

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
06. September 2019 (06.09.2019)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2019/166361 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G06T 7/00 (2017.01) G06K 9/00 (2006.01)

G06N 20/00 (2019.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/054558

(22) Internationales Anmeldedatum:

25. Februar 2019 (25.02.2019)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2018 104 616.2

28. Februar 2018 (28.02.2018) DE

(71) Anmelder: **CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH**

[DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder: **AMTHOR, Manuel**; Kronfeldstraße 15, 07745

Jena (DE). **HAASE, Daniel**; An der Schiere 57, 07751 Zöll-

nitz (DE). **KLEPPE, Ingo**; Kaninchenweg 31, 07749 Jena (DE).

(74) Anwalt: **QIP PATENTANWÄLTE, DR. KUEHN &**

PARTNER MBB; Goethestrasse 8, 80336 München (DE).

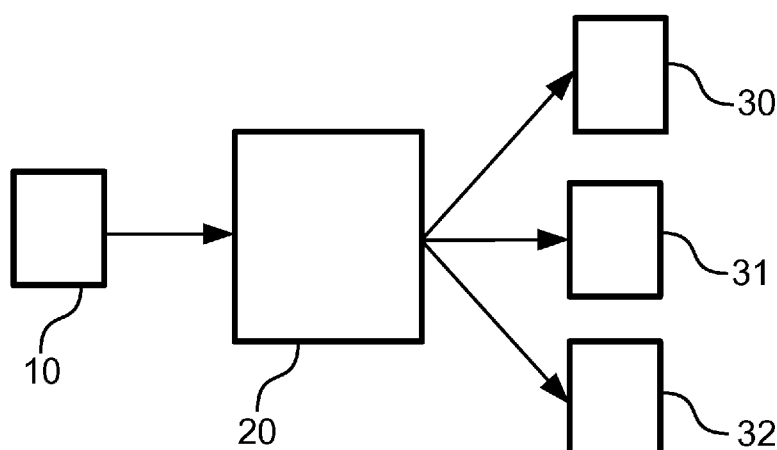
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für

jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) **Title:** METHOD FOR SPLITTING ONE OR MORE IMAGES OF A SAMPLE INTO IMAGE DATA SPLIT ACCORDING TO DYES, COMPUTER PROGRAM PRODUCT, COMPUTER-READABLE MEDIUM STORING THE COMPUTER PROGRAM PRODUCT AND SYSTEM FOR SPLITTING ONE OR MORE IMAGES OF A SAMPLE INTO IMAGE DATA SPLIT ACCORDING TO DYES

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUM AUFTEILEN EINES ODER MEHRERER BILDER EINER PROBE IN NACH FARBSTOFFEN AUFGETEILTE BILDDATEN, COMPUTERPROGRAMMPRODUKT, COMPUTERLESBARES MEDIUM, AUF DEM DAS COMPUTERPROGRAMMPRODUKT GESPEICHERT IST, UND SYSTEM ZUM AUFTEILEN EINES ODER MEHRERER BILDER EINER PROBE IN NACH FARBSTOFFEN AUFGETEILTE BILDDATEN

Fig. 1



(57) **Abstract:** A method for splitting one or more images (20) of a sample into image data (30-32) split according to dyes, wherein the sample has at least two different dyes, in particular fluorescent dyes, is shown, wherein the method comprises the following steps: providing the one or more images (20) of the sample; and inputting the one or more images (20) into a machine learning system (10); producing the image data (30-32) split according to dyes from the image(s) (20) by means of the machine learning system (10), wherein the machine learning system (10) removes at least one partial structure of the sample that is present in the image data (30-32) split according to dyes for more than one dye from the image data (30-32) of one or more dyes.

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder (20) einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten (30-32), wobei die Probe mindestens zwei unterschiedliche Farbstoffe, insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe, aufweist, aufgezeigt, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst: Bereitstellen des einen oder der mehreren Bilder (20) der Probe; und Eingeben des einen oder der mehreren Bilder (20) in ein maschinelles Lernsystem (10); Erzeugen der nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) aus dem oder den Bildern (20) mittels des maschinellen Lernsystems (10), wobei das maschinelle Lernsystem (10) mindestens eine Teilstruktur der Probe, die in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) von mehr als einem Farbstoff vorhanden ist, aus den Bilddaten (30-32) eines oder mehrerer Farbstoffe entfernt.

Verfahren zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten, Computerprogrammprodukt, computerlesbares Medium, auf dem das Computerprogrammprodukt gespeichert ist, und System zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten, ein Computerprogrammprodukt, ein computerlesbares Medium, auf dem das Computerprogrammprodukt gespeichert ist, und ein System zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten.

Stand der Technik

In der Fluoreszenzmikroskopie werden Proben (z.B. biologische Proben) mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die beispielsweise von einem Mikroskop aufgenommenen Bilder werden anschließend nach Fluoreszenzfarbstoffen getrennt. Durch überlappende Anregungs-Spektren und/oder Emissions-Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe treten üblicherweise optische Artefakte bzw. dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff falsch bzw. unzutreffend zugeordnete Elemente in den nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilten Bildern auf (sogenanntes „Durchbluten“ bzw. sogenannter „Cross-talk“). Konkret bedeutet dies, dass in den resultierenden nach Fluoreszenzfarbstoffen getrennten Bildern Pixel bzw. Strukturen aus einem Farbkanal bzw. einem Kanal eines Fluoreszenzfarbstoffs auch (abgeschwächt) in (mindestens einem) anderen Farbkanal bzw. Kanal eines anderen Fluoreszenzfarbstoffs sichtbar sind, d.h. Elemente bzw. Strukturen werden teilweise dem falschen Kanal bzw. dem falschen Fluoreszenzfarbstoff zugeordnet (sogenannte Artefakte).

Zum Aufteilen des Bilds oder der Bilder nach Fluoreszenzfarbstoffen wird beispielsweise lineares Unmixing verwendet. Bei dem linearen Unmixing werden das Bild bzw. die Bilder pixelweise entmischt, d.h. nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilt. Fig. 4a und Fig. 4b zeigen mittels linearen Unmixing gemäß dem Stand der Technik nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilte Kanäle bzw. Bilder bzw. Bilddaten 30', 31'. In Fig. 4b sind die linienförmigen

Strukturen optische Artefakte, d.h. diesem Kanal bzw. Bild bzw. diesem Fluoreszenzfarbstoff falsch zugeordnete Elemente/Pixel aus dem Kanal bzw. Bild bzw. des Fluoreszenzfarbstoffs, das bzw. der in Fig. 4a gezeigt ist.

Nachteilig hieran ist jedoch, dass üblicherweise auch nach einem durchgeführten linearen Unmixing in den nach Fluoreszenzfarbstoff aufgeteilten Kanälen bzw. Bildern optische Artefakte (d.h. dem falschen Fluoreszenzfarbstoff zugeordnete Pixel) vorhanden sind, u.a. aufgrund von zufälligen Einflüssen (z.B. Rauschen), das die Werte im Bild beeinflusst, und/oder aufgrund dessen, dass die Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe nicht exakt bekannt sind.

Offenbarung der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bzw. eine Vorrichtung bzw. ein System aufzuzeigen, mittels dem ein Bild bzw. Bilder von Proben nach Farbstoffen derart in Bilddaten aufgeteilt werden bzw. werden können, dass die nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten wenige bis keine optischen Artefakte bzw. dem jeweils falschen Farbstoff zugewiesene bzw. zugeordnete Elemente aufweisen.

Diese Aufgabe wird jeweils durch ein Verfahren zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten gemäß Anspruch 1 bzw. ein Computerprogrammprodukt gemäß Anspruch 16 bzw. ein computerlesbares Medium, auf dem das Computerprogrammprodukt gespeichert ist, gemäß Anspruch 17 bzw. ein System zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten gemäß Anspruch 18 gelöst.

Insbesondere wird die Aufgabe durch ein Verfahren zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten, wobei die Probe mindestens zwei unterschiedliche Farbstoffe, insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe, aufweist, gelöst, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst: Bereitstellen des einen oder der mehreren Bilder der Probe; Eingeben des einen oder der mehreren Bilder in ein maschinelles Lernsystem; und Erzeugen der nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten aus dem oder den Bildern mittels des maschinellen Lernsystems, wobei das maschinelle Lernsystem

mindestens eine Teilstruktur der Probe, die in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten von mehr als einem Farbstoff vorhanden ist, aus den Bilddaten eines oder mehrerer Farbstoffe entfernt.

Ein Vorteil hiervon ist, dass ohne explizite Angabe bzw. Vorgabe des Abbildens der Eingabedaten (Bilder der Probe) auf die Ausgabedaten (nach Farbstoffen getrennte Bilddaten) nach einem Training (z.B. mit Trainingsdaten) das maschinelle Lernsystem Bilddaten bzw. Bilder mit wenigen bis keinen dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten (d.h. Pixel bzw. Strukturen in Bilddaten eines Farbstoffs, die in Bilddaten eines anderen Farbstoffs durchbluten bzw. dort Cross-Talk darstellen) erzeugt. Vorteilhaft ist auch, dass das maschinelle Lernsystem Bilddaten, die einem linearen Unmixing, wie es aus dem Stand der Technik bekannt ist, überlegen sind, erzeugen kann, da nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten mit weniger dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten bzw. Fehlzugeordnungen zu den jeweiligen Bilddaten ausgegeben werden. Zudem können mittels des Lernsystems Bilder einer Vielzahl unterschiedlich gearteter Proben ohne wesentliche Änderungen des maschinellen Lernsystems schnell und technisch einfach in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten mit wenigen bis keinen dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten zerlegt bzw. aufgeteilt werden. Vorteilhaft ist zudem, dass das Verfahren nicht pixelweise eine Zuordnung zu dem jeweiligen Farbstoff durchführt, sondern strukturbasiert arbeitet. Strukturen bzw. Teilstrukturen der Probe können beispielsweise durch Kantenerkennung oder ähnlichem erkannt werden. Wenn bereits nach Farbstoff vorgetrennte Bilder als Eingabedaten in das maschinelle Lernsystem eingegeben werden, können durch das Verfahren in den eingegebenen Bildern vorhandene dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optische Artefakte in den erzeugten Bilddaten verhindert bzw. unterdrückt werden, d.h. in den erzeugten Bilddaten sind weniger dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optische Artefakte vorhanden als in den eingegebenen bereits nach Farbstoff vorgetrennten Bildern. Wenn die eingegebenen Bilder nicht bereits nach Farbstoffen vorgetrennt sind, d.h. das Bild oder die Bilder weisen jeweils Daten von mehreren Farbstoffen auf, so werden vom maschinellen Lernsystem nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten ausgegeben, in den wenige bis keine dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optische Artefakte vorhanden sind. Es wird somit üblicherweise ein Verhindern des Auftretens von optischen Artefakten in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten erreicht.

