Cell Image Velocimetry (CIV) im Vergleich mit Deep Learning Ansätzen zur Ermittlung von Zellgeschwindigkeiten für zellkulturelle Analysen

Comparing Cell Image Velocimetry and Deep Learning Approaches for Analyzing Cell Velocities based of Cell culture Experiments

Jan Oldenburg¹, Finja Borowski¹ Lisa Maletzki², Anne Strohbach², Stefan Siewert¹, Raila Busch², Stephan B. Felix², Klaus-Peter Schmitz¹ und Michael Stiehm¹

1: Institute for ImplantTechnology and Biomaterials e.V., Rostock, Germany

2: Department of Internal Medicine, Cardiology, University Medicine Greifswald, Germany

Particle Image Velocimetry, Endothelzellen, Wundheilung, kardiovaskuläre Implantate

Zusammenfassung

Für das klinische Ergebnis nach dem Einsetzen kardiovaskulärer Implantate ist die Wiederherstellung der physiologischen Endothelfunktion ein wesentliches Ziel, da dieses das Risiko von Infektionen und Thrombosen verringert. Hierbei ist die Biofluidmechanik von besonders großer Bedeutung, so hat diese auch Einfluss auf die Besiedelung des Implantats mit Endothelzellen (Re-Endothelialisierung).

Um den Prozess der Re-Endothelialisierung experimentell zu untersuchen, werden routinemäßig *in vitro* Zellmigrationsassays verwendet, welche auch in strömenden Medien durchgeführt werden können. Die Analyse der Zellbewegung kann Aufschluss darüber geben, ob ein Implantatmaterial die Re-Endothelialisierung unterstützt. Wollten Forschende die Geschwindigkeit einzelner Endothelzellen untersuchen, haben sie bisher in zeitaufwändigen Verfahren manuell die Endothelzellen auf sequentiell aufgenommenen Live-Cell-Bildern nachverfolgt.

Die Auswertung von Bildserien ist in der experimentellen Strömungsmechanik und insbesondere in der Particle Image Velocimetry (PIV) etabliert. Einige Arbeitsgruppen verwenden Kreuzkorrelationsalgorithmen daher auch zur Auswertung von Live-Cell-Bildern, welches als Cell Image Velocimtry (CIV) bezeichnet wird.

Neben der CIV-Methode zeigen Fortschritte bei Deep Learning Algorithmen vielversprechende Möglichkeiten für die Anwendung in der Detektion von individuellen Zellgeschwindigkeiten. Die Methoden CIV und Deep-Learning können in diesem Zusammenhang den strömungsmechanischen Konzepten der Euler- bzw. Lagrangen-Betrachtungsweise zugeordnet werden.

In dieser Studie wurden beide Methoden (CIV vs. Deep Learning) zur Ermittlung der Bewegungsgeschwindigkeit von Endothelzellen bei zellkulturellen Untersuchungen angewendet. Zur Bestimmung der Güte beider Methoden (CIV vs. Deep Learning) wurden synthetisch erzeugten Zellpfade als Referenz herangezogen.

Die Verwendung der CIV zur Untersuchung von Zellkulturexperimenten ist bei den hier vorgestellten Ergebnissen nur eingeschränkt möglich. Die Bewegung von einzelnen Zellen

kann nicht durch die CIV-Methode ermittelt werden. Zudem sind die CIV Ergebnisse abhängig von der Größe der interrogation area (IA). Der hier vorgestellte Deep Learning Ansatz ist in der Lage individuelle Zellen zu segmentieren, wodurch ein anschließendes Tracking sehr gute Übereinstimmung mit den manuell ermittelten Referenzgeschwindigkeit der Endothelzellen liefert.

Einleitung

In Deutschland wurden im Jahr 2018 hochgerechnet 318.000 Stents sowie 21.000 Transkatheter-Aortenklappenprothesen implantiert, siehe Herzbericht 2019.

