

# **Kontinuierliche *in situ*-Analyse des Zellwachstums und der Zellviabilität: Entwicklung eines Systems zur Zelldetektion und Viabilitätsklassifikation tierischer Zellkulturen auf Basis mikroskopischer Dunkelfeldaufnahmen**

Sebastian Burgemeister und Erwin Flaschel  
Universität Bielefeld, Technische Fakultät, 33594 Bielefeld

## **1. Einleitung**

Die Online-Auswertung von Zelldichte und Zellviabilität ist ein herausfordernder, aber essentieller Schritt zur Kontrolle und Optimierung einer Vielzahl biotechnologischer Prozesse und dabei von besonderem Interesse für das wachsende Feld der tierischen Zellkulturen. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieses Projekts das Software-System CellViCAM entwickelt, welches basierend auf verschiedenen Techniken der Bildverarbeitung und des maschinellen Lernens dunkelfeldmikroskopische Aufnahmen aufbereitet und auswertet. Es ermöglicht eine automatische Zelldetektion und Viabilitätsklassifikation suspensierter Säugerzellen ohne die Hilfe zusätzlicher Farbstoffe oder Fluoreszenzmarkierung.

Unter Verwendung einer humanen und einer CHO-Zelllinie als Referenzkulturen wurde zunächst ein effizientes und online-fähiges Zelldetektionsverfahren eingeführt und weiterentwickelt, welches ebenfalls eine Zelldichteabschätzung ermöglicht. Darüber hinaus wurde eine zuverlässige und reagenzienunabhängige Quantifizierung lebender und toter Zellen etabliert sowie das Potential dieses Ansatzes untersucht, zusätzlich zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen zu differenzieren.

Das CellViCAM-System arbeitet hierbei in zwei Schritten. Zunächst werden die Zellen detektiert und mit Referenzpositionen markiert. Durch eine verbesserte Vorverarbeitung des Ausgangsbildes und die Rückweisung nicht-zellähnlicher Strukturen konnte die Korrekturklassifikationsrate auf 0,96 (niedrige bis mittlere Zelldichten) bzw. 0,82 (hohe Zelldichte, verstärkte Agglomeratbildung) gesteigert werden. Daraufhin wurden die erkannten Zellen entsprechend ihres Viabilitätsstatus klassifiziert. In der Basisversion wurde dies als Zwei-Klassen-Problem realisiert und ermöglicht eine lebend/tot-Unterscheidung beider Zelllinien mit ausgezeichneter Übereinstimmung zu konventionalen, färbebasierten Methoden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, wie mit Hilfe einer systematischen Erweiterung der Klassifikationsarchitektur lebende, früh-apoptotische, spät-apoptotische und nekrotische Zellstadien voneinander differenziert werden können. Hierbei wurde für das System eine theoretische Korrekturklassifikationsrate von 0,87 bestimmt sowie bei der exemplarischen Anwendung auf simulierte Mixturen von Zellstadien 76% der Zellen korrekt klassifiziert.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Trainings- und Validierungsdaten**

Im Rahmen der Entwicklung und Evaluierung des Systems wurden die humane Produktionszelllinie *AGE1.HN aat* (ProBioGen AG) sowie die CHO-Zelllinie *DP-12* (Klon #1934, American Type Culture Collection) als Referenzorganismen verwendet. Da zur Analyse der Zellviabilität Methoden des maschinellen Lernens eingesetzt werden, mussten Trainingsdatensätze generiert werden, welche es dem Klassifikationssystem ermöglichen, die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellzuständen zu erfassen. Hierzu wurden für beide Zelllinien jeweils vier spezielle Kulturen hergestellt, die sich vor allem aus Zellen nur

