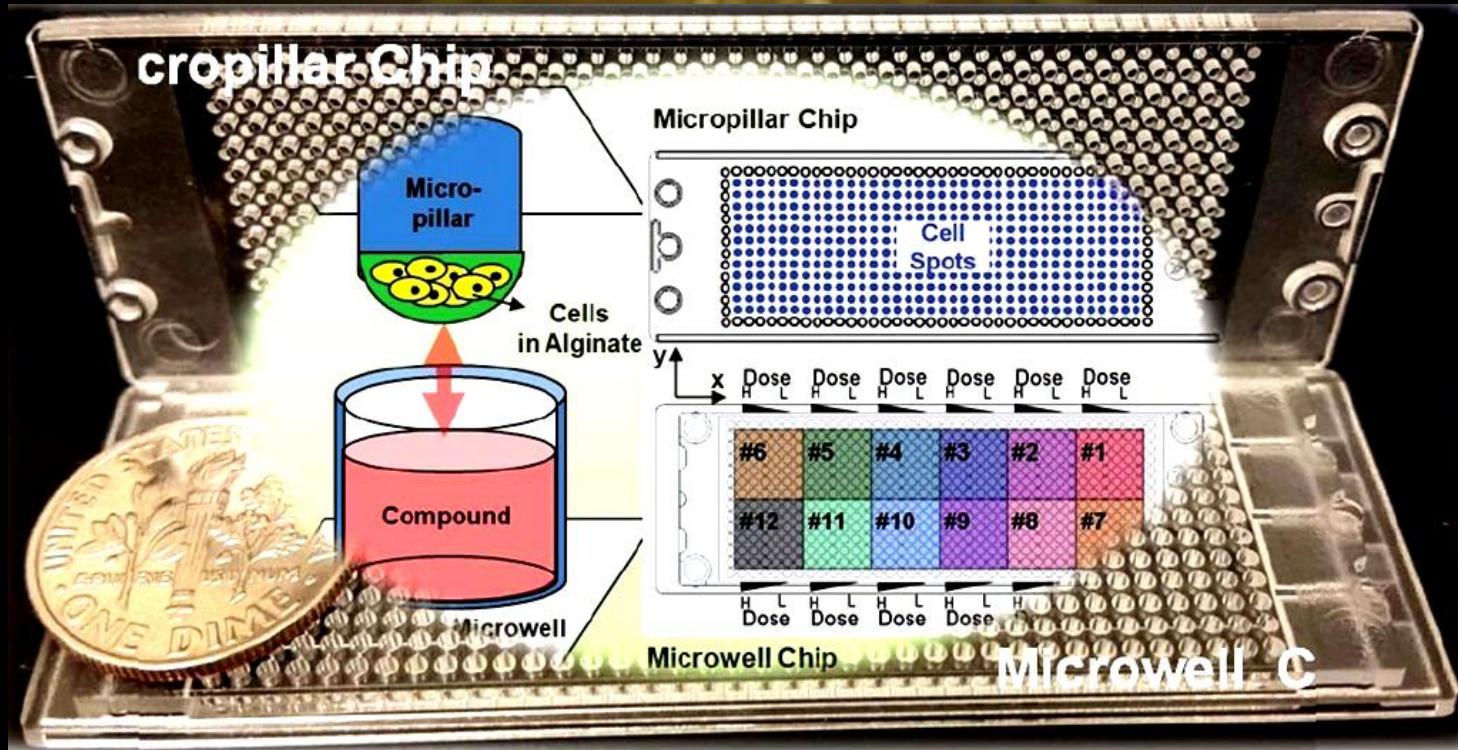
Come ottenere dati affidabili usando sferoidi

È necessaria una preselezione morfologica degli sferoidi, basata sul volume e sulla sfericità