Die Endothelialisierung, also Abdeckung eines Implantats mit Endothelzellen, ist ein entscheidender Faktor beim Einheilen. Eine gute Abdeckung des Implantats mit Endothelzellen sowie eine gesundes Endothelzellverbund wird mit zahlreichen klinischen Vorteilen in Verbindung gebracht und verringert das Thromboserisiko sowie Implantatninfektionen [Bourantas et al. 2014, Liesenborgh et al. 2020].

In vitro Zellmigrationsassays zur Untersuchung des Endothelialisierungsverhaltens unterschiedlicher Materialien oder des Einflusses von Flussbedingung auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen besitzen daher eine hohe Relevanz. Zur Analyse werden Bilderserien (Live-Cell-Images) der sich bewegenden Endothelzellen aufgenommen. Die Auswertung der Bilderserien erfolgt vielfach manuell, siehe Jin et al. 2016, was zum einen sehr zeitaufwändig ist und zum anderen zu benutzerabhängigen Ergebnissen führt. Zahlreiche Arbeitsgruppen befassen sich daher mit der Methodenentwicklung zur automatisierten Erkennung und Segmentierung der Zellen.

Die automatisierten Bildauswertealgorithmen basieren häufig auf der Auswertung von Grauwertschwellen oder Grauwertgradienten, wie z. B. der Canny-Methode, siehe Canny et al. 1986. Eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Kontrast-, Helligkeits- und Rauschschwankungen sowie die ungenügende Differenzierung von Endothelzelle und Assay-Kontaminationen bzw. Luftblasen limitieren die Anwendung oder machen eine zusätzliche manuelle Nachbereitung der Bildanalyse erforderlich, siehe Treloar et al. 2014.

Eine weitere Herangehensweise ist die Auswertung der Bildserien mittels Kreuzkorrelationsalgorithmen, wie es in der experimentellen Strömungsmechanik und insbesondere in der Particle Image Velociemtry (PIV) etabliert ist. Dieser Ansatz wird daher als Cell Image Velocimtry (CIV) bezeichnet. Die CIV erfasst dabei nicht einzelne Endothelzellen, sondern beschreibt die Bewegung des Zellverbundes (Milde et al. 2012) in einem feststehenden Koordinatensystem entsprechend dem Euler-Bezugssystem.

Neben der CIV-Methode bieten Deep Learning Algorithmen Möglichkeiten für die Anwendung in der Detektion von individuellen Zellgeschwindigkeiten. So haben Fourcade et al. 2019 und Lundervold et al. 2019 darauf hingewiesen, dass Convolutional Neural Networks (CNNs) und U-Net-Architekturen ein enormes Potenzial für die medizinische Bildanalyse besitzen. Insbesondere die Bildsegmentierung kann durch diese Machine-Learning-Algorithmen sehr zu verlässlich erfolgen, siehe Hesamian et al. 2019 und Buetti-Dinh et a. 2019.

Die Methoden CIV und Deep Learning können in diesem Zusammenhang den strömungsmechanischen Konzepten der Euler- bzw. Lagrangen-Betrachtungsweise zugeordnet werden. Der Ursprung der hier vorgestellten Studie liegt in der Entwicklung eines Deep Learning Ansatzes zur Detektion von Endothelzellen (intelligent Cell Detection, iCD) und dem Vergleich der erzielten Ergebnisse mit CIV.

Im Rahmen dieser Studie wurden beide Methoden (CIV vs. Deep Learning) zur Ermittlung der Bewegungsgeschwindigkeit von Endothelzellen unter synthetischen Bedingungen

angewendet und systematisch verglichen. Zur Bestimmung der Güte beider Methoden (CIV vs. iCD) wurden synthetisch erzeugte Zellpfade als Referenz herangezogen.

Material und Methoden

Synthetische Live-Cell-Bilder

Um die Untersuchungsmethoden systematisch auf ihre Performance in Abhängigkeit unterschiedlicher Zellkulturkonfigurationen zu untersuchen, wurden Live-Cell-Bilder synthetisch erzeugt. Grundlage für die synthetischen Bilder sind Ergebnisse zellexperimenteller Untersuchungen, siehe Oldenburg et al. 2021.