Aufteilen des einen oder der mehreren Bilder der Probe kann insbesondere bedeuten, dass ausgehend von Rohdaten bzw. unbehandelten Bildern nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten als Ausgabe erzeugt werden, in denen wenige oder keine dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optischen Artefakte vorhanden sind, oder dass ausgehend von bereits nach Farbstoffen vorgetrennten Bildern dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte aus diesen entfernt werden, so dass nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten mit wenigen oder keinen dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten ausgegeben werden.

Insbesondere ist ein Element beim Aufteilen nach Farbstoffen dann zutreffend zugeordnet bzw. dem zutreffenden Farbstoff zugeordnet, wenn das jeweilige Element den jeweiligen Farbstoff umfasst oder mit diesem markiert ist. Die aus den Bilddaten eines oder mehrerer Farbstoffe entfernten Teilstrukturen können Bilddaten eines anderen oder mehrerer anderer Farbstoffe zugewiesen werden, so dass eine Art Verschieben der Teilstruktur bzw. der Bilddaten der Teilstruktur aus Bilddaten eines ersten Farbstoffs in Bilddaten eines zweiten Farbstoffs durchgeführt wird. Es ist jedoch auch möglich, dass die Teilstruktur bzw. die Bilddaten der Teilstruktur nur aus Bilddaten eines oder mehrerer Bilddaten entfernt wird, jedoch die Teilstruktur bzw. die Bilddaten der Teilstruktur keinen Bilddaten anderer Farbstoffe zugeordnet wird, d.h. dass kein Verschieben von Bilddaten stattfindet.

Insbesondere wird die Aufgabe auch durch ein Computerprogrammprodukt gelöst, das von einem Prozessor eines Computers lesbare Instruktionen aufweist, die, wenn sie von dem Prozessor ausgeführt werden, den Prozessor veranlassen, das oben beschriebene Verfahren auszuführen.

Insbesondere wird die Aufgabe auch durch ein System zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten, wobei die Probe mindestens zwei unterschiedliche Farbstoffe, insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe, aufweist, gelöst, wobei das System ein maschinelles Lernsystem umfasst, das darauf trainiert ist, folgendes auszuführen: Erzeugen der nach Farbstoff aufgeteilten Bilddaten aus einem oder mehreren in das maschinelle Lernsystem eingegebenen Bildern der Probe mittels des maschinellen Lernsystems, wobei das maschinelle Lernsystem mindestens eine Teilstruktur der Probe, die in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten von mehr als einem Farbstoff vorhanden ist, aus den Bilddaten eines oder mehrerer Farbstoffe entfernt.

Ein Vorteil hiervon ist, dass das System ohne explizite Angabe bzw. Vorgabe des Abbildens der Eingabedaten (Bilder der Probe) auf die Ausgabedaten (nach Farbstoffen getrennte Bilddaten) Bilddaten bzw. Bilder mit wenigen bis keinen dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. Artefakten (d.h. Pixel bzw. Strukturen in Bilddaten eines Farbstoffs, die in Bilddaten eines anderen Farbstoffs durchbluten bzw. dort Cross-Talk darstellen) erzeugt. Vorteilhaft an dem System ist auch, dass das System Bilddaten, die einem linearen Unmixing, wie es aus dem Stand der Technik bekannt ist, überlegen sind, erzeugt, da nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten mit weniger dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten bzw. Fehlzugeordnungen zu den jeweiligen Bilddaten ausgegeben werden. Zudem können mittels des Systems Bilder einer Vielzahl unterschiedlich gearteter Proben ohne wesentliche Änderungen des Systems schnell und technisch einfach in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten mit wenigen bis keinen dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten zerlegt bzw. aufgeteilt werden. Vorteilhaft ist zudem, dass das System nicht pixelweise eine Zuordnung zu dem jeweiligen Farbstoff durchführt, sondern strukturbasiert arbeitet. Wenn bereits nach Farbstoff vorgetrennte Bilder als Eingabedaten in das System eingegeben werden, kann durch das System in den eingegebenen Bildern vorhandene dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optische Artefakte in den erzeugten Bilddaten verhindert bzw. unterdrückt werden, d.h. in den erzeugten Bilddaten sind weniger dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optische Artefakte vorhanden als in den eingegebenen bereits nach Farbstoff vorgetrennten Bildern. Wenn die eingegebenen Bilder nicht bereits nach Farbstoffen vorgetrennt sind, d.h. das Bild oder die Bilder weisen jeweils Daten von mehreren Farbstoffen auf, so werden vom System nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten ausgegeben, in den wenige bis keine dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optischen Artefakte vorhanden sind.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens umfasst das Verfahren ferner folgende Schritte: Eingeben von Referenzbildern in das maschinelle Lernsystem; und Vergleichen der mittels des maschinellen Lernsystems nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten der Referenzbilder mit nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilddaten der Referenzbilder zum Trainieren des maschinellen Lernsystems zum verbesserten Aufteilen des einen oder der mehreren Bilder der Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten. Vorteilhaft hieran ist, dass das maschinelle Lernsystem technisch einfach ohne explizite Angabe bzw. Vorgabe des Abbildens der Eingangsdaten auf die Ausgangsdaten und schnell trainiert werden kann. Das Vergleichen kann automatisiert bzw. computerisiert, z.B. durch das maschinelle Lernsystem, stattfinden, so dass insbesondere beim Vergleichen kein manueller Eingriff bzw. kein Eingriff durch einen Menschen notwendig ist. Die nach Farbstoffen zutreffend

aufgeteilten Bilddaten enthalten im Wesentlichen keine dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optischen Artefakte. Bei den nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilddaten können dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optische Artefakte beispielsweise manuell bzw. durch einen Menschen entfernt worden sein.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens umfasst oder ist das maschinelle Lernsystem ein neuronales Netzwerk, insbesondere ein deep learning System und/oder ein Convolutional Neural Network. Vorteilhaft hieran ist, dass dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optische Artefakte in den Kanälen noch besser unterdrückt werden können bzw. werden. Zudem ist das maschinelle Lernsystem technisch einfach aufgebaut.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens werden das oder die Bilder vor dem Eingeben in das maschinelle Lernsystem einem linearen oder nicht-linearen Unmixing und/oder einem Entrauschen unterzogen. Hierdurch kann technisch einfach das lineare Unmixing mit dem Aufteilen nach Farbstoffen mittels des maschinellen Lernsystems kombiniert werden, so dass noch weniger dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. Artefakte in den nach Farbstoff aufgeteilten Bilddaten vorhanden sind. Durch das Entrauschen vor dem Eingeben kann die Anzahl an dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten in den aufgeteilten Bilddaten noch weiter reduziert werden.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens wird das Entfernen von Teilstrukturen der Probe auf Grundlage der Struktur der Probe durchgeführt, wobei insbesondere optische Artefakte in den Bilddaten anhand von identischen und/oder ähnlichen Teilstrukturen in den Bilddaten verschiedener Farbstoffe bestimmt werden. Hierdurch kann die Anzahl an dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten noch weiter reduziert werden, da nicht pixelweise ein Aufteilen nach Farbstoffen stattfindet, sondern ein Aufteilen nach Farbstoffen auf Grundlage der Struktur der Probe durchgeführt wird. Es wird somit von dem maschinellen Lernsystem berücksichtigt, dass die Pixel des oder der eingegebenen Bilder nicht (vollständig) unabhängig voneinander sind.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens werden neben dem einen oder mehreren Bildern Spektren der verwendeten Farbstoffe, eine Spektrendatenbank zum Schätzen und/oder Abgleichen der vorhandenen Spektren der Farbstoffe in dem einen oder mehreren Bildern, Aufnahmeeinstellungen und/oder Filtereinstellungen des einen oder der mehreren Bilder, Detektoreinstellungen des einen oder der mehreren Bilder und/oder Vorhersagen zum Cross-Talk zwischen den verschiedenen nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten zusätzlich in das maschinelle Lernsystem eingegeben. Vorteilhaft hieran ist, dass das Aufteilen nach Farbstoffen noch zuverlässiger bzw. zutreffender durchgeführt werden kann.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens umfassen die Bilddaten Ausgangsbilder, wobei insbesondere jedes Ausgangsbild jeweils einen Farbstoff des oder der eingegebenen Bilder zeigt. Ein Vorteil hiervon ist, dass die Bilddaten besonders einfach betrachtet bzw. untersucht werden können. Darüber hinaus können, wenn jedes Ausgangsbild jeweils einen Farbstoff des oder der eingegebenen Bilder zeigt, die Farbstoffe in beliebigen Kombinationen miteinander untersucht bzw. betrachtet werden.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens erzeugt das maschinelle Lernsystem ein Koeffizientenarray für ein lineares Unmixing, wobei mittels des linearen Unmixing auf Basis des Koeffizientenarray das eine oder die mehreren Bilder nach Farbstoffen aufgeteilt wird. Ein Vorteil hiervon ist, dass nicht unmittelbar nach Farbstoffen getrennte Bilder erzeugt werden, sondern mittels des erzeugten Koeffizientenarrays ein nachfolgendes lineares Unmixing durchgeführt wird bzw. werden kann, dessen Ergebnis Bilder bzw. Bilddaten mit besonders wenigen dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten sind. Hierdurch kann das Aufteilen der Bilder nach Farbstoffen und das Entfernen von Teilstrukturen erheblich beschleunigt werden, da das lineare Unmixing besonders wenig Rechenzeit benötigt.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens erzeugt das maschinelle Lernsystem aus den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten ein oder mehrere Differenzbilder, wobei bereits nach Farbstoffen vorgetrennte Bilder minus des jeweiligen erzeugten dazugehörigen Differenzbildes nach Farbstoffen getrennte Ausgangsbilder erzeugen. Vorteilhaft hieran ist, dass für die Farbstoffe jeweils ein Differenzbild erzeugt wird, um welches das jeweils zu dem Farbstoff zugehörige Bild korrigiert werden muss, um zu Bildern bzw. Bilddaten mit möglichst wenigen dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten zu gelangen. Differenzbilder können beim Training des maschinellen Lernsystems vom