2D high-content screening – New system

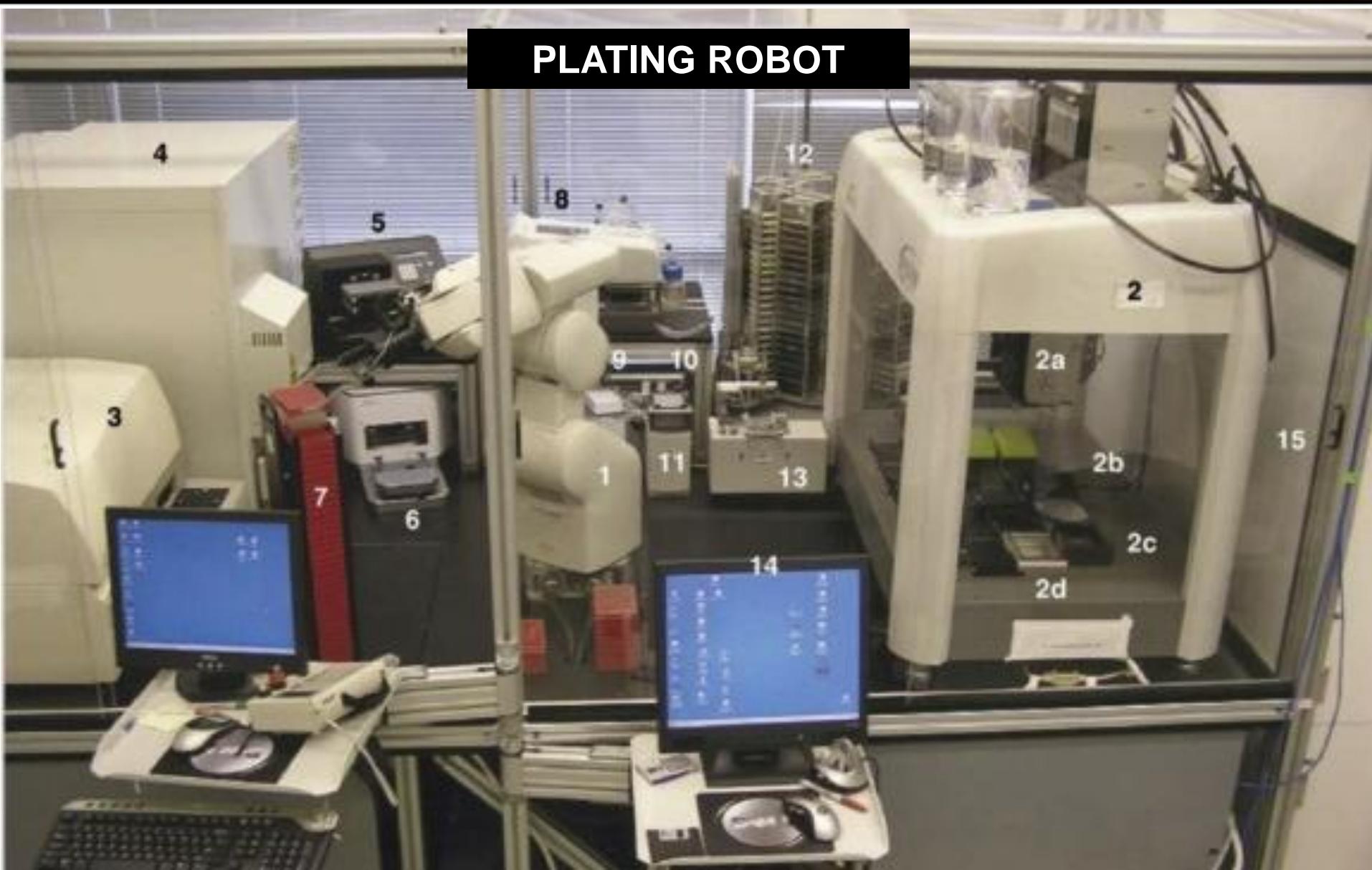
MICROPILLAR CHIP



Samsung Medical Center and Bioconvergence Research Center
Seoul, South Korea

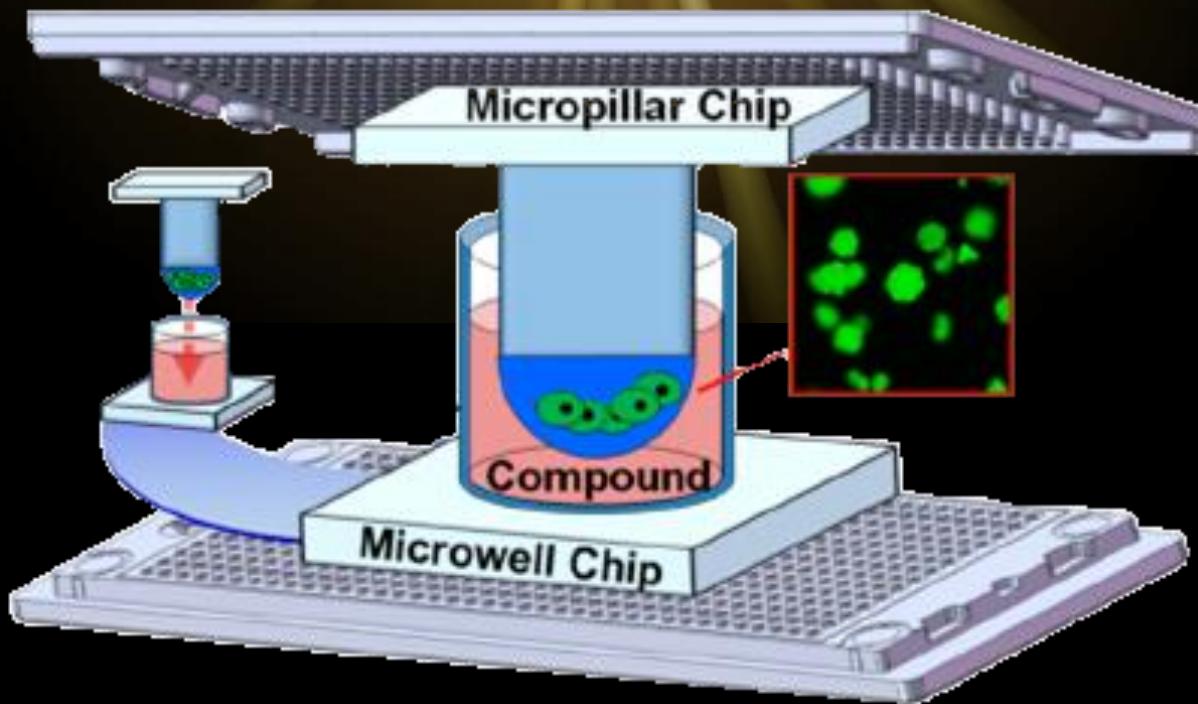
2D high-content screening

PLATING ROBOT



2D high-content screening

