

# Bewegungsanalyse von zeitlich aufgenommenen Zellbilddaten in vitro

Sebastian Magosch<sup>1</sup>, Hans-Gerd Lipinski<sup>1</sup>, Martin Wiemann<sup>2</sup>  
und Dieter Bingmann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fachbereich Informatik/Medizinische Informatik, Fachhochschule Dortmund

<sup>2</sup>Physiologisches Institut der Universität Duisburg-Essen

Email: sebastian@magosch.de

**Zusammenfassung.** Es wird eine Methode vorgestellt, mit deren Hilfe es möglich ist, rechnergestützt Bewegungsmuster von lebenden Zellkulturen zu erkennen und auszuwerten. Anhand spezifischer Merkmale können in zeitlichen Bildsequenzen Zellen automatisch erkannt und über die Zeit verfolgt werden. Darüber hinaus werden die dabei entstandenen Bewegungsmuster anhand charakteristischer Parameter erfasst.

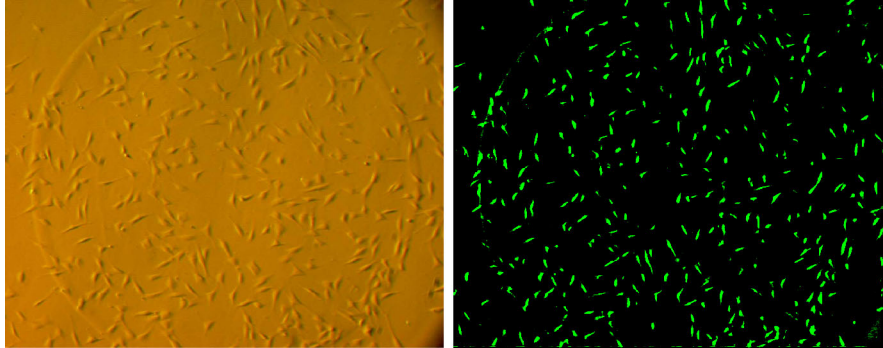
## 1 Einleitung

Aufgrund experimenteller Einflüsse, z.B. der Beigabe von Nährsubstraten, führen lebende Knochenzellen in Zellkulturen spezifische Bewegungsmuster aus, welche aus physiologischer Sicht ein Maß für ihre Funktionsfähigkeit darstellen [1]. Da die Zahl  $N$  der an einem solchen Experiment beteiligten Zellen in einer untersuchten Zellkultur sehr groß ist ( $1000 < N < 5000$ ), ist eine manuelle Auswertung praktisch unmöglich. Daher wurde ein rechnergestütztes Verfahren entwickelt, welches in der Lage ist, eine Bewegungsanalyse der mit Hilfe eines Mikroskops digital erfassten Bilddaten weitgehend automatisiert durchzuführen. Zudem sind Parameter festzulegen, welche die Bewegungsmuster beschreiben. Das Programm soll auf einem handelsüblichen Standard-PC lauffähig sein.

## 2 Methoden

Bevor die eigentliche Zellbewegungsanalyse durchgeführt werden kann, werden die Originalbilddaten einer Vorverarbeitung unterzogen, um Artefakte und Bildstörungen weitgehend zu eliminieren [3]. Danach werden die Bilder mit Hilfe eines konventionellen Schwellwertverfahrens binärisiert. Anschließend werden zusammenhängende Zellobjekte mit Hilfe eines Lauflängenfilters, welcher die Ausdehnung und Zusammengehörigkeit von Objektkanten bewertet, kategorisiert, selektiert, sortiert und analysiert. Eine nachträgliche Kantendetektion der binären Objekte geschieht mit Hilfe des "Marr-Hildreth" - Operators, welcher die Objektkanten der Zellen detektiert, die dann im nächsten Schritt mit dem Zhang-Suen-Skelettierungs-Algorithmus auf eine 1-pixel-breite Linie verdünnt werden.

**Abb. 1.** Momentaufnahme eines Cluster mobiler vitaler Knochenzellen (links: Originalaufnahme; rechts: binärisierter Zellcluster)



Dies erlaubt eine Differenzierung von Zellobjekten und Störungen, sowie die Bestimmung der Mittelpunkte der Zellen und deren Lage, Struktur, Größe und Form. Aus der zeitlichen Abfolge der Bilddaten kann ein Bewegungsvektorfeld für das Gesamtzellkollektiv berechnet werden. Hinzu wird die Lauflängenleistung (also der von der Zelle mit der Zeit tatsächlich zurückgelegten Weg) erfasst und die fraktale Dimension des von einer Zelle eingeschlagenen Pfades nach der von Katz und George vorgeschlagenen Methode berechnet [2]. Mittels dieser Messung können biologische Bewegungen als zurückgelegte Strecken (ein Spektrum von verbundenen Segmenten) analysiert, bewertet und verglichen werden.