Menschen intuitiver interpretiert werden. Zudem werden Differenzbilder eher von Forschern akzeptiert, da die Korrektur der bereits nach Farbstoffen voraufgeteilten Bilder (z.B. durch lineares Unmixing voraufgeteilte Bilder) durch das maschinelle Lernsystem für den Menschen nachvollziehbar ist. Außerdem hat sich gezeigt, dass das Training eines maschinellen Lernsystems, das auf Differenzbilder bzw. Korrekturbilder abbildet bzw. solche ausgibt (sogenanntes Residual Learning), wesentlich schneller bzw. effektiver ist und bessere Ergebnisse liefert, d.h. Bilddaten mit weniger dem falschen Farbstoff zugewiesenen Elementen bzw. optischen Artefakten erzeugt.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens umfassen oder sind die mehreren Bilder zeitlich zueinander versetzte Aufnahmen derselben Probe und/oder entlang einer optischen Achse eines Mikroskops, mit dem die Bilder aufgenommen wurden, zueinander versetzte Aufnahmen derselben Probe. Hierdurch können insbesondere zeitliche Entwicklungen bzw. Veränderungen, z.B. von lebenden Proben (beispielsweise Tiere, Zellen etc.), besonders zuverlässig in nach Farbstoffen getrennte Bilddaten aufgeteilt werden. Hierdurch kann ein sogenannter Z-Stack (d.h. ein Stapel von Bildern entlang der optischen Achse des Mikroskops) mittels des maschinellen Lernsystems in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten zerlegt werden, wobei die Bilddaten wenige bis keine dem falschen Farbstoff zugewiesene Elemente bzw. optischen Artefakte aufweisen.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens bestimmt oder schätzt das maschinelle Lernsystem zusätzlich die Anzahl der zur Markierung der Probe verwendeten Farbstoffe und/oder identifiziert die zur Markierung der Probe verwendeten Farbstoffe. Vorteilhaft hieran ist, dass die Anzahl und/oder Identität der verwendeten Farbstoffe nicht in das maschinelle Lernsystem eingegeben werden müssen. Zudem können weitere Informationen über die Probe durch das maschinelle Lernsystem bestimmt werden.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens bestimmt das maschinelle Lernsystem ferner für jedes Pixel der ausgegebenen Bilddaten einen Konfidenzwert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass dieses Pixel den dem Farbstoff entsprechenden zutreffenden Bilddaten zugeordnet wurde und/oder die absolute Konzentration des jeweiligen Farbstoffs in den jeweiligen Bilddaten und/oder die Anzahl der Objekte in der Probe. Die Bestimmung des Konfidenzwerts hat den Vorteil, dass die Qualität der aufgeteilten Bilddaten besser bewertet werden kann, da jeweils angegeben wird, wie sicher die jeweilige Zuordnung des Pixels zu den jeweiligen Bilddaten ist (sogenannte Konfidenz). Auch ist vorstellbar, dass für die nach

Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten jeweils eine Konfidenzkarte erzeugt wird, d.h. eine zweidimensionale Karte, die für jedes Pixel oder jede Teilstruktur der Probe den Konfidenzwert angibt. Durch die Bestimmung der absoluten Konzentration der Farbstoffe (nach einer Kalibrierung) werden somit weitere Informationen über die Probe erlangt. Durch die Bestimmung der Anzahl der Objekte werden weitere Informationen über die Probe erlangt, die z.B. automatisiert weiterverarbeitet oder zur Kategorisierung der Bilder der Probe verwendet werden können.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens wird das maschinelle Lernsystem mittels erster Trainingsaufnahmen trainiert, wobei die ersten Trainingsaufnahmen Aufnahmen von jeweils nur mit einem Farbstoff markierten Proben umfassen, und/oder wird mittels zweiter Trainingsaufnahmen trainiert, wobei die zweiten Trainingsaufnahmen zusammengesetzte Aufnahmen von bereits jeweils nach Farbstoff zutreffend aufgeteilten Bilddaten umfassen. Durch die ersten Trainingsaufnahmen wird ein besonders effizientes und zuverlässiges Training des maschinellen Lernsystems erreicht. Durch die zweiten Trainingsaufnahmen kann das maschinelle Lernsystem mit besonders wenig Aufwand bzw. innerhalb sehr kurzer Zeit trainiert werden.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens umfassen oder sind die nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilddaten simulierte Bilddaten, insbesondere umfassen oder sind die nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilddaten mittels eines physikalischen Modells erzeugte simulierte Bilddaten, wobei vorzugsweise das physikalische Modell ein physikalisches Modell einer Aufnahmeoptik umfasst, und/oder die Referenzbilder werden mittels eines physikalischen Modells aus den nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilddaten erzeugt. Hierdurch können Trainingsdaten für das maschinelle Lernsystem in großer Zahl erzeugt werden. Das physikalische Modell kann insbesondere ein Modell enthalten, das die Anregung der Probe mit verschiedenen Lasern und/oder das Rauschen beim Entstehen bzw. Erzeugen einer echten Aufnahme bzw. eines echten Bilds einer Probe simuliert. Die nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilddaten können mittels eines physikalischen Modells miteinander vermischt und auf diese Weise können die Referenzbilder technisch einfach erzeugt werden.

Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens bestimmt das maschinelle Lernsystem Spektren der Farbstoffe. Somit können die Spektren, wenn z.B. eine Spektrendatenbank verwendet wurde, genauer bestimmt bzw. verfeinert werden.

Die Farbstoffe können Fluoreszenzfarbstoffe und/oder Hellfeldfarbstoffe umfassen oder sein.

Vorstellbar ist, dass, wenn die Farbstoffe Fluoreszenzfarbstoffe umfassen oder sind, einer der mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffe, die die Probe aufweist bzw. mit denen die Probe markiert ist, ein natürlicher (nicht hinzugefügter) Fluoreszenzfarbstoff der Probe ist, der Autofluoreszenz aufweist, d.h. dass die Probe einen der Probe hinzugefügten Fluoreszenzfarbstoff und einen natürlichen (bereits ursprünglich in der Probe vorhandenen) Autofluoreszenzfarbstoff aufweist bzw. mit diesen markiert ist.

Das Aufteilen in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten kann insbesondere bedeuten, dass jeweilige Bilddaten jeweils genau einem Farbstoff zugeordnet sind bzw. nur Informationen bzw. Strahlung bzw. Fluoreszenz von genau einem Farbstoff aufweisen. Vorstellbar ist jedoch auch, dass jeweilige Bilddaten Informationen von mehr als einem Farbstoff aufweisen. So kann beispielsweise ein Bild einer Probe in zwei Sätze von Bilddaten aufgeteilt werden, wobei ein erster Satz Informationen bzw. Strahlung bzw. Fluoreszenz von zwei Farbstoffen aufweist, während ein zweiter Satz Informationen bzw. Strahlung bzw. Fluoreszenz von genau einem Farbstoff aufweist.

Die Probe weist üblicherweise eine Struktur auf, die wiederum Teilstrukturen aufweist. So kann eine biologische Probe z.B. einen Zellkern und Zellwände als Struktur bzw. Teilstrukturen aufweisen. Der Zellkern kann in diesem Beispiel eine Teilstruktur sein. Die Zellwand bzw. die Zellwände können in diesem Beispiel eine weitere Teilstruktur sein. Teilstrukturen der Probe können zum Beispiel durch Kanten in dem Bild oder nicht-fluoreszierende Bereiche in dem Bild voneinander abgetrennt sein.

Beim Entfernen einer Teilstruktur der Probe, wobei die Teilstruktur in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten von mehr als einem Farbstoff vorhanden ist, aus den Bilddaten eines oder mehrerer Farbstoffe, kann somit beispielsweise der Zellkern einer Zelle, der (z.B. fälschlicherweise in Bilddaten von zwei Farbstoffen vorhanden ist) aus den Bilddaten eines ersten Farbstoffs entfernt werden. Folglich werden bei dem Verfahren typischerweise nicht einzelne Pixel aus Bilddaten eines Farbstoffs entfernt, sondern Teilstrukturen der Probe, d.h. Bereiche, die als zusammenhängend bzw. als zu einer Teilstruktur der Probe gehörend

erkannt werden, werden aus den Bilddaten eines Farbstoffs entfernt. Somit kann insbesondere ein strukturbasiertes Entfernen durchgeführt werden.

Dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte können insbesondere Pixel bzw. Bereiche bzw. Teilstrukturen der Probe sein, die Bilddaten eines Farbstoffs bzw. einem Farbstoff falsch zugeordnet werden bzw. wurden. Dies bedeutet insbesondere, dass Pixel bzw. Bereiche bzw. Teilstrukturen, die beispielsweise mit nur einem ersten Farbstoff markiert sind, auch in von dem maschinellen Lernsystem erzeugten aufgeteilten Bilddaten eines zweiten Farbstoffs, der sich von dem ersten Farbstoff unterscheidet, vorhanden sind. Dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte werden auch als Durchbluten oder Cross-Talk bezeichnet.

Die optische Achse des Mikroskops verläuft insbesondere entlang der Richtung, in die die Aufnahme mittels des Mikroskops getätigt wird.

Bevorzugte Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen. Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Zeichnungen von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Hierbei zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten;

Fig. 2 ein Fluoreszenzbild einer Probe vor dem Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens;

Fig. 3a, 3b nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilte Bilder des Fluoreszenzbilds aus Fig. 2 nach dem Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens; und

Fig. 4a, 4b mittels linearen Unmixing gemäß dem Stand der Technik nach
Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilte Kanäle bzw. Bilder.

Bei der nachfolgenden Beschreibung werden für gleiche und gleich wirkende Teile dieselben Bezugswerte verwendet.

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten 30-32. Fig. 2 zeigt ein Fluoreszenzbild einer Probe vor dem Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten 30-32 gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Fig. 3a, 3b zeigen nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilte Bilder des Fluoreszenzbilds aus Fig. 2 nach dem Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Im Folgenden wird eine Ausführungsform mit Fluoreszenzbildern und Fluoreszenzfarbstoffen erläutert. Die Angaben und Erläuterungen gelten jedoch gleichfalls für Bilder im Allgemeinen und Farbstoffe im Allgemeinen.

Eine Probe wird üblicherweise mit mehr als einem Fluoreszenzfarbstoff, z.B. zwei oder drei Fluoreszenzfarbstoffen, markiert. Anschließend wird ein Fluoreszenzbild bzw. Bild 20 oder werden mehrere Fluoreszenzbilder der markierten Probe mittels eines Mikroskops aufgenommen.

Die Probe kann eine biologische Probe sein, z.B. lebendige oder tote Zellen oder lebendige oder tote Lebewesen, oder eine physikalische Probe, d.h. eine unbelebte Probe, sein.

Angestrebt ist, dass das oder die Fluoreszenzbilder möglichst genau bzw. zutreffend nach Fluoreszenzfarbstoffen in Bilder bzw. Bilddaten 30-32 aufgeteilt wird bzw. werden, so dass in jedem Bild bzw. jedem Satz von Bilddaten 30-32 nur Fluoreszenz eines Fluoreszenzfarbstoffs vorhanden ist (sogenanntes Entmischen). Möglich ist jedoch auch, dass in einem Satz von Bilddaten 30-32 bzw. in einem Bild nur Fluoreszenz eines

Fluoreszenzfarbstoffs vorhanden ist und in dem anderen Satz von Bilddaten 30-32 bzw. in einem anderen Bild die Fluoreszenz z.B. von den beiden übrigen Fluoreszenzfarbstoffen vorhanden ist.