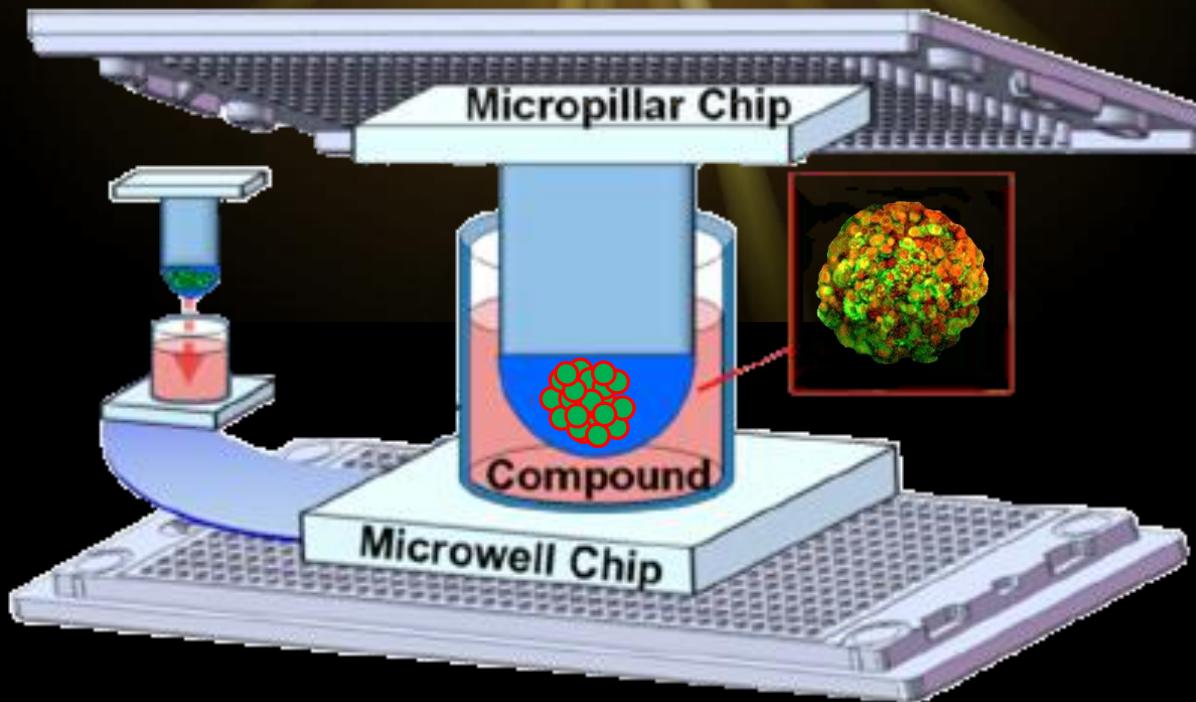
MICROPILLAR CHIP



Samsung Medical Center Seoul

3D high-content screening

MICROPILLAR CHIP FOR 3D SPHEROIDS



Samsung Medical Center Seoul - IRST Meldola

Cosa manca nel 2020 per condurre analisi 3D HCS?

Un approccio standard per ottenere sferoidi tridimensionali omogenei e stabili.