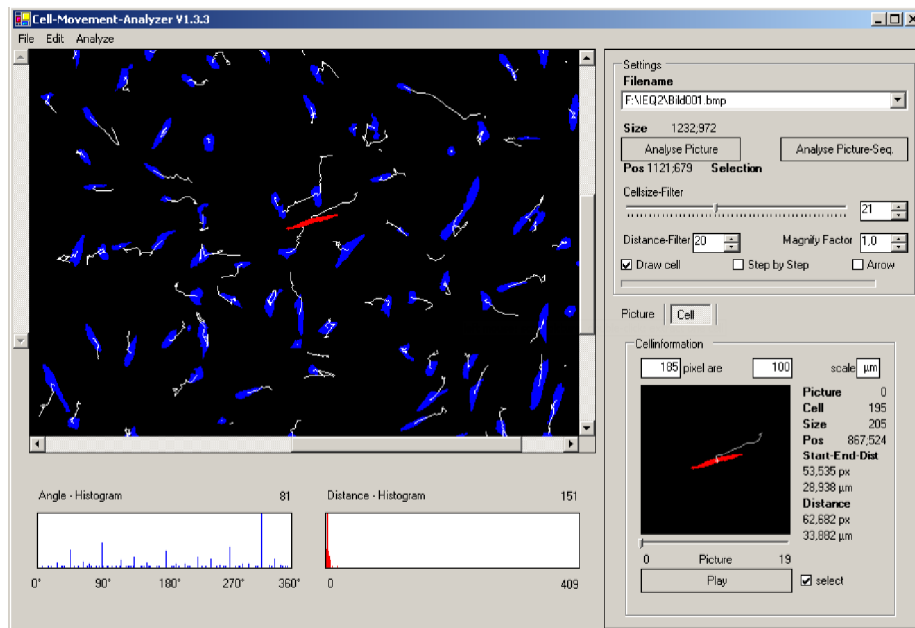
### 3 Ergebnisse

Nach erfolgter Registrierung und Speicherung der Zellsequenzen wurden die Originalbilddaten mit Hilfe eines Schwellwertverfahrens binärisiert. Die Abbildung 1 zeigt eine Originalaufnahme (Momentaufnahme) eines Zellclusters und das zugehörige Binärbild. Danach wurden die Bilddaten von solchen Strukturen befreit, die nicht zu Zellstrukturen gehören.

Nachdem mit den Vorverarbeitungsschritten erreicht wurde, dass nur noch Zellobjekte in der Bildsequenz enthalten sind, lassen sie sich hinsichtlich Struktur, Größe und Form der Zellen sowie deren Veränderungen automatisch untersuchen. Dabei werden, ausgehend vom jeweiligen Zell-Mittelpunkt, der im Laufe der Zeit zurückgelegte Weg (Lauflistung) und die Laufrichtung als Winkel jeder einzelnen Zelle erfasst und mit den korrespondierenden Daten der darauf folgenden Bildsequenz verglichen. Auf diese Weise kann ein globales Geschwindigkeitsvektorfeld generiert, analysiert und anschließend visualisiert werden.

Eine automatische Referenzierung der Zellen zur nächsten Bildsequenz, also das Wiederfinden der gleichen Zelle in einem anderen Bild, geschieht durch die Bewertung der Form und Bewegung einer Zelle. Die Form, Lage, Position sowie die Größe einer Zelle, muss im nächsten und vorhergehenden Bild spezielle Kriterien erfüllen. Des Weiteren spielt die Bewegungsgeschwindigkeit und der

Abb. 2. Hauptfenster während der Zellverfolgung



zurückgelegte Weg eines Objekts ebenfalls eine wichtige Rolle. Nur wenn eine Zelle in der darauf folgenden Bildsequenz eindeutig wieder gefunden werden kann und alle erfassten Merkmale in ein bestimmtes und erlerntes Bewegungsmuster passen, findet eine Referenzierung der Zellen als ermittelte Laufrichtung statt. Die Bewegungsanalyse ist in beiden Richtungen notwendig, da sonst die richtige Zelle im darauf folgenden Bild nicht eindeutig wieder gefunden werden kann.

Referenzierungen (Bewegungsabläufe) werden visuell durch eine Verbindung als Linie kenntlich gemacht. Dadurch hat der Benutzer die Möglichkeit den Verlauf der einzelnen Zellen direkt zu verfolgen. Durch die gleichzeitige Darstellung der erkannten und verfolgten Objekte und dem Originalbild hat der Anwender zudem eine objektive Kontrolle über die Zellbewegungsanalyse. Kann aus bestimmten Gründen eine automatische Zellverfolgung nicht fortgeführt werden, da z.B. die Zelle das Bild verlässt oder eine Zellfusion bzw. Zellteilung stattfindet, so hat der Benutzer die Möglichkeit eine Zellsequenz näher zu betrachten, die Verfolgung manuell zu korrigieren, als dreidimensionale Animation wiederzugeben oder die Zelle aus der Betrachtung zu nehmen. In Abbildung 2 ist eine erfolgreiche und abgeschlossene Objektverfolgung zu sehen, bei der eine Zelle zur genaueren Betrachtung selektiert wird. Der zurückgelegte Weg ist hier deutlich als Linie erkennbar.