Jedoch können bei bisher bekannten Methoden zum Aufteilen eines Bilds 20 bzw. von Bildern in nach Farbstoff aufgeteilte Bilddaten 30-32 sogenannte dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte in den nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilten Bilddaten 30-32 auftreten. Ein dem falschen Farbstoff zugeordnetes Element bzw. ein optisches Artefakt ist bzw. sind Pixel bzw. eine Struktur oder Teilstruktur der Probe, die einem Satz von Bilddaten 30-32 bzw. einem Bild zugeordnet wird bzw. werden, der bzw. das nicht der dem Fluoreszenzfarbstoff entsprechende Satz bzw. Bild ist. D.h. nach dem erfolgten Aufteilen des Bilds 20 oder der Bilder 20 in Bilddaten 30-32 nach Fluoreszenzfarbstoffen treten in dem Bild für einen ersten Fluoreszenzfarbstoff Pixel von (Teil-)Strukturen der Probe auf, die nur mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Dies wird auch als sogenanntes Durchbluten zwischen den verschiedenen Bildern/Bilddaten 30-32 bzw. als sogenannter Cross-Talk zwischen den Bildern/Bilddaten 30-32 bezeichnet.

Die dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optischen Artefakte können z.B. durch zufällige Einflüsse (wie das Rauschen der Eingangsdaten bzw. der Fluoreszenzbilder) und/oder durch das nicht exakte Wissen über die Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe entstehen oder begründet sein.

Für dieses Aufteilen in Bilddaten 30-32 bzw. Sätze von Bilddaten 30-32 nach Fluoreszenzfarbstoff wird ein maschinelles Lernsystem 10 bzw. ein System zum maschinellen Lernen verwendet. Das System ist zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten 30-32 ausgebildet und umfasst ein maschinelles Lernsystem 10.

Das maschinelle Lernsystem 10 kann ein sparse dictionary Lernsystem und/oder einen Autoencoder umfassen.

Das maschinelle Lernsystem 10 kann z.B. ein neuronales Netzwerk umfassen oder sein. Insbesondere kann das maschinelle Lernsystem 10 ein deep learning System umfassen

oder sein. Auch ist es möglich, dass das maschinelle Lernsystem 10 ein convolutional neural network oder ein deep convolutional neural network umfasst oder ist.

Auch kann das maschinelle Lernsystem 10 ein mehrlagiges Perzeptron umfassen oder sein, bei dem es neben der Ausgabeschicht auch noch mindestens eine weitere Schicht verdeckter Neuronen gibt (sogenannter hidden layer). Alle Neuronen einer Schicht sind vollständig mit den Neuronen der nächsten Schicht vorwärts verknüpft (sogenanntes Feedforward-Netz).

Darüber hinaus ist auch vorstellbar, dass das maschinelle Lernsystem 10 ein oder mehrere sogenannte Generative Adversarial Networks (erzeugende gegnerische Netzwerke) umfasst oder aus diesen besteht.

Das maschinelle Lernsystem 10 wird dahingehend bzw. darauf trainiert, das Aufteilen in nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeeilte Bilddaten 30-32 von Bildern, insbesondere Fluoreszenzbildern, vorzunehmen und dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte zu entfernen bzw. das Vorhandensein von dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten zu verhindern bzw. zu unterdrücken. Hierzu wird bzw. werden die Struktur bzw. Strukturen der jeweils abgebildeten Probe berücksichtigt. Menschen können die dem falschen Farbstoff zugeordneten Elemente bzw. optischen Artefakte üblicherweise aufgrund der Kontextinformationen erkennen, z.B. wenn die identischen oder sehr ähnlichen Strukturen oder Teilstrukturen in unterschiedlicher Stärke bzw. Konzentration (z.B. Helligkeit) in mehr als einem Kanal, z.B. in in Bezug auf die Wellenlänge zueinander benachbarten Kanälen, auftreten.

Durch entsprechendes Training wird das maschinelle Lernsystem 10 darauf trainiert, auf Grundlage dieser Strukturen das Aufteilen eines oder mehrere Fluoreszenzbilder 20 in nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilte bzw. getrennte Bilddaten 30-32 durchzuführen, um Bilddaten 30-32 bzw. Bilder mit möglichst wenigen oder keinen dem falschen Farbstoff zugeordneten Elemente bzw. Artefakten (d.h. fehlzugeordneten Pixeln oder Strukturen) zu erzeugen. Das maschinelle Lernsystem 10 erkennt mindestens eine Teilstruktur der Probe, die in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten 30-32 von mehr als einem Farbstoff vorhanden ist, als dem falschen Farbstoff zugeordnetes Elementes bzw. optisches Artefakt und entfernt die jeweilige Teilstruktur bzw. das oder die dem falschen Farbstoff

zugeordneten Elemente bzw. das optische Artefakt aus den Bilddaten 30-32 eines oder mehrerer Farbstoffe bzw. verhindert das Auftreten bzw. Vorhandensein des dem falschen Farbstoff zugeordneten Elements bzw. optischen Artefakts in den ausgegebenen Bilddaten 30-32. Somit wird das Auftreten bzw. Vorhandensein von dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten in den Bilddaten 30-32 verhindert bzw. vermindert und folglich sinkt die Zahl der dem falschen Farbstoff zugeordneten Elemente bzw. optischen Artefakte in den erzeugten Bilddaten 30-32.

Die Eingabedaten, die in das maschinelle Lernsystem 10 eingegeben werden, können einen Stapel bzw. ein Bündel von Fluoreszenzbildern umfassen, welcher bzw. welches beliebig viele Kanäle beinhaltet.

Die Fluoreszenzbilder können Rohdaten, d.h. unbearbeitete Fluoreszenzbilder sein, oder aber als bereits gespeicherte/verrechnete Fluoreszenzbilder sein, d.h. als bereits bearbeitete Fluoreszenzbilder vorliegen. Die Fluoreszenzbilder, die in das maschinelle Lernsystem 10 als Eingabe eingegeben werden, können Single-Track-, Multi-Track- oder Lambda-Stack-Aufnahmen sein. Bei Multi-Track-Aufnahmen werden mehrere Aufnahmen bzw. Bilder 20 derselben Probe mit unterschiedlichen Einstellungen des Lasers und/oder des Detektors erstellt. Ein Lambda-Stack umfasst einen Stapel oder Satz von Bildern, die jeweils einen bestimmten Wellenlängenbereich umfassen. Die Wellenlängenbereiche eines Lambda-Stacks sind üblicherweise zueinander disjunkt und grenzen unmittelbar aneinander an.

Die Anzahl der Kanäle ist bei unbearbeiteten Fluoreszenzbildern vom Aufnahmemodus der Bilder 20 abhängig. Bei bereits bearbeiteten bzw. verrechneten Daten ist die Anzahl der Kanäle von der Bearbeitung bzw. Verrechnung der Bilder 20 bzw. Aufnahmen abhängig. Beispielsweise ist es möglich, dass die Fluoreszenzbilder bzw. die Eingabedaten des maschinellen Lernsystems 10 bereits Ergebnis eines linearen Unmixing, wie es aus dem Stand der Technik bekannt ist, sind. Durch das maschinelle Lernsystem 10 bzw. das erfindungsgemäße Verfahren wird die Zahl der dem falschen Farbstoff zugeordneten Elemente bzw. optischen Artefakte, die nach dem linearen Unmixing in den Bilddaten 30-32 bzw. Bildern noch vorhanden sind, verringert. Wenn die Eingabedaten bereits mittels linearem Unmixing nach Farbstoffen getrennte Kanäle sind, so kann die Anzahl an Kanälen der Eingabedaten und/oder Ausgabedaten des Verfahrens gleich der Anzahl an für die Markierung der Probe verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sein.

Die Anzahl an Fluoreszenzbildern, die als Eingabe des maschinellen Lernsystems 10 verwendet werden, kann abhängig von der Art der Fluoreszenzbilder unterschiedlich sein. Die Fluoreszenzbilder können unbearbeitete Fluoreszenzbilder sein, wobei die Fluoreszenzbilder mittels Nutzung eines Detektorarrays erstellt werden (hierbei ist die Anzahl an Fluoreszenzbildern gleich der Anzahl an Detektorfenstern bzw. gleich der Anzahl an Kanälen des Detektors). Alternativ können die Fluoreszenzbilder Lambda-Stack-Aufnahmen sein (hierbei ist die Anzahl an Fluoreszenzbildern gleich der Anzahl an definierten Bändern des Lambda-Stacks). Weiter alternativ können die Fluoreszenzbilder Aufnahmen mit frei definierten Bandbreiten im Multi- oder Single-Track-Modus sein (hierbei ist die Anzahl an Fluoreszenzbildern typischerweise gleich der Anzahl an verwendeten Farbstoffen). Auch ist es vorstellbar, dass als Eingabe des maschinellen Lernsystems 10 ein einziges Fluoreszenzbild verwendet wird.

Neben den Fluoreszenzbildern können die Eingabedaten des maschinellen Lernsystems 10 folgende weitere Informationen enthalten, die vom maschinellen Lernsystem 10 berücksichtigt werden:

- die im Fluoreszenzbild 20 vorhandenen Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe,

und/oder
- eine Spektrendatenbank der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, welche für das Schätzen und Abgleichen der vorhandenen Spektren dienen kann,

und/oder
- Einstellungen bezüglich der Aufnahme der Fluoreszenzbilder, wie z.B. Laser-Einstellungen, Detektor-Einstellungen, Filtereinstellungen, Smart-Setup-Einstellungen und/oder Vorhersagen zum Cross-Talk bzw. zu den dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten.

Die Ausgabedaten des Verfahrens bzw. des maschinellen Lernsystems 10 enthalten üblicherweise nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilte Bilddaten 30-32 bzw. Bilder. Die Bilddaten 30-32 können selbst Bilder sein. Vorstellbar ist jedoch auch, dass das Verfahren bzw. das maschinelle Lernsystem 10 lediglich Daten bzw. Bilddaten 30-32 ausgibt, mittels

denen nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilte Bilder berechnet bzw. erstellt werden können. Beispielsweise können die Daten bzw. Bilddaten ein Koeffizientenarray umfassen oder sein, welches für ein nachfolgendes lineares Unmixing zum Aufteilen des oder der Fluoreszenzbilder nach Farbstoffen verwendet wird. Dies bedeutet, dass das maschinelle Lernsystem 10 die Koeffizienten für das lineare Unmixing derart errechnet bzw. bestimmt, dass die Anzahl an dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten in den nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilten Bildern nach einem linearen Unmixing mit diesen Koeffizienten gering ist.

Auch ist es möglich, dass das Verfahren bzw. das maschinelle Lernsystem 10 sogenannte Differenzbilder ausgibt und/oder hierauf trainiert wird. Wenn die Differenzbilder jeweils von den entsprechenden mittels bisher bekannter Verfahren nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilten Bildern bzw. Kanälen abgezogen werden, so ergeben sich Bilder bzw. Bilddaten 30-32, in denen weniger oder sogar gar keine dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optischen Artefakte mehr vorhanden sind. Dies bedeutet, dass für jeden Eingabekanal bzw. jedes Fluoreszenzbild, das in das maschinelle Lernsystem 10 eingegeben wird, von dem maschinellen Lernsystem 10 ein korrespondierendes Differenzbild erzeugt wird, wobei durch den Abzug bzw. Subtraktion des Differenzbilds von dem korrespondierenden Fluoreszenzbild Fluoreszenzbilder (Ausgangsbilder) erzeugt werden, die weniger bis keine dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optischen Artefakte enthalten bzw. aufweisen.