Una piattaforma automatizzata per maneggiare sferoidi e farmaci e un microscopio in grado di immaginare aggregati 3D fino a 1 mm di diametro.

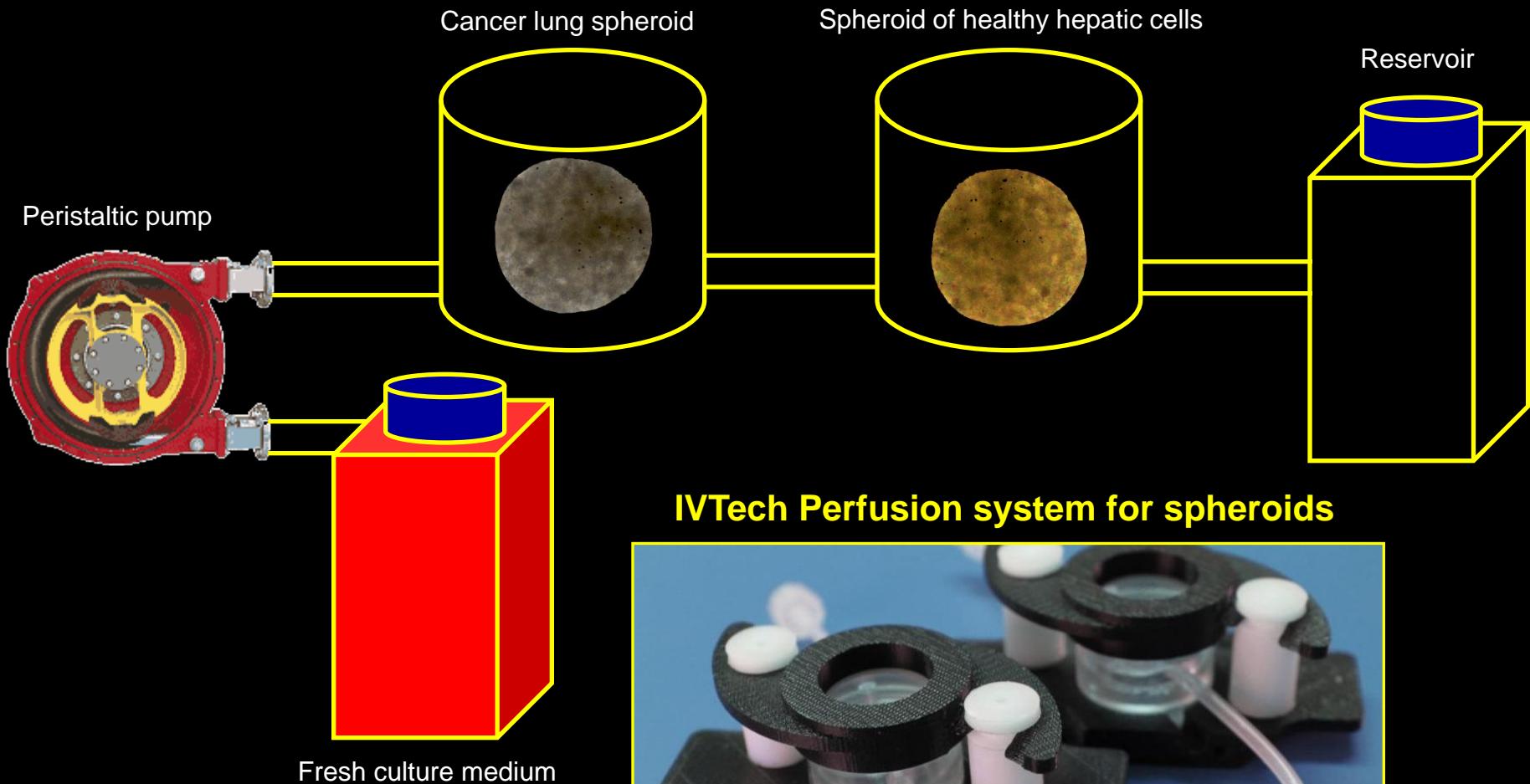
Un software in grado di segmentare le singole cellule degli sferoidi e di analizzare i diversi fenotipi cellulari.