eines Viabilitätszustandes zusammensetzen. Für die Generierung dieser Trainingsbeispiele wurden vier Protokolle entwickelt und angewendet: (I) Kulturen, welche vorrangig hochviabile Zellen enthalten, wurden während der exponentiellen Wachstumsphase entnommen. (II) Homogene Kulturen nekrotischer Zellen wurden nach Behandlung einer viablen Kultur mit Ethanol erzeugt. (III und IV) Apoptotische Kulturen wurden mit Hilfe von Polyinosinsäure-Polycytidylsäure (*CHO DP-12*) bzw. Staurosporin (*AGE1.HN*) induziert. Früh-apoptotische Zellkulturen konnten hierbei nach 4 h, spät-apoptotische nach 12 h gewonnen werden. Unter Verwendung eines Trinokular-Mikroskops (XSP-12, Phenix Optical Co.,Ltd.) mit Dunkelfeld-Kondensator und einer angeschlossenen CCD-Kamera (1/2" Chip; XCD-700, Sony Inc.) wurden geeignete Dunkelfeldaufnahmen (100-fache Vergrößerung) der so präparierten Kulturen erstellt. Mit Hilfe der automatischen Zelldetektion konnten hieraus einzelne Bildausschnitte für jede Zelle (im Folgenden als Zellbilder bezeichnet) extrahiert werden. Das gesamte Vorgehen ermöglicht damit eine semi-automatische Generierung der jeweils vier benötigten Trainingsdatensätze bestehend aus Beispielzellbildern lebender, nekrotischer, früh- und spät-apoptotischer Zellen. Die zeit- und arbeitsintensive Zuweisung der jeweiligen Viabilitätsklassen, welche sonst für jedes Zellbild per Hand erfolgen müsste, kann dabei vernachlässigt werden. Diesem Protokoll folgend wurden jeweils vier Trainingsdatensätze für *AGE1.HN*, bestehend aus 1.300 lebenden, 1.050 nekrotischen, 600 früh- und 350 spät-apoptotischen Zellbildern, sowie für *CHO DP-12*, bestehend aus 2.400 lebenden, 2.000 nekrotischen, 2.100 früh- und 2.000 spät-apoptotischen Beispielen, erstellt.

Drei von diesen Trainingsdatensätzen unabhängige Validierungsdatensätze wurden zusätzlich generiert. Hierfür wurden eine 14-tägige Batchkultivierung von *AGE1.HN* im Schüttelkolben, eine geregelte 8-tägige Batchkultivierung von *CHO DP-12* im Bioreaktor (1,2 L) sowie eine 11-tägige Batchkultivierung von *CHO DP-12* im Schüttelkolben durchgeführt. Parallel wurde mit Hilfe eines Cedex-Systems (Innovatis) auf Basis einer Trypanblaufärbung der Anteil lebender Zellen für jeden Ansatz protokolliert. Die *CHO DP-12*-Schüttelkolbenkultur wurde zudem nach drei Tagen mit Butyrat versetzt und dessen Einfluss auf die Zellviabilität mit Hilfe des Caspase-Glo 3/7-Assays (Promega) analysiert. Die gemessene Caspaseaktivität dient hierbei als ein Merkmal der Apoptoseinduktion bzw. des Apoptoseverlaufs. Von jedem Kultivierungsverlauf wurden unter Verwendung des oben beschriebenen Mikroskopaufbaus in regelmäßigen Intervallen Dunkelfeldaufnahmen erstellt. Diese Datensätze umfassen jeweils 250 bis 350 Mikroskopbilder pro Kultivierung und enthalten 7.000 bis 12.000 Zellen. Unter Verwendung des *AGE1.HN*-Datensatzes wurde ebenfalls ein Validierungsstandard für die Bewertung der Zelldetektion erstellt, indem für etwa die Hälfte der Aufnahmen alle Zellpositionen per Hand bestimmt wurden.

## 2.2 Zelldetektion

Die im Rahmen des Projektes etablierte und auf der Hough-Transformation für Kreise basierende Zelldetektion wurde um eine zusätzliche Vorverarbeitungsstufe erweitert. Neben den bereits beschriebenen Rauschverminderungsschritten und dem Ausgleich unregelmäßiger Beleuchtung wird hierbei für jeden Pixel der Helligkeitsunterschied zwischen dem Originalbild und einer Referenzaufnahme (ein unter denselben Bedingungen aufgenommenes „leeres“ Bild) berechnet. Unter Verwendung einer Sigmoidfunktion werden Pixel mit großer Helligkeitsdifferenz (und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit Teil einer Zelle) verstärkt, während die Helligkeit von Pixeln mit geringem Unterschied vermindert wird. Die hierdurch erzielte Verstärkung des Hintergrund-Zell-Kontrastes resultiert in einer verbesserten Darstellung der Zellränder innerhalb der berechneten Kantenbilder, welche die Grundlage der Kreiserkennung und somit der Zelldetektion darstellen. Des Weiteren wurde