Die Anzahl der Kanäle, die von dem Verfahren bzw. dem maschinellen Lernsystem 10 ausgegeben werden, kann beliebig sein. So ist es vorstellbar, dass die Bilder bzw. Bilddaten 30-32 nicht nur nach Fluoreszenzfarbstoffen aufgeteilt sind bzw. werden, sondern zusätzlich noch nach verschiedenen Bereichen oder Objekten der Fluoreszenzbilder aufgeteilt sind bzw. werden. Somit gibt es beispielsweise bei drei Fluoreszenzfarbstoffen und drei Objekten neun Kanäle bzw. neun Sätze von Bilddaten 30-32 als Ausgabe des Verfahrens bzw. des maschinellen Lernsystems 10. Auch ist es möglich, dass das Fluoreszenzbild in zwei Sätze von Bilddaten 30-32 hinsichtlich der drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe aufgeteilt wird (nämlich einmal ein Fluoreszenzfarbstoff in einem Satz von Bilddaten bzw. in einem Bild und zwei Fluoreszenzfarbstoffe im anderen Satz von Bilddaten bzw. in einem anderen Bild), so dass sich bei drei Objekten sechs Ausgabekanäle bzw. Bilder ($= 2 * 3$) ergeben.

Vorzugsweise entspricht die Anzahl der Kanäle, die von dem Verfahren bzw. dem maschinellen Lernsystem 10 ausgegeben werden, der Anzahl der zur Markierung der Probe verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Auch ist es möglich, dass die Anzahl der Kanäle der Anzahl der Fluoreszenzbilder, die als Eingabe verwendet werden, entspricht.

In den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten 30-32 kann jeweils die absolute Konzentration des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff bestimmt und angezeigt bzw. ausgegeben werden, wenn eine Kalibrierung durchgeführt wurde, d.h. wenn bestimmt wurde, welcher Helligkeitswert welcher Konzentration jeweils entspricht.

Darüber hinaus können Zusatzinformationen von dem Verfahren bzw. dem maschinellen Lernsystem 10 zusätzlich zu den Bilddaten 30-32 bzw. Kanälen ausgegeben werden. Dies können beispielsweise Informationen sein, die für eine Weiterverarbeitung der Kanäle bzw. Bilddaten 30-32 oder für Darstellungszwecke für den Betrachter der ausgegebene Kanäle bzw. Bilddaten 30-32 hilfreich sein können. Insbesondere können die Zusatzinformationen die selektierten Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (falls eine Spektrendatenbank Teil der Eingabe war), die geschätzten Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (falls die Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe nicht Teil der Eingabe waren) und/oder die verfeinerten bzw. präziser bestimmten Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe (falls die Spektren und/oder eine Spektrendatenbank Teil der Eingabe war) umfassen oder sein.

Falls eine Spektrendatenbank vorhanden ist bzw. Teil der Eingabe war, können außerdem die Kennzeichnungen bzw. Namen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ausgegeben werden. Eine Spektrendatenbank gibt an, welche Spektren bzw. Wellenlängen die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe jeweils aufweisen.

Wenn die Konzentrationen der Fluoreszenzfarbstoffe von dem Verfahren bzw. dem maschinellen Lernsystem 10 geschätzt werden, kann die Konfidenz für jedes Pixel bzw. jede Teilstruktur von dem Verfahren bzw. dem maschinellen Lernsystem 10 ausgegeben bzw. angegeben werden. Die Konfidenz gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit das jeweilige Pixel dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff zutreffend zugeordnet wurde.

Auch ist es möglich, dass das maschinelle Lernsystem 10 bzw. das Verfahren Art, Größe, Anzahl etc. der mit den Fluoreszenzfarbstoffen markierten Objekte in der Probe bestimmt und ausgibt. Beispielsweise kann die Anzahl der markierten Zellen von dem Verfahren bzw. maschinellen Lernsystem 10 bestimmt und ausgegeben werden.

Das Aufteilen der Fluoreszenzbilder 20 in Sätze von Bilddaten 30-32 bzw. Kanäle mittels des maschinellen Lernsystems 10 kann auf Grundlage der unbearbeiteten Fluoreszenzbilder und/oder auf Grundlage von bereits bearbeiteten bzw. bereits nach Fluoreszenzfarbstoffen getrennten Kanäle bzw. Bilder stattfinden.

Zunächst wird im Folgenden ein Verbessern von bereits mit Verfahren nach dem Stand der Technik bearbeiten Fluoreszenzbildern erläutert.

Die Fluoreszenzbilder 20, die als Eingabe für das Verfahren bzw. das maschinelle Lernsystem 10 dienen, können Fluoreszenzbilder (z.B. Einzelbilder und/oder Detektor-Stack-Bilder) sein, die bereits mittels eines Denoising-Algorithmus' entrauscht wurden.

Es ist möglich, dass die Bilddaten, die von dem maschinellen Lernsystem ausgegeben werden, mittels des maschinellen Lernsystems zumindest teilweise entrauscht wurden.

Auch ist es möglich, dass, wenn die Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe bereits vorliegen (aus einer Datenbank oder aufgrund einer Schätzung), die Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe genauer bestimmt werden, d.h. dass die Spektren bzw. die Kanäle der Spektren den tatsächlichen Werten der Spektren bzw. Grenzen der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe angenähert und/oder der vorliegenden Probe angepasst werden. Liegen die Spektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe nicht vor, so ist möglich anhand der Fluoreszenzbilder, die als Eingabe in das Verfahren bzw. das maschinelle Lernsystem 10 eingehen, die Spektren der Fluoreszenzfarbstoffe direkt zu bestimmen. Hierzu wird das maschinelle Lernsystem 10 derart trainiert, dass dieses eine Abbildung der Eingabedaten bzw. Fluoreszenzbilder auf die Spektren lernt.

Nach einem durchgeführten linearen oder nicht-linearen Unmixing können dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte (sogenanntes Durchbluten von einem Kanal bzw. von Bilddaten 30-32 eines Fluoreszenzfarbstoffs in Bilddaten 30-32 eines anderen Fluoreszenzfarbstoffs) mittels des Verfahrens bzw. des maschinellen Lernsystems 10 auf Basis der in der oder den Fluoreszenzbildern vorhandenen Strukturen berichtigt bzw. beseitigt werden. Der Vorteil dieser strukturbasierten Analyse bzw. Verarbeitung ist u.a., dass sich ein Durchbluten anhand von identischen Strukturen an der räumlich gleichen Stelle in meist zueinander unmittelbar benachbarten Kanälen der Ausgabe bzw. Bilddaten 30-32 leicht feststellen lässt. Ausschlaggebend ist hierbei nicht die Art oder der Typ der Struktur an sich, sondern die Position und Ausprägung in den verschiedenen Kanälen bzw. Bilddaten 30-32. Dieser Zusammenhang kann mittels maschinellern Lernen anhand einer repräsentativen Trainingsstichprobe gelernt werden, wobei es verschiedene Möglichkeiten der Abbildung von Eingabe- auf Ausgabedaten gibt.

Bei einer ersten Möglichkeit werden die Eingabedaten bzw. Fluoreszenzbilder mittels eines sogenannten Patch-based Verfahrens analysiert bzw. bestimmt, wobei bei dieser Art der Analyse ein Bild anhand von Bildausschnitten des Bilds analysiert wird bzw. Bildausschnitt für Bildausschnitt verarbeitet wird. Hierbei werden die aus dem linearen oder nicht-linearen Unmixing resultierenden Eingabedaten bzw. Bilder durch das maschinelle Lernsystem 10 in Kacheln (Patches) aufgeteilt. Der für das maschinelle Lernsystem 10 zur Verfügung stehende Kontext, also die sichtbaren Strukturen, ist dabei durch die Größe des Patches beschränkt. Jeder Eingabe-Patch des maschinellen Lernsystems 10 wird auf einen Ausgabe-Patch abgebildet, wobei ein Durchbluten zwischen den Kanälen bzw. Bilddaten 30-32 der verschiedenen Farbstoffe durch das maschinelle Lernsystem 10 unterdrückt bzw. verhindert wird. Abschließend werden die Ausgabe-Patches zu einem Gesamtbild bzw. einem Kanal zusammengesetzt. Dies bedeutet, dass dem maschinellen Lernsystem 10 nacheinander Bereiche bzw. Patches des Gesamtfluoreszenzbilds eingegeben werden und die Bereiche bzw. Patches nach dem Aufteilen nach Farbstoffen wieder zu einem Gesamtfluoreszenzbild zusammengesetzt werden.

Eine zweite Möglichkeit umfasst eine sogenannte Bild-zu-Bild-Transformation, wobei das maschinelle Lernsystem 10 eine Abbildung von dem Gesamtfluoreszenzbild auf Gesamtbilder bzw. Bilddaten 30-32 des Gesamtbilds lernt bzw. hierauf trainiert wird. Das Vorgehen ist größtenteils identisch zu dem zuvor beschriebenen Patch-based Verfahren, wobei jedoch durch die Verwendung des Gesamtbildes ein wesentlich größerer Kontext durch das maschinelle Lernsystem 10 berücksichtigt werden kann. Das maschinelle

Lernsystem 10 gibt nach Farbstoffen aufgeteilte Kanäle bzw. Bilder bzw. Bilddaten 30-32 des Gesamtbilds aus.

Darüber hinaus kann es vorteilhaft sein, das maschinelle Lernsystem 10 nicht auf das Ausgeben der nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilder oder Bilddaten 30-32 selbst zu trainieren, sondern auf eine Korrektur bzw. auf eine Differenz zwischen den bereits vorhandenen Bilddaten 30-32 und den um dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte bereinigten Bilddaten 30-32 zu trainieren und solche Bilddaten 30-32 auszugeben. Dies bedeutet zum Beispiel, dass für jeden Kanal der Ausgabe bzw. jeden Satz von Bilddaten bzw. Bildern eines linearen Unmixings gemäß des Stands der Technik mittels des maschinellen Lernsystems 10 ein Differenzbild geschätzt bzw. erzeugt wird, um welches der jeweilige Kanal der Ausgabe des linearen Unmixing korrigiert werden muss, um zu Bilddaten 30-32 zu gelangen, bei denen dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte entfernt wurden bzw. nicht mehr vorhanden sind bzw. nicht mehr auftreten. Das Differenzbild gibt jeweils die Differenz bzw. den Unterschied zwischen der Ausgabe des linearen Unmixings und der durch das maschinelle Lernsystem 10 um dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte bereinigte Bilddaten 30-32 bzw. Bilder an. Der Vorteil hiervon ist, dass solche Differenzbilder vom Menschen beim Training des maschinellen Lernsystems 10 intuitiver interpretiert werden können und somit dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte leichter erkannt werden können. Zudem ist für den Menschen die Korrektur durch das maschinelle Lernsystem 10 leichter nachvollziehbar, so dass dies eine höhere Akzeptanz aufweist. Zudem hat sich gezeigt, dass das Training eines maschinellen Lernsystems 10 auf Differenzbilder bzw. zum Erzeugen von Differenzbildern (sogenanntes Residual Learning) technisch sehr einfach ist und sehr gute Ergebnisse liefert, d.h. hierdurch die Zahl an dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten stark verringert wird, evtl. sogar stärker verringert wird als bei einem Training des maschinellen Lernsystems 10 zum direkten Ausgeben von Bilddaten 30-32 mit wenigen dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten.