E in futuro?

Analisi in dinamica

Modelli animali e colture cellulari 3D assieme

Dynamic analysis



IVTech Perfusion system for spheroids



Courtesy by www.ivtech.it

Animal models



PRE-TREATED CANCER SPHEROIDS



High radiation dosage

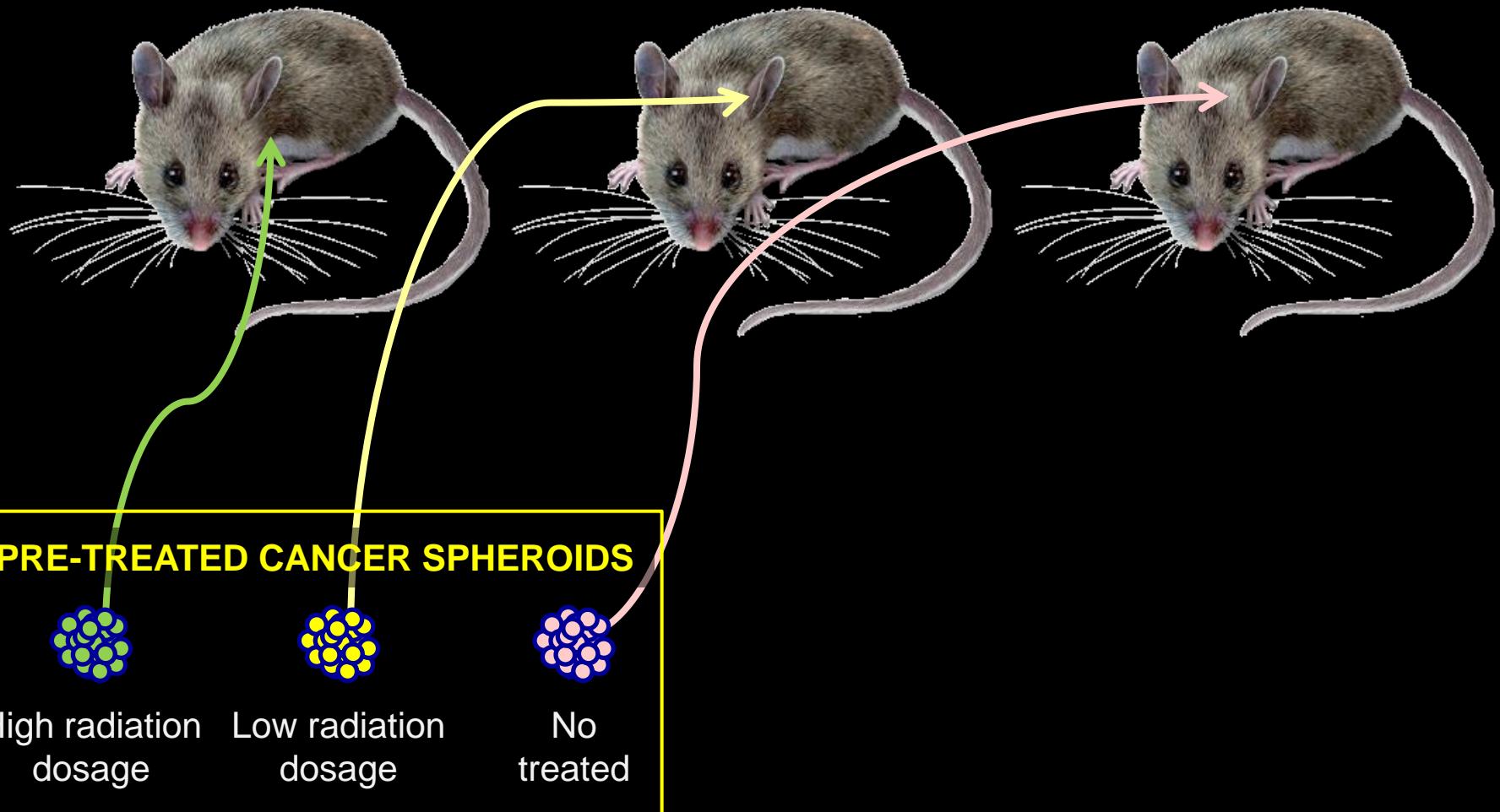


Low radiation dosage

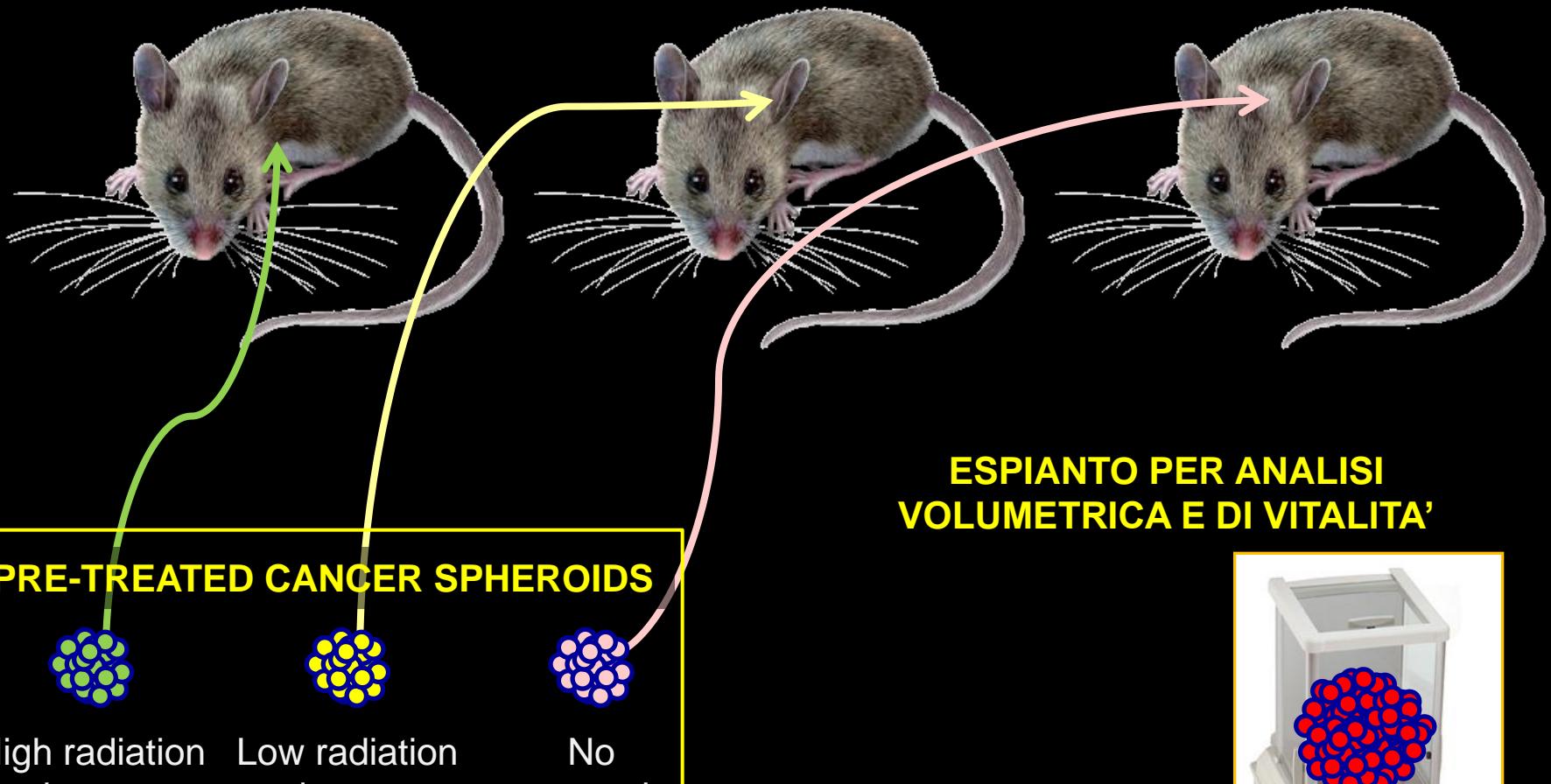


No treated

Animal models



Animal models



Outline

- **Introduzione**
- **Approvazione di un farmaco**
- **Colture cellulari 3D**
- **Software per analisi in 3D**
- **3D High-Content Screening**
- **Conclusioni**

TAKE-HOME MESSAGES

VARIABILITA' PER LA FORMA

Aggregati multicellulari dello stesso volume ma forma diversa sono caratterizzati da una diversa vitalità. Di conseguenza, è possibile utilizzare solo sferoidi dello stesso volume e forma per ottenere dati riproducibili in analisi HCS.

VARIABILITA' PER LA DIMENSIONE

Gli aggregati multicellulari di grandi dimensioni (e.g. Diametro > 0,5 mm) sono caratterizzati da cellule con un diverso stato fisiologico: cellule proliferative nel guscio esterno, cellule senescenti nello strato intermedio, cellule necrotiche nel nucleo interno.

LIMITI DELLA PENETRAZIONE DELLA LUCE