ein optionaler Nachverarbeitungsschritt etabliert, welcher das Zurückweisen im ersten Schritt detektierter, aber nicht-zellähnlicher Strukturen (z.B. Verunreinigungen oder Zelltrümmer) ermöglicht. Hierfür werden für jedes Zellbild lokal bestimmte Michelson-Kontraste gemittelt und die Sensitivität der Rückweisung mit Hilfe eines korrespondierenden Schwellwerts kontrolliert.

### 2.3 Berechnung von Merkmalsvektoren

Im Anschluss an die Zelldetektion werden die Zellbilder entsprechend des jeweils bestimmten Zellmittelpunktes und -radius aus der Original-Dunkelfeldaufnahme extrahiert. Um den Einfluss ggf. variierender Aufnahmeparameter (z.B. Helligkeitsschwankungen) auf die Viabilitätsklassifikation zu minimieren, wurde hierbei ein zusätzlicher Intensitäts-Normalisierungs-Schritt vorgeschaltet. Dieser beruht auf einem Histogramm-„Matching“-Algorithmus. Für jedes Zellbild werden daraufhin bildbasierte Eigenschaften berechnet und zu einem von der Zellgröße unabhängigen Merkmalsvektor kombiniert. Hierbei werden, neben den bereits beschriebenen grundlegenden statistischen und texturbasierten Eigenschaften, nun optional ebenfalls geometrische, auf Kanten oder lokaler Nachbarschaft basierende Merkmale, erfasst.

### 2.4 Viabilitätsklassifikation

Die so für jede Zelle berechneten, charakteristischen Merkmalsvektoren bilden die Basis für die anschließende Viabilitätsklassifikation. Im Falle der grundlegenden lebend/tot-Unterscheidung werden diese zunächst für alle lebenden und nekrotischen Zellen aus den jeweiligen *AGE1.HN*- bzw. *CHO DP-12*-Trainingsdatensätzen berechnet. In einem einmaligen Prozess werden die resultierenden Merkmalsvektoren genutzt, um mit Hilfe einer „Support-Vector-Maschine“ (SVM) einen spezialisierten Klassifikator (je Zelllinie) zu trainieren. Nach Abschluss des Trainings ist dieser in der Lage, neue, unklassifizierte Zellen (bzw. ihre Merkmalsvektoren) auf Basis der unterschiedlichen Charakteristika der jeweiligen Trainingsdatensätze ebenfalls als lebend oder tot einzustufen.

Die komplexen Todesmechanismen tierischer Zellen kommen jedoch in mehr Viabilitätszuständen als nur lebend und tot zum Ausdruck. Daher wurde die bestehende lebend/tot-Analyse auf ein Mehrklassen-Klassifikations-System, basierend auf Trainingsdaten lebender, nekrotischer, früh- und spätapoptotischer Zellen, erweitert. Hierfür wurde eine dreistufige, baumartige Klassifikationsarchitektur etabliert, die über die Verkettung mehrerer, jeweils auf Einzelentscheidungen spezialisierter, SVM-Klassifikatoren eine Differenzierung der vier Zellzustände erlaubt. Die Abfolge dieser Einzelentscheidungen kann entsprechend verschiedener Gesichtspunkte optimiert bzw. modifiziert werden. Eine mögliche, an der Verschiedenartigkeit der Zellbilder orientierte Klassifikationsarchitektur hat z.B. folgende Struktur: Im ersten Schritt (SVM I) wird zwischen nekrotischen und nicht-nekrotischen Zellen unterschieden. Hierbei werden die Merkmalsvektoren der nekrotischen Zellen als negative Trainingsbeispiele und die kombinierten Trainingsdatensätze der lebenden und apoptotischen Zellen als positive Beispiele verwendet. Die diskrete und damit bereits final bestimmte Klasse (hier die nekrotischen Zellen) wird nun von der weiteren Analyse ausgenommen. Im zweiten Schritt (SVM II) wird daraufhin zwischen lebenden und apoptotischen (basierend auf den kombinierten früh- und spätapoptotischen Trainingsdaten) differenziert. Erneut wird die eindeutig bestimmte Einzelklasse (hier die lebenden Zellen) von der weiteren Analyse ausgeschlossen und abschließend mit Hilfe eines dritten Klassifikators (SVM III) zwischen früh- und spätapoptotischem Zellstadium unterschieden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Genauigkeit der Zelldetektion