Nun wird nachfolgend ein Verbessern von unbearbeiteten Fluoreszenzbildern mittels des Verfahrens bzw. des maschinellen Lernens beschrieben.

Hierbei wird das Aufteilen in nach Fluoreszenzfarbstoff geordnete Bilddaten 30-32 vollständig aus den Eingabedaten gelernt. Hierbei wird das maschinelle Lernsystem 10

derart trainiert, dass direkt vom Eingabestack bzw. von den Fluoreszenzbildern auf den Ausgabestack bzw. die Bilddaten 30-32 bzw. Bilder abgebildet wird. Voraussetzung hierbei ist eine hinreichend große Datenbasis zum Trainieren des maschinellen Lernsystems 10, wobei die Datenbasis im Wesentlichen alle zu erwartenden Variationen bzw. Möglichkeiten abdeckt. Dies wird durch eine Simulation erreicht, bei welcher eine Vielzahl von Aufnahmen, bei denen die Probe jeweils nur mit einem Farbstoff markiert bzw. gefärbt wurde, zu einem Eingabestack oder zu einem einzelnen Fluoreszenzbild vermischt bzw. addiert werden und dies jeweils als Eingabe für das maschinelle Lernsystem 10 verwendet wird. Die Aufnahmen, bei denen die Probe jeweils nur mit einem Farbstoff markiert bzw. gefärbt wurde, werden als Referenzbilder verwendet, die von dem maschinellen Lernsystem 10 als Bilddaten 30-32 ausgegeben werden sollen. Es ist auch möglich verschiedene Ausgangsdaten bzw. Kanäle, wie beispielsweise Single- und Multitrackdaten oder auch Lambdastacks als Eingabedaten des maschinellen Lernsystems 10 zu simulieren.

Zudem können die Eingabedaten bzw. der Eingabestack künstlich verrauscht werden, um die Eingabedaten echten Fluoreszenzbildern bzw. echten Aufnahmebedingungen noch stärker anzunähern. Gerade im Falle von Singletrackaufnahmen oder Lambdastacks liegt oft ein niedrigeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis, d.h. ein starkes Rauschen, vor. Als ground-truth Daten, d.h. als anzustrebende Ausgabe des maschinellen Lernsystems 10, auf das trainiert wird, dienen jene Einzelbilder, welche zur Erzeugen der Eingabedaten bzw. des Eingabestacks miteinander vermischt bzw. addiert wurden. Hierbei wird eine Abbildung von Bildstapel auf Bildstapel durchgeführt.

Ein weitere Möglichkeit neben dem Verbessern von bereits mit Verfahren nach dem Stand der Technik bearbeiten Fluoreszenzbildern sowie dem Verbessern von unbearbeiteten Fluoreszenzbildern mittels des Verfahrens bzw. des maschinellen Lernens ist, dass das Unmixing, d.h. das Entmischen bzw. Aufteilen des oder der in das maschinelle Lernsystem 10 eingegebenen Bilder nach Farbstoffen, implizit gelernt wird, d.h. alle notwendigen Parameter, welche beim klassischen linearen Unmixing geschätzt oder vorgegeben werden, können mit Hilfe des maschinellen Lernsystems 10 prädiziert bzw. bestimmt werden.

So können zum Beispiel die Koeffizienten (A) zum Lösen des Gleichungssystems des linearen Unmixings, die Anzahl an Spektren, die Spektren selbst oder eine Kombination dieser durch das maschinelle Lernsystem 10 ausgegeben werden. Generell wird dabei eine Abbildung von einem Eingabestack bzw. von mehreren Fluoreszenzbildern auf eine

Zwischenrepräsentation durchgeführt, d.h. es werden Bilddaten 30-32 bzw. Daten zum Aufteilen der Fluoreszenzbilder in Kanäle durch das maschinelle Lernsystem 10 erzeugt. Mittels der Daten und z.B. dem linearen Unmixing können die in das maschinelle Lernsystem 10 eingegebenen Fluoreszenzbilder derart in nach Farbstoffen aufgeteilte bzw. getrennte Bilder bzw. Bilddaten 30-32 aufgeteilt werden, dass diese wenig bis keine dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optischen Artefakte aufweisen. Darüber hinaus können auch hier Zusatzinformationen in das maschinelle Lernsystem 10 eingegeben werden, wie beispielsweise Informationen über die Spektren der verwendeten Farbstoffe.

Es ist auch möglich, dass Zusatzinformation (Bezeichnung der verwendeten Farbstoffe, Anzahl der verwendeten Farbstoffe) über die Spektren und/oder anhand der auftretenden Strukturen im Fluoreszenzbild, das in das maschinelle Lernsystem 10 eingegeben wird, durch das maschinelle Lernsystem 10 geschätzt bzw. bestimmt werden. So weisen beispielsweise Zellkern-Strukturen bei einer biologischen Probe auf den häufig verwendeten Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) hin, so dass beim Erkennen von Zellkern-Strukturen das maschinelle Lernsystem 10 davon ausgehen kann, dass dieser Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde.

Auch können Fluoreszenzbilder in Form eines Z-Stacks in das maschinelle Lernsystem 10 eingegeben werden, d.h. Fluoreszenzbilder, die von derselben Probe entlang der optischen Achse des Mikroskops zueinander versetzt aufgenommen wurden, und diese Bilder mittels des Verfahrens bzw. des maschinellen Lernsystems 10 in Bilddaten 30-32 bzw. Bilder nach Farbstoffen getrennt aufgeteilt werden. Hierbei kann die Struktur der Probe und/oder ähnliche bzw. identische Strukturen in den Kanälen bzw. Bildern der Ausgabe durch das maschinelle Lernsystem 10 erkannt und dadurch dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte entfernt werden bzw. das Auftreten von dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten verhindert werden.

Darüber hinaus können zeitlich zueinander versetzte Aufnahmen als Fluoreszenzbilder bzw. Eingabe des Verfahrens bzw. des maschinellen Lernsystems 10 verwendet werden. Hierbei kann die Struktur der Probe und/oder ähnliche bzw. identische Strukturen in den Kanälen der Ausgabe durch das maschinelle Lernsystem 10 erkannt und dadurch Artefakte entfernt werden bzw. das Auftreten von dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten verhindert bzw. vermindert werden.

Das maschinelle Lernsystem 10 kann jeweils an die Probe bzw. Probenart (z.B. biologische Probe oder physikalische Probe etc.) angepasst werden oder hierauf spezifisch trainiert werden. Vorstellbar ist jedoch auch, dass das maschinelle Lernsystem 10 unabhängig von der Probe nicht aktiv verändert wird.

Die Kanäle bzw. Sätze von Bilddaten 30-32, die von dem maschinellen Lernsystem 10 ausgegeben werden, kann gleich der Anzahl der Fluoreszenzbilder der Eingabe bzw. der Eingabekanäle sein. Die Anzahl der Ausgabekanäle des maschinellen Lernsystems 10 kann auch der Anzahl der Objekte, die die Probe aufweist, entsprechen.

Die Unterscheidung, ob ein bestimmtes Element bzw. eine Struktur bzw. ein Pixel in dem Fluoreszenzbild ein dem falschen Farbstoff zugeordnetes Element bzw. optisches Artefakt ist oder nicht, basiert auf Strukturinformationen bzw. erkannten Strukturen oder Teilstrukturen der Probe im Fluoreszenzbild, d.h. dass das gesamte Fluoreszenzbild als Kontext in das Aufteilen in Bilddaten 30-32 bzw. Bilder nach Fluoreszenzfarbstoff eingeht.

Das maschinelle Lernsystem 10 kann auf einem handelsüblichen Computer bzw. Rechner vorhanden sein bzw. implementiert werden. Auch ist es vorstellbar, dass das maschinelle Lernsystem 10 auf einem speziell für das maschinelle Lernsystem 10 konzipiertem Computer bzw. Rechner implementiert wird. Insbesondere können die Prozessoren einer Grafikkarte oder mehrerer Grafikkarten für die notwendigen Berechnungen des maschinellen Lernsystems 10 bzw. des Verfahrens verwendet werden.

Das Verfahren zum Trainieren des maschinellen Lernsystems 10 kann beispielsweise folgendermaßen durchgeführt. Dem maschinellen Lernsystem 10 wird ein Fluoreszenzbild eingegeben. Das maschinelle Lernsystem 10 teilt das Fluoreszenzbild in nach Fluoreszenzfarbstoffen geordnete Bilddaten 30-32 bzw. Bilder auf. Zudem kennzeichnet bzw. hat ein Mensch in den jeweiligen Kanälen, die Strukturen bzw. Bereiche, die dem falschen Farbstoff zugeordnete Elemente bzw. optische Artefakte darstellen (sogenanntes Durchbluten), d.h. die Strukturen bzw. Bereiche, die dem jeweiligen Bild bzw. Kanal fehlzugeordnet wurden, gekennzeichnet bzw. entfernt. Diese von dem falschen Farbstoff zugeordneten Elementen bzw. optischen Artefakten befreiten Bilddaten 30-32 bzw. Bilder werden dem maschinellen Lernsystem 10 als Zielausgabe oder Sollausgabe eingegeben. Hieraus lernt das maschinelle Lernsystem 10, solche dem falschen Farbstoff zugeordnete

Elemente bzw. optischen Artefakte in Zukunft zu vermeiden. Auf diese Weise lernt das maschinelle Lernsystem 10 beaufsichtigt.

Eine weitere Möglichkeit das maschinelle Lernsystem 10 zu trainieren ist, Bilder, in denen jeweils dieselbe Probe oder zueinander identische oder ähnliche Proben jeweils nur mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist bzw. sind, als Trainingsdaten zu verwenden. Diese Bilder werden miteinander gemischt bzw. addiert und das Ergebnis wird als Fluoreszenzbild oder Fluoreszenzbilder als Eingabe des maschinellen Lernsystems 10 verwendet. Da die ursprünglichen nach Fluoreszenzfarbstoff getrennten Bilder vorliegen, kann das maschinelle Lernsystem 10 ohne Aufsicht und menschliches Zutun selbst erkennen, welche Strukturen bzw. Bereiche bzw. Pixel des Ergebnisses bzw. der ausgegebenen Bilddaten 30-32 des maschinellen Lernsystems 10 ein dem falschen Farbstoff zugeordnetes Element bzw. optisches Artefakt darstellen und welche nicht. Hierdurch kann das maschinelle Lernsystem 10 sehr schnell trainiert werden.

Die Fluoreszenzbilder können auch Bilder sein, die mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen wurden. Hierbei wird auch das sogenannte Second and Third Harmonic Generation (d.h. Frequenzverdopplung und/oder Frequenzverdreifachung) berücksichtigt.