Verwendet wurden humane Koronararterien-Endothelzellen (HCAEC) von Cell Systems, Deutschland, welche im Inkubator über einen Zeitraum von 15 h mit dem JuLiTM Life Cell Analyser (NanoEnTek, Korea) überwacht wurden. Die Endothelzellen waren Flussbedingungen ausgesetzt, welche eine Schubspannung auf die Endothelzellen von 0,15 Pa bzw. 1 Pa induziert. Alle 15 Minuten wurde ein Bild der sich bewegenden Endothelzellen aufgenommen.

Anschließend werden die Darstellungen der Endothelzellen aus den Originalbildern ausgeschnitten und mittels selbstentwickelten MATLAB-Algorithmus auf einem generischen Hintergrund platziert. Die Endothelzellen haben einen regelmäßigen Abstand von 50 Pixeln zueinander. Um unterschiedliche Vergrößerung zellkultureller Aufnahmen zu modellieren, wurden die Darstellungen der Endothelzellen verschieden skaliert (100 bis 1.000 Pixel²). Die Bewegung der synthetisch platzierten Endothelzellen ist durch ein vorab, zufällig generiertes Vektorfeld vorgegeben, siehe Abb. 1. Die Geschwindigkeiten der synthetischen Live-Cell-Bilder entsprechen den physiologischen Bedingungen (max. 20 µm/h).



Abb. 1: Generierung synthetische Bilder: Live Cell Image eines Wundheilungsexperimentes, Extraktion von Endothelzelldarstellungen, Generierung eines Hintergundes mit Vektorfeld und Platzierung der Endothelzellen

Eine synthetische Bilderserie bestehend aus 5 Bildern wird entsprechend des zuvor beschriebenen Verfahrens generiert und anschließend mittels CIV und iCD ausgewertet.

Synthetisch erzeugte Live-Cell-Bilder haben die Vorteile, dass spezielle Fälle auf unterschiedlichen Skalen modelliert werden können. Zudem sind die Bildposition sowie die Bewegung der künstlich platzierten Endothelzellen genau bekannt und somit als Referenz zur Evaluierung der beiden Auswertemethoden CIV und Deep Learning geeignet.

Deep Learning Methode

Für die Segmentierung der Endothelzellen wurde das semantische Segmentierungsnetz Unet verwendet, welches von Ronneberger et al. 2015 entwickelt wurde. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Deep Learning Methode intelligent Cell Detection (iCD) findet sich unter Oldenburg et al. 2021. Eine Zusammenfassung der verwendeten U-Net Parameter ist der Tab. 1 zu entnehmen.

U-Net Parameter	MATLAB-Funktion, Optionen sowie U-Net-Einstellungen
Netzvariante	Unet-Layers
	3 Encoder- und Decoderstufen,
	jeweils zwei Faltungen (3x3) mit einer linearen Aktivierungsfunktion (ReLU) nach Ronneberger et al. 2015
Klassifizierung jedes Pixels	Softmax-Schicht
Verlust des Netzes während des Trainings	Tversky-Loss-Funktion, siehe Salehi et al. 2017 Alpha = 0,3 Beta = 0,7
Optimierer	Adaptive Momentum (ADAM)
	Lernrate = 0,001
	Reduzierungsfaktor je 10 Epochen = 0,9
Validierung	Jaccard-Matrix, die als Intersection over Union (IoU) bezeichnet wird, sowie der F1-Score.

Tab. 1: Zusammenfassung der U-Net Parameter der iCD-Methode

Für die hier vorgestellte Studie wurde ein vortrainiertes Netzwerk verwendet, aus Oldenburg et al. 2021. Dabei wurden 280 Live-Zellbilder beliebiger Größe manuell segmentiert. In jeder Trainingsepoche wurden bis zu 100 augmentierte Bilder aus einem manuell segmentierten Trainingsbild durch Anwendung von zufälliger Schrägstellung, Rotation, Translation und Helligkeitsvariation erzeugt. Die Ausgabe des Netzwerks ist ein Bild, das in Hintergrund, Zelle und Zellrand segmentiert ist.