Gli aggregati multicellulari sono modelli piuttosto densi. Con le attuali tecnologie di microscopia siamo in grado di acquisire immagini a livello di singola cellula solo di aggregati con un diametro di circa 350 micrometri.

ANALISI STATISTICHE LIMITATE

Esistono strumenti per calcolare il volume dell'intero sferoide (ad esempio ReViMS) e le sue caratteristiche morfologiche (ad esempio AnaSP). Tuttavia, oggi non è disponibile uno strumento validato per l'analisi a livello di singola cella.

Conclusioni

[...] Oggi esistono vari algoritmi open source per l'analisi e la visualizzazione di immagini 3D, ma spesso il loro utilizzo non è semplice dal punto di vista delle competenze informatiche richieste e quindi risultano spesso non direttamente accessibili da biologi e medici.

[...] non è vantaggioso per il settore fossilizzarsi all'utilizzo dei modelli attualmente disponibili poiché spesso non sono stati validati clinicamente e non sono probabilmente abbastanza complessi da imitare fedelmente la fisiologia dell'uomo.

[...] Se non investiamo tempo e denaro nello stabilire linee guida appropriate su come convalidare un modello, come coltivare le cellule, come acquisire le immagini e come analizzare i dati risultanti, corriamo il rischio di ottenere dati non rappresentativi di ciò che accadrà nell'uomo

N. Carragher, F. Piccinini, A. Tesei, O.J. Trask Jr, M. Bickle, P. Horvath.
Concerns, challenges and promises of high-content analysis of 3D cellular models. Nature Reviews Drug Discovery, 2018

Conclusioni

[...] Oggi esistono vari algoritmi open source per l'analisi e la visualizzazione di immagini 3D, ma spesso il loro utilizzo non è semplice dal punto di vista delle competenze informatiche richieste e quindi risultano spesso non direttamente accessibili da biologi e medici.

[...] non è vantaggioso per il settore fossilizzarsi all'utilizzo dei modelli attualmente disponibili poiché spesso non sono stati validati clinicamente e non sono probabilmente abbastanza complessi da imitare fedelmente la fisiologia dell'uomo.

[...] Se non investiamo tempo e denaro nello stabilire linee guida appropriate su come convalidare un modello, come coltivare le cellule, come acquisire le immagini e come analizzare i dati risultanti, corriamo il rischio di ottenere dati non rappresentativi di ciò che accadrà nell'uomo

N. Carragher, F. Piccinini, A. Tesei, O.J. Trask Jr, M. Bickle, P. Horvath.

Concerns, challenges and promises of high-content analysis of 3D cellular models. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018