Das maschinelle Lernsystem 10 kann ein neuronales Netzwerk, insbesondere ein sogenanntes deep neuronales Netzwerk, umfassen. Das neuronale Netzwerk umfasst beispielsweise mehr als drei Schichten, so dass mehr als ein sogenannter hidden layer (versteckte Schicht) vorhanden ist.

Das maschinelle Lernsystem 10 kann ein convolutional neural Network (CNN) umfassen oder sein. Hierbei umfasst das maschinelle Lernsystem 10 einen convolutional layer, der aus einer zweidimensionalen oder dreidimensionalen Matrix bestehend aus Pixel besteht. Über eine diskrete Faltung wird die Aktivität jeden Neurons dieser Ebene berechnet. Auf den convolutional layer folgend ist eine sogenannte pooling layer vorhanden, in der überflüssige Informationen verworfen werden. Nachfolgend können wieder ein convolutional layer und darauf ein pooling layer etc. folgen. Schließlich folgt auf den letzten pooling layer ein fully-connected layer. Die Neuronen des fully-connected layers entspricht üblicherweise der Anzahl an Kanälen, in die das Fluoreszenzbild aufgeteilt werden soll.

Lineares Unmixing wird beispielsweise in dem Artikel "Clearing up the signal: spectral imaging and linear unmixing in fluorescence microscopy" beschrieben, der in der Zeitschrift "Methods in Molecular Biology" im Jahr 2014, 1075:129-48 (doi: 10.1007/978-1-60761-847-8_5) veröffentlicht wurde.

Bei linearem Unmixing wird z.B. davon ausgegangen, dass ein Pixel als linear gemischt kategorisiert wird, wenn das gemessene Spektrum ($S(\lambda)$) dem Gewicht (A) jedes individuellen Fluoreszenzfarbstoffreferenzspektrums ($R(\lambda)$) entspricht):

$$S(\lambda) = A_1 \cdot R_1(\lambda) + A_2 \cdot R_2(\lambda) + A_3 \cdot R_3(\lambda) \dots A_i \cdot R_i(\lambda)$$

Wobei dies allgemeiner ausgedrückt werden kann als:

$$S(\lambda) = \sum A_i \cdot R_i(\lambda) \text{ or } S = A \cdot R$$

In diesen Gleichungen wird das Signal in jedem Pixel (S) während der Aufnahme des Lambda-Stacks gemessen und das Referenzspektrum der bekannten Fluoreszenzfarbstoff wird üblicherweise unabhängig voneinander in Proben, die jeweils nur mit einem Farbstoff markiert sind unter identischen Instrumenteneinstellungen, gemessen. Durch Algebra können die Beiträge der verschiedenen Farbstoffe (A_i) durch Berechnung ihres Beitrags zu jedem Punkt in dem gemessenen Spektrum bestimmt werden. Beispielsweise kann dies durch Minimieren des Quadrats zwischen den gemessenen und den berechneten Spektren durch Anwenden der folgenden Differentialgleichungen bestimmt werden:

$$[\partial \sum_j \{S(\lambda_j) - \sum_i A_i \cdot R_i(\lambda_j)\}^2] / \partial A_i = 0$$

In dieser Gleichung, stellt j die Anzahl an Detektionskanälen dar und i entspricht der Anzahl an Farbstoffen.

Es ist auch möglich, dass das Convolutional Neural Network (CNN) ein nicht-verjüngendes Netz umfasst oder ist.

Bezugszeichenliste

10	maschinelles Lernsystem
20	Bild der Probe
30, 31, 32, 30', 31'	nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten

Ansprüche

1. Verfahren zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder (20) einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten (30-32), wobei die Probe mindestens zwei unterschiedliche Farbstoffe, insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe, aufweist, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
Bereitstellen des einen oder der mehreren Bilder (20) der Probe;
Eingeben des einen oder der mehreren Bilder (20) in ein maschinelles Lernsystem (10); und
Erzeugen der nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) aus dem oder den Bildern (20) mittels des maschinellen Lernsystems (10),
wobei das maschinelle Lernsystem (10) mindestens eine Teilstruktur der Probe, die in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) von mehr als einem Farbstoff vorhanden ist, aus den Bilddaten (30-32) eines oder mehrerer Farbstoffe entfernt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, ferner folgende Schritte umfassend:
Eingeben von Referenzbildern in das maschinelle Lernsystem (10); und
Vergleichen der mittels des maschinellen Lernsystems (10) nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) der Referenzbilder mit nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilddaten (30-32) der Referenzbilder zum Trainieren des maschinellen Lernsystems (10) zum verbesserten Aufteilen des einen oder der mehreren Bilder (20) der Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten (30-32).
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei
das maschinelle Lernsystem (10) ein neuronales Netzwerk, insbesondere ein deep learning System und/oder ein Convolutional Neural Network, umfasst oder ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das oder die Bilder (20) vor dem Eingeben in das maschinelle Lernsystem (10) einem linearen oder nicht-linearen Unmixing und/oder einem Entrauschen unterzogen werden.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Entfernen von Teilstrukturen der Probe auf Grundlage der Struktur der Probe durchgeführt wird, wobei insbesondere optische Artefakte in den Bilddaten (30-32)

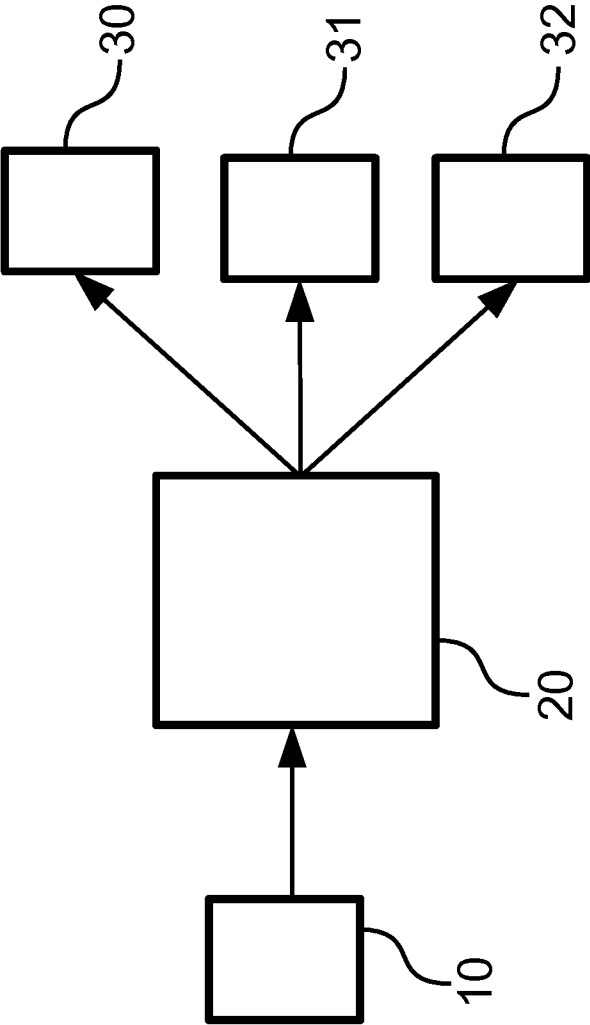
anhand von identischen und/oder ähnlichen Teilstrukturen in den Bilddaten (30-32) verschiedener Farbstoffe bestimmt werden.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei neben dem einen oder mehreren Bildern (20) Spektren der verwendeten Farbstoffe, eine Spektrendatenbank zum Schätzen und/oder Abgleichen der vorhandenen Spektren der Farbstoffe in dem einen oder mehreren Bildern (20), Aufnahmeeinstellungen und/oder Filtereinstellungen des einen oder der mehreren Bilder (20), Detektoreinstellungen des einen oder der mehreren Bilder (20) und/oder Vorhersagen zum Cross-Talk zwischen den verschiedenen nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) zusätzlich in das maschinelle Lernsystem (10) eingegeben werden.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bilddaten (30-32) Ausgangsbilder umfassen, wobei insbesondere jedes Ausgangsbild jeweils einen Farbstoff des oder der eingegebenen Bilder (20) zeigt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das maschinelle Lernsystem (10) ein Koeffizientenarray für ein lineares Unmixing erzeugt, wobei mittels des linearen Unmixing auf Basis des Koeffizientenarray das eine oder die mehreren Bilder (20) nach Farbstoffen aufgeteilt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das maschinelle Lernsystem (10) aus den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) ein oder mehrere Differenzbilder erzeugt, wobei bereits nach Farbstoffen vortrennte Bilder minus des jeweiligen erzeugten dazugehörigen Differenzbildes nach Farbstoffen getrennte Ausgangsbilder erzeugen.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mehreren Bilder (20) zeitlich zueinander versetzte Aufnahmen derselben Probe und/oder entlang einer optischen Achse eines Mikroskops, mit dem die Bilder (20) aufgenommen wurden, zueinander versetzte Aufnahmen derselben Probe umfassen oder sind.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das maschinelle Lernsystem (10) zusätzlich die Anzahl der zur Markierung der Probe verwendeten Farbstoffe bestimmt oder schätzt und/oder die zur Markierung der Probe verwendeten Farbstoffe identifiziert.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das maschinelle Lernsystem (10) ferner
für jedes Pixel der ausgegebenen Bilddaten (30-32) einen Konfidenzwert bestimmt,
der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass dieses Pixel den dem Farbstoff
entsprechenden zutreffenden Bilddaten (30-32) zugeordnet wurde
und/oder
die absolute Konzentration des jeweiligen Farbstoffs in den jeweiligen Bilddaten (30-32) bestimmt
und/oder
die Anzahl der Objekte in der Probe bestimmt.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das maschinelle Lernsystem (10) mittels erster Trainingsaufnahmen trainiert wird,
wobei die ersten Trainingsaufnahmen Aufnahmen von jeweils nur mit einem Farbstoff
markierten Proben umfassen,
und/oder
mittels zweiter Trainingsaufnahmen trainiert wird, wobei die zweiten
Trainingsaufnahmen zusammengesetzte Aufnahmen von bereits jeweils nach
Farbstoff zutreffend aufgeteilten Bilddaten (30-32) umfassen.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-13, wobei
die nach Farbstoffen zutreffend aufgeteilten Bilddaten (30-32) simulierte Bilddaten
umfassen oder sind, insbesondere mittels eines physikalischen Modells erzeugte
simulierte Bilddaten umfassen oder sind, wobei vorzugsweise das physikalische
Modell ein physikalisches Modell einer Aufnahmeoptik umfasst, und/oder die
Referenzbilder mittels eines physikalischen Modells aus den nach Farbstoffen
zutreffend aufgeteilten Bilddaten (30-32) erzeugt werden.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das maschinelle Lernsystem (10) Spektren der Farbstoffe bestimmt.