Zellnachverfolgung

Als Ergebnis des iCD-Ansatzes liegen die Zellpositionen basierend auf dem Flächenschwerpunkt vor. Jeder detektierten Endothelzelle wurde eine eindeutige Kennung zugeordnet, um sie anschließend mittels Nearest-Neighboring-Algorithmus in der Bildserie nachzuverfolgen. Dabei wird der nächstgelegene Zellschwerpunkt auf dem folgenden Bild dem Zellzentrum des vorherigen Bildes zugeordnet. Um die Güte der Zuordnung weiter zu erhöhen, wurde zusätzlich wurde eine maximale Entfernung definiert, die eine Endothelzelle zwischen zwei aufeinander folgenden Bildern beim vorliegenden Bewegungsmuster zurücklegen würde.

Cell Image Velocimetry (CIV)

Geschwindigkeitsfeldern in Fluidströmungen können mittels PIV-Messverfahren bestimmt werden. Das Messfeld wird dabei in Interrogation Areas (IA) diskretisiert. Anschließend kann durch Analyse der Grauwertverschiebung von Sequenzbildern in den einzelnen IAs ein Geschwindigkeitsvektor gewonnen werden, siehe Adrian and Westerweel 2011. Bei Anwendung dieses Ansatzes auf zellkulturelle Bilder wird von Cell Image Velocimetry (CIV) gesprochen, siehe Milde et al. 2012.

In dieser Studie wurde der in MATLAB implementierte Kreuzkorrelationsalgorithmus verwendet, siehe Tiehlke 2020. Die Größe der IA wurde auf 8x8 bis 128x128 Pixel festgelegt, um den Einfluss der IA-Größe auf das Ergebnis zu untersuchen. Die zulässige Überlagerung der IA lag bei 50 %.

Cell-Tracking zur Methodenevaluierung

anschließendem Der iCD-Ansatz mit Nearest-Neighbour-Algorithmus liefert den zurückgelegten Weg individueller Zellen, was auch als Lagrange-Betrachtungsweise angesehen werden kann. CIV hingegen liefert die Geschwindigkeitsverteilung in der Zellschicht. Zwar können lokale Unterschiede differenziert werden (Milde2012), die Geschwindigkeit individueller Zellen wird hingegen nicht ermittelt. Um beide Methoden (iCD vs CIV) miteinander zu vergleichen, wurden auf Basis der CIV Zellpfade berechnet und mit den iCD-Zellpfaden verglichen. Die Trajektorien werden durch die Differentialgleichung der Bewegung beschrieben und können numerisch auf der Grundlage der gemessenen Geschwindigkeitsfelder berechnet werden. Zu diesem Zweck verwendeten wir einen einstufigen Euler-Ansatz, der in MATLAB implementiert wurde:

$$\frac{d}{dx}\vec{x}(t) = U(\vec{x}(t), t)$$

Da es sich um einen synthetischen Datensatz mit vorgegebener Geschwindigkeitsverteilung handelt, war die Zellbewegung bekannt.

Als Vergleichskriterium wurde der euklidischen Abstand (d) zwischen dem Referenzpfad (xR,yR) und dem jeweiligen Pfad der Methode (xM,yM) an diskreten Zeitpunkten berechnet, siehe Abb. 2. Ein Pfad wurde bei der Auswertung als valide betrachtet, solange dieser innerhalb der Bildkoordinaten lag und d < 100 Pixel war.



Abb. 2: Schemata der euklidischen Distanz zwischen dem Pfad erhalten aus CIV oder iCD (xM(t),yM(t)) und dem Referenzpfad (xR(t),yR(t)) zum Zeitpunkt t = 5.