Um die Genauigkeit der Zelldetektion beurteilen zu können, wurden die automatisch bestimmten Zellpositionen mit einem von Hand annotierten Validierungsstandard abgeglichen. Hierbei wurden die Sensitivität *SE* (der Anteil korrekt detektierter Zellen aus allen Zellen) sowie der positive Vorhersagewert *PPV* (der Anteil korrekt detektierter Zellen aus allen detektierten Objekten) berechnet. Die detaillierten Ergebnisse basierend auf den Dunkelfeldaufnahmen der 14-tägigen *AGE1.HN*-Kultivierung sind in Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1:** Sensitivität (*SE*) und positiver Vorhersagewert (*PPV*) der Zelldetektion basierend auf einem von Hand erstellten Validierungsstandard für die 14-tägige *AGE1.HN*-Kultivierung.

Tag	1	2	3	4	7	8	9	10	11	14
<i>SE</i>	0,93	0,94	0,95	0,95	0,95	0,94	0,95	0,88	0,77	0,92
<i>PPV</i>	0,93	0,92	0,95	0,97	0,97	0,98	0,97	0,93	0,86	0,87

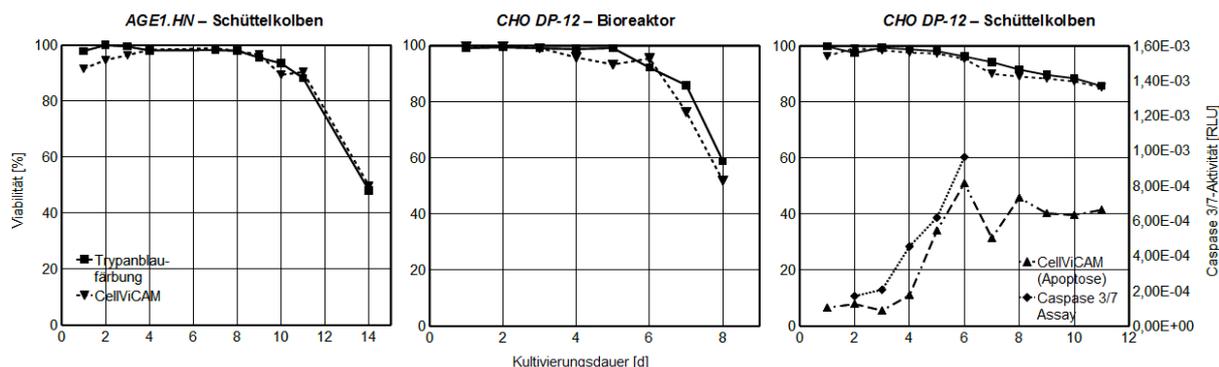
Insbesondere durch die neu etablierte Rückweisung nicht-zellähnlicher Strukturen konnten in den ersten 9 Tagen der Kultivierung (niedrige bis mittlere Zelldichten, schwache Agglomeratbildung) sowohl *SE* als auch *PPV* um bis zu 5% gesteigert werden. Mit Hilfe der verbesserten Vorverarbeitung konnte zusätzlich die Detektionsgenauigkeit in Kultivierungsstadien mit hoher Zelldichte und verstärkter Agglomeratbildung (Tag 9-14) deutlich verbessert werden. Die *SE* der Detektion wurde von 0,58 auf 0,77, der *PPV* von 0,79 auf 0,86 gesteigert. Vergleichbare Detektionsgenauigkeiten konnten unter Anwendung desselben Detektionssystems und ohne weitere Anpassung der Parameter ebenfalls bei beiden *CHO SP-12*-Kultivierungen erreicht werden.