16. Computerprogrammprodukt, das von einem Prozessor eines Computers lesbare Instruktionen aufweist, die, wenn sie von dem Prozessor ausgeführt werden, den Prozessor veranlassen, das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche auszuführen.
17. Computerlesbares Medium, auf dem das Computerprogrammprodukt nach Anspruch 16 gespeichert ist.
18. System zum Aufteilen eines oder mehrerer Bilder (20) einer Probe in nach Farbstoffen aufgeteilte Bilddaten (30-32), wobei die Probe mindestens zwei unterschiedliche Farbstoffe, insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe, aufweist, wobei das System ein maschinelles Lernsystem (10) umfasst, das darauf trainiert ist, folgendes auszuführen:
Erzeugen der nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) aus einem oder mehreren in das maschinelle Lernsystem (10) eingegebenen Bildern (20) der Probe mittels des maschinellen Lernsystems (10),
wobei das maschinelle Lernsystem (10) mindestens eine Teilstruktur der Probe, die in den nach Farbstoffen aufgeteilten Bilddaten (30-32) von mehr als einem Farbstoff vorhanden ist, aus den Bilddaten (30-32) eines oder mehrerer Farbstoffe entfernt.

Fig. 1



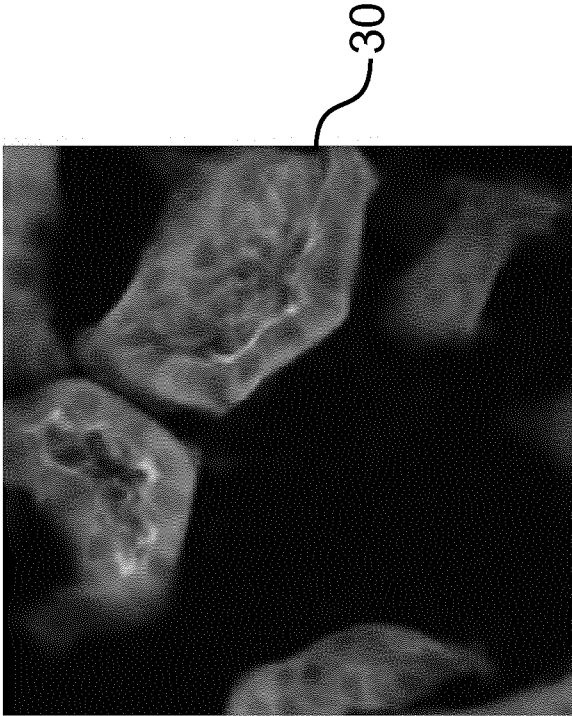


Fig. 3a

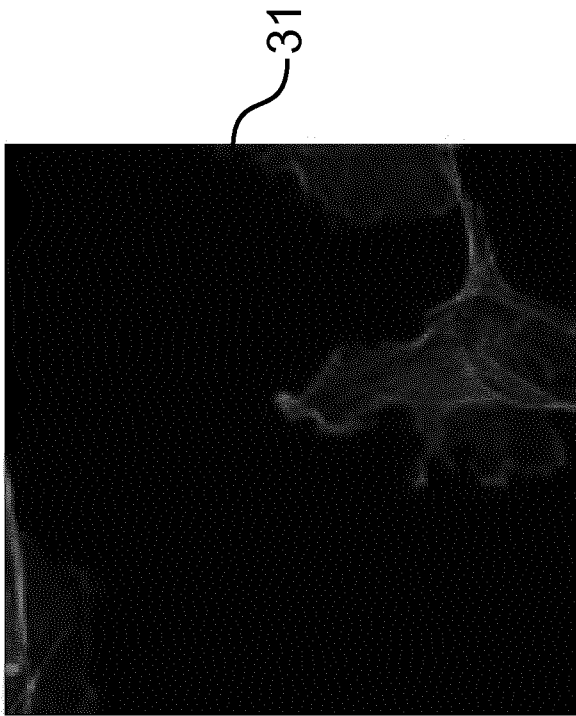


Fig. 3b

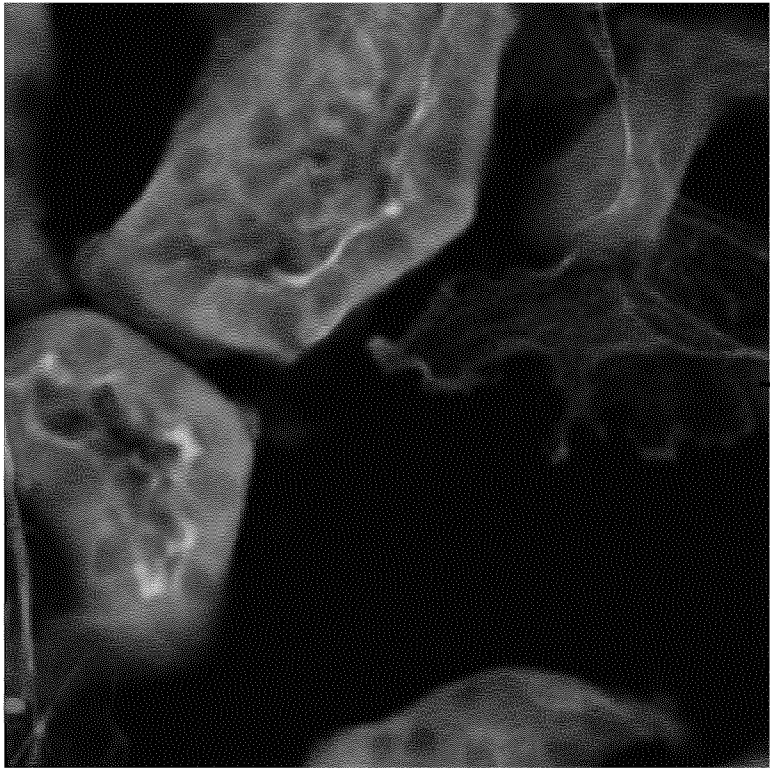


Fig. 2

3/3

STAND
DER
TECHNIK

30'

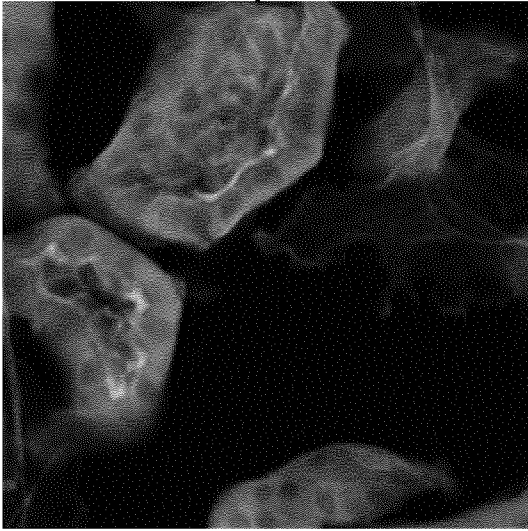


Fig. 4a

STAND
DER
TECHNIK

31'

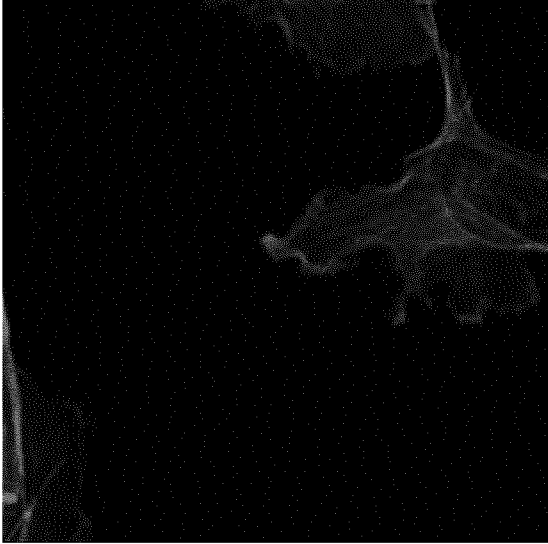


Fig. 4b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/054558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**G06T 7/00**(2017.01)i; **G06N 20/00**(2019.01)i; **G06K 9/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G06T; G06N; G06K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MURAD MEGJHANI ET AL. "Morphologically constrained spectral unmixing by dictionary learning for multiplex fluorescence microscopy" <i>BIOINFORMATICS.</i> , GB, Vol. 33, No. 14, 15 July 2017 (2017-07-15), pages 2182-2190 DOI: 10.1093/bioinformatics/btx108 ISSN: 1367-4803, XP055589656 abstract, and page 2183, lines 2-8, right column and section 3, section 3.1, section 3.3 and section 3.4, section 5; figure 5	1-18
A	Timo Zimmermann. "Spectral Imaging and Linear Unmixing in Light Microscopy" In: ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY., DE, : SPRINGER, BERLIN , pages 245-265, Vol. 95, 01 January 2005 (2005-01-01), ISSN: 0724-6145, XP055589696 section 3.2 Subtraction	1-18
A	WO 2015177268 A1 (VENTANA MED SYST INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 26 November 2015 (2015-11-26) paragraphs [0017] - [0019]	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2019

Date of mailing of the international search report

03 June 2019

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Haan, Martine

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/054558

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2015177268	A1	26 November 2015	AU	2015261891	A1	13 October 2016
				CA	2944829	A1	26 November 2015
				EP	3146463	A1	29 March 2017
				JP	2017516992	A	22 June 2017
				US	2017169567	A1	15 June 2017
				US	2019012787	A1	10 January 2019
				WO	2015177268	A1	26 November 2015

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G06T7/00 G06N20/00 G06K9/00 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G06T G06N G06K		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MURAD MEGJHANI ET AL: "Morphologically constrained spectral unmixing by dictionary learning for multiplex fluorescence microscopy", BIOINFORMATICS., Bd. 33, Nr. 14, 15. Juli 2017 (2017-07-15) , Seiten 2182-2190, XP055589656, GB ISSN: 1367-4803, DOI: 10.1093/bioinformatics/btx108 Zusammenfassung, sowie S. 2183, Z. 2-8, rechte Spalte und Abschnitt 3, Abschnitt 3.1, Abschnitt 3.3 und Abschnitt 3.4, Abschnitt 5; Abbildung 5 ----- -/-	1-18
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
22. Mai 2019		03/06/2019
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Haan, Martine

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Timo Zimmermann: "Spectral Imaging and Linear Unmixing in Light Microscopy" In: "ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOLOGY.", 1. Januar 2005 (2005-01-01), SPRINGER, BERLIN, DE, XP055589696, ISSN: 0724-6145 Bd. 95, Seiten 245-265, DOI: 10.1007/b102216, Abschnitt 3.2 Subtraction -----	1-18
A	WO 2015/177268 A1 (VENTANA MED SYST INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 26. November 2015 (2015-11-26) Absätze [0017] - [0019] -----	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2019/054558

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2015177268 A1	26-11-2015	AU 2015261891 A1	13-10-2016
		CA 2944829 A1	26-11-2015
		EP 3146463 A1	29-03-2017
		JP 2017516992 A	22-06-2017
		US 2017169567 A1	15-06-2017
		US 2019012787 A1	10-01-2019
		WO 2015177268 A1	26-11-2015