Es ist möglich, einzelne Zellen und deren zurückgelegten Weg zu extrahieren, damit die Verfolgung mit einer Hand-Referenz verglichen werden kann oder um weitere spezifische Daten zu erhalten. Dazu zählen die Lauflistung (insgesamt

Abb. 3. Zellverfolgung



zurückgelegter Weg), Volumen, Zellgrößenveränderung, Geschwindigkeit, Bewegungsrichtung, Art der Bewegung, beschrieben durch die fraktale Dimension des von der Zelle zurückgelegten Weges (Pfad), sowie Start-Endpunkt-Distanz, die direkt in den exakten Maßstab umgerechnet werden. Die Abbildung 3 zeigt die jeweils von den Zellen im Rahmen einer zeitlichen Bildsequenz zurückgelegten Wege (projiziert auf die Endposition der Zellen).

Falsch erkannte oder nicht in Frage kommende Zellen kann der Benutzer manuell de-selektieren, die visuell mit einer anderen Farbe eingefärbt werden. Ein automatischer Selektionsfilter unterstützt den Benutzer in der abschließenden Zelleselektion in dem gewisse Kriterien erfüllt sein müssen, damit die Zelle in der Bewertung mit eingehen kann.

Alle ermittelten Parameter können durch eine Exportschnittstelle in eine Datei abgespeichert werden, um die errechneten Daten mit Standard-Auswerteprogrammen (z.B. Excel) weiterverarbeiten zu können.

## 4 Diskussion

Eine automatische Bewegungsanalyse der Zellen ist nicht trivial, da zum einen die mikroskopischen Bilder oft gestört sind (Schatteneffekte, Bildrauschen, Texturen, inhomogene Ausleuchtung etc.) und sich zum anderen eine Zellverfolgung in speziellen Fällen, falls etwa Zellfusionen oder Zellteilungen auftreten, sehr

schwierig gestalten kann [3]. In der Literatur findet man zahlreiche Ansätze und Lösungen zur Bewegungsanalyse. Auf dem Softwaremarkt erhältliche Lösungen bieten zwar eine umfangreiche Parametrisierung, sind jedoch durch das relativ starr gehaltene System schlecht einsetzbar. Die meisten der dabei verwendeten Methoden lassen sich auf das zu lösende Problem nur begrenzt anwenden, da sowohl die Bilddaten als auch die gewünschten Resultate zu spezifisch ausfallen. Je nach Aufnahmequalität und Art der Zellkultur wird eine Objektverfolgung falsch erkannt oder unzureichend interpretiert.

Unter Verwendung der in der Arbeitsgruppe entwickelten Bildfilterungstechniken und Objekt- und Kantendetektierungsalgorithmen können lebende Knochenzellen einer Zellkultur (>500) in ihrer Bewegung (> 400 Bildsequenzen) mit einer geringen Fehlerrate korrekt erkannt und zeitlich referenziert, bewertet und weiterverarbeitet werden. Dabei gestaltet sich die Bedienung einfach und anwenderfreundlich. Durch die Berechnung wichtiger, den Bewegungsablauf charakterisierender Parameter, wie etwa Lauflängenleistung und fraktale Dimension des zurückgelegten Weges, ist es möglich, sowohl globale Aussagen über das Bewegungsmuster des Gesamtkollektivs zu treffen, als auch über einzelne Zellen Aussagen über das Bewegungsmuster sowie über Formänderungen der Zellen während des Bewegungsablaufs quantitativ zu bewerten, nach Parametereinflüssen zu selektieren und, wenn erforderlich, auch im Einzelfall genauer zu betrachten.

Mit Hilfe des rechnergestützten Verfahrens ist es möglich, die Bewegungsabläufe großer Zellzahlen in Bildsequenzen fortlaufend zu detektieren. Das Programm benötigt nur in sehr wenigen Fällen (<1%) eine interaktive Korrektur des Detektionsprozesses durch den Anwender und erlaubt daher eine effiziente Analyse. Es trägt damit in nicht unerheblichem Maße zum Verständnis von physiologischen Prozessen bei lebenden Knochenzellen unter veränderten Lebensbedingungen bzw. in pathophysiologischen Situationen bei.

## Literaturverzeichnis

1. Winkler L. Cellular mobility on BMP-covered surfaces. In: Abstracts of the 7th Symposium of biomaterials and biomechanics – fundamentals and clinical application; 2004. p. 126–127.
2. Katz MJ, George EB. Fractals and the analysis of Growth paths. *Bulletin of Mathematical Biology* 1985;47(2):273–286.
3. Magosch S, Lipinski HG, Winkler L, Wiemann M, Bingmann D. A computerized method to analyse bone cell mobility in vitro. In: Abstracts of the 7th Symposium of biomaterials and biomechanics – fundamentals and clinical application. Essen; 2004. p. 149.