Ergebnisse

Abbildung 3 stellt an repräsentativen Zellbildern den Einfluss der Zellgröße (Vergrößerung) auf die Performance der jeweiligen Auswertemethode dar. Angewendet wurde CIV mit unterschiedlicher IA-Größe (8x8 Pixel², 16x16 Pixel², 32x32 Pixel², 64x64 Pixel², 128x128 Pixel²). sowie eine Kombination aus Zellflächensegmentierung durch iCD und Partikeltracking (Zellmittelpunkt). Anschließend wurden die jeweils ermittelten Zellpfade, welche mit dem tatsächlichen Referenzpfad verglichen.



Abb. 3: Beispielhafte Abbildung berechneter Geschwindigkeiten durch CIV (IA: IA-Größe (8x8 Pixel², 16x16 Pixel², 32x32 Pixel², 64x64 Pixel²) und iCD an synthetisch erzeugten Zellbildern mit Endothelzellen unterschiedlicher Vergrößerung.

Nachfolgend dargestellt ist die absolute Abweichung in Pixel des berechneten Pfades zum Referenzpfad nach 5 aufeinander folgenden Bildern bzw. Zeitpunkten, siehe Abb. 3 a). Sofern ein Pfad nicht über 5 Zeitpunkte hinaus rekonstruiert werden konnte, wurde der Pfad nicht berücksichtigt. Ein Pfad gilt als valide, sofern eine maximale Distanz von 100 Pixeln nicht überschritten wird. In Abbildung 3 b) ist dargestellt wie groß die Abbruchrate, d.h. das Auftreten von nicht validen Pfaden für die jeweilige Methode nach 5 Zeitpunkten ist. Die iCD-Methode zeigt hier eine sehr geringe Abbruchrate mit >94% verfolgten Zellen sowie eine hohe Genauigkeit der Zellpfade.



Abb. 3: Quantitative Auswertung der Zellpfade anhand der absolute Distanz zwischen Referenzpfad und der berechneten Zellpfade im Mittel aus der Gesamtheit, der auf einem Bild detektierten Zellpfade ab einer Zellnachverfolgung von 5 Zeitpunkten für Zellgrößen von 100, 400, 700 und 1.000 Pixel² (links). Prozentualer Anteil der validen Zellpfade im Vergleich zwischen CIV und iCD (rechts).

Diskussion und Zusammenfassung

Die Fragestellungen zellkultureller Untersuchungen sind sehr vielseitig und reichen von Analysen der Verformung einzelner Zellen bis hin zur Untersuchung eines gesamten Zellverbundes, Milde et al. 2012. Entsprechend unterscheiden sich die mikroskopischen Aufnahmen von Einzelzellbilder bis hin zu Bildern vieler tausend Zellen. In dieser Studie wurden zwei Methoden - Kreuzkorrelation im Rahmen von CIV sowie der Deep Learning Algorithmus iCD - zur Ermittlung der Bewegungsgeschwindigkeit und des Bewegungspfades von Endothelzellen bei zellkulturellen Untersuchungen angewendet und verglichen.

Beide Methoden versprechen, die Grenzen von klassischen Bildauswertemethoden - so sollte das Hintergrundrauschen möglichst gering sein und der Kontrast über alle Zeitabschnitte konstant, was bei Wundheilungstests nicht immer erfüllt ist (Milde2012) - zu überwinden. Zur Bestimmung der Güte beider Methoden (CIV vs. iCD) wurden die bekannten Pfade auf der Grundlage der synthetisch erzeugten Live-Zellbilder als Referenz herangezogen.

Sowohl CIV als auch der Deep Learning Ansatz sind in der Lage räumlich und zeitlich aufgelöste Geschwindigkeitsinformationen des Zellverbundes zu liefern, wodurch der Informationsgehalt im Vergleich zur Zellfrontanalyse deutlich steigt.

Bei der Berechnung der Zellpfade kommt es bei der CIV, insbesondere bei großen IA, zu Pfadabbrüchen. Die Genauigkeit in Form der absoluten Distanz zum Referenzpfad ist stark abhängig von der Zellgröße und der IA-Größe. Letzteres bedeutet für den Benutzer eine umfangreiche Voruntersuchung zur Ermittlung der optimalen IA-Größe.