Für eine weitere Verbesserung der Detektion wäre grundsätzlich die alternative Anwendung von „Flooding“-Algorithmen oder künstlicher neuronaler Netze vorstellbar. Diese Techniken zeichnen sich jedoch durch ihre wiederum eigenen Stärken und Schwächen (wie z.B. eine erhöhte Rechenzeit) aus. Der vorgestellte Ansatz ermöglicht eine robuste und effiziente Detektion mit hoher Genauigkeit und stellt damit eine geeignete Basis für die Zelldichteabschätzung sowie die Zellklassifikation dar.

#### 3.2 Leistungsfähigkeit der Viabilitätsklassifikation

Unter Anwendung der verbesserten Vorverarbeitung sowie der erweiterten Merkmalsberechnung konnte die bereits diskutierte Leistungsfähigkeit der CellViCAM-lebend/tot-Analyse bestätigt und zusätzlich optimiert werden. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der *CHO DP-12*-Datensätze die Übertragbarkeit des Ansatzes auf eine weitere Zelllinie evaluiert und ebenfalls bestätigt werden. Wie in Abb. 1 dargestellt, weisen alle drei mit dem CellViCAM-System bestimmten Viabilitätsverläufe eine sehr hohe Korrelation bzw. Übereinstimmung zum verwendeten Goldstandard Trypanblaufärbung auf. Es kann daher als äquivalente Alternative zu konventionellen, färbe-basierten Methoden verstanden werden.

Im Rahmen der Evaluierung des Mehrklassen-Klassifikations-Systems wurde eine Kreuzvalidierung der *AGE1.HN*-Trainingsdatensätze für die jeweiligen drei Klassifikationsstufen (SVM I-III) durchgeführt. Hierbei wurde jeweils nur ein Teil der Trainingsdaten für das Training des jeweiligen Klassifikators verwendet, während die restlichen Trainingsdaten genutzt wurden, um diesen zu testen. Die in Tab. 2 dargestellten Klassifikationsgenauigkeiten (*ACC*) ermöglichen somit eine Einschätzung der Leistungsfähigkeit in Hinblick



**Abb. 1:** Viabilitätsverläufe der *AGE1.HN*-Schüttelkolbenkultivierung, der *CHO SP-12*-Kultivierung im Bioreaktor und der *CHO SP-12*-Schüttelkolbenkultivierung. Diese wurden jeweils mit Hilfe einer Trypanblaufärbung und unter Verwendung des CellViCAM-Systems bestimmt. Zusätzlich wurde für die *CHO SP-12*-Schüttelkolbenkultivierung ein Caspase 3/7 Assay durchgeführt sowie der Anteil apoptotischer Zellen mit dem CellViCAM-System bestimmt.

auf die jeweilige spezielle Zellklassenunterscheidung - unabhängig von den anderen Schritten. Es wurden drei alternative Anordnungen des Klassifikationsbaumes, also neun Einzelklassifikatoren, trainiert und evaluiert. Die jeweilige Abfolge der Klassifikationsentscheidungen, die Zusammensetzung der Trainingsdatensätze und die durchschnittliche Klassifikationsgenauigkeit pro Anordnung sind ebenfalls in Tab. 2 dargestellt. Die erreichten Durchschnittsgenauigkeiten von 0,87 bzw. 0,88 reflektieren dabei das Gesamtpotential der beteiligten Klassifikatoren, zwischen den vier Zellstadien zu unterscheiden. Um darüber hinaus eine Abschätzung der Leistungsfähigkeit des Systems bei Anwendung auf reale Dunkelfeldaufnahmen zu ermöglichen, wurden im Vorfeld der Kreuzvalidierung 80 Zellbeispiele pro Viabilitätsklasse entnommen und als künstlicher Validierungsdatensatz verwendet. Dieser wurde mit jeder der drei Klassifikationsstrategien analysiert und ein durchschnittlicher Anteil korrekt klassifizierter Zellen (Validierungsset *SE*) von 0,76 bestimmt.

**Tab. 2:** Drei mögliche Anordnungen des Klassifikationsbaumes, evaluiert mit Hilfe einer Trainingsset-Kreuzvalidierung sowie eines Validierungsdatensatzes. Für jede Anordnung ist die Zusammensetzung der jeweiligen Trainingsdatensätze und die dazugehörigen Kreuzvalidierungs-Klassifikationsgenauigkeiten gegeben (SVM I - III). Die durchschnittliche Klassifikationsgenauigkeit ( $\emptyset$  *ACC*) sowie der Anteil korrekt klassifizierter Validierungsbeispiele (Validierungs-Set *SE*) ermöglichen eine Beurteilung einer jeden Anordnung als Ganzes.

Anord- nung	SVM I <i>ACC</i>	SVM II <i>ACC</i>	SVM III <i>ACC</i>	$\emptyset$ <i>ACC</i>	Validierungs- set <i>SE</i>
<b>A<sub>A</sub></b>	$T_{liv} \cup T_{eapop} \cup T_{lapop}$ vs. $T_{nec}$ 0,96	$T_{liv}$ vs. $T_{eapop} \cup T_{lapop}$ 0,84	$T_{eapop}$ vs. $T_{lapop}$ 0,80	<b>0,87</b>	<b>0,76 ± 0,02</b>
<b>A<sub>B</sub></b>	$T_{liv} \cup T_{eapop} \cup T_{lapop}$ vs. $T_{nec}$ 0,96	$T_{liv} \cup T_{eapop}$ vs. $T_{lapop}$ 0,78	$T_{liv}$ vs. $T_{eapop}$ 0,88	<b>0,87</b>	<b>0,76 ± 0,02</b>
<b>A<sub>C</sub></b>	$T_{liv} \cup T_{eapop} \cup T_{lapop}$ vs. $T_{nec}$ 0,96	$T_{eapop}$ vs. $T_{liv} \cup T_{lapop}$ 0,82	$T_{liv}$ vs. $T_{lapop}$ 0,86	<b>0,88</b>	<b>0,76 ± 0,03</b>

Zusätzlich wurde für die *CHO DP-12*-Schüttelkolbenkultivierung mit Hilfe des erweiterten CellViCAM-Systems der Anteil apoptotischer Zellen (früh- und spätapoptotisch) ermittelt und zur gemessenen Caspaseaktivität in Beziehung gesetzt (vgl. Abb. 1). In Folge der Butyrat-Induktion an Tag 3 lässt sich mit beiden Methoden in klarer Korrelation eine starke Zunahme apoptotischer Zellen während der folgenden Tage feststellen.

Das vorgestellte CellViCAM-System zeigt damit sehr gute Ergebnisse in der Detektion und Quantifizierung lebender und toter suspensierter Säugerzellen. Im Gegensatz zu vergleichbaren Ansätzen basiert es auf der Auswertung charakteristischer Merkmale in mikroskopischen Dunkelfeldaufnahmen und verzichtet auf die Verwendung von Färbe- oder Fluoreszenzmethoden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine differenziertere Analyse, welche ebenfalls apoptotische Zellzustände in Betracht zieht, mit Hilfe des CellViCAM-Systems möglich ist. Trotzdem wirft die Erweiterung um apoptotische Zellklassen neue, bisher nur teilweise gelöste, Probleme auf. So ist z. B. die Homogenität der apoptotischen Trainingsdatensätze geringer als erwartet und die Generierung eines geeigneten „Goldstandards“ für Apoptosemessungen hat sich als herausfordernd erwiesen. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Methoden und erzielten Ergebnisse sowie eine ausführliche Diskussion des Systems kann zusätzlich in Burgemeister *et al.* (2010) gefunden werden.

#### **4. Referenzen**

Burgemeister, S., Nattkemper, T.W., Noll, T., Hoffrogge, R., Flaschel, E., 2010. CellViCAM-Cell Viability Classification for Animal Cell Cultures using Dark Field Micrographs. *J. Biotechnol.*, in print. DOI:10.1016/j.jbiotec.2010.07.020.