Der hier vorgestellte Deep Learning Ansatz ist in der Lage individuelle Zellen zu segmentieren, wodurch ein anschließendes Tracking sehr gute Übereinstimmung mit den Referenzpfaden der Endothelzellen liefert. Dadurch könnte beispielsweise der Einsatz fluoreszierender Kernmarker zur Zelldetektion nicht notwendig sein, was zu bevorzugen ist, da es dabei zu einer möglichen Veränderung der zellulären Aktivitäten kommen kann, siehe Yu et al. 2010 und Vitorino et al. 2008. Auf Basis automatisierter Segmentierung und ohne Eingriff in das Zellexperiment, beispielsweise durch Zellmarkierung, lassen sich mit dieser Methoden valide räumlich und zeitlich aufgelöste Informationen zur Zellmigration gewinnen. Deep Learning wird daher als relevante Methode bei der Auswertung von Zellexperimenten zur Bewertung der Biokompatibilität zukünftiger Implantatmaterialien eingeschätzt.

Förderung

Diese Studie wurde im Rahmen des Forschungsprojektes "Card-ii-Omics" angefertigt und durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF) finanziert (ESF/14-BM-A55-004416). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Qualifikationsprogrammes "Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbünden - Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern".

Literatur

Deutsche Herzstiftung e.V. 2019: Deutscher Herzbericht 2019. Georg Thieme Verlag KG.
Bourantas, C.V., Papafaklis, M.I., Kotsia, A., Farooq, V., Muramatsu, T., Gomez-Lara, J., et al.
2014:, Following Drug-Eluting Bioresorbable Vascular Scaffold Implantation - An Optical Coherence
Tomography Study. J. Am. Coll. Cardiol. Intv.; 7:315–24. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcin.2013.05.034
Liesenborghs, L., Meyers, S., Vanassche, T., Verhamme, P., 2020: Coagulation: At the heart of
infective endocarditis. J. Thromb. Haemost.; 18:995–1008. DOI: 10.1111/jth.14736.
Jin, W., Shah, E.T., Penington, C.J., McCue, S.W., Chopin, L.K., Simpson, M.J., 2016:
Reproducibility of scratch assays is affected by the initial degree of confluence: experiments,
modelling and model selection. J. Theor. Biol.; 390:136–45. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.10.040.

Canny, J., 1986: A computational approach to edge detection. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell.; PAMI-8(6):679–98. https://doi.org/10.1109/TPAMI.1986.4767851.

Salehi, S.S.M., Erdogmus, D., Gholipour, A. 2017: Tversky Loss Function for Image Segmentation Using 3D Fully Convolutional Deep Networks. In: Wang Q, Shi Y, Suk H-I, Suzuki K, Springer International Publishing; 2017. p. 379–387.

Treloar, K.K., Simpson, M.J., McElwain, D.L.S., Baker, R.E., 2014: Are in vitro estimates of cell diffusivity and cell proliferation rate sensitive to assay geometry? J. Theor. Biol. ;356:71–84. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.04.026.

Milde, F., Franco, D., Ferrari, A., Kurtcuoglu, V., Poulikakos, D., Koumoutsakos, P. 2012:Cell Image Velocimetry (CIV): boosting the automated quantification of cell migration in wound healing assays. Integr. Bio. 4(11):1437–1447. DOI: 10.1039/c2ib20113e

Fourcade, A., Khonsari, R.H., 2019: Deep learning in medical image analysis: a third eye for doctors. J. Stomatol. Oral Maxillofac. Surg.; 120(4):279–88. https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.06.002.

Lundervold, A.S., Lundervold, A., 2019: An overview of deep learning in medical imaging focusing on MRI. Z. Med. Phys.; 29(2):102–27. https://doi.org/10.1016/j.zemedi.2018.11.002.

Hesamian, M.H., Jia, W., He, X., Kennedy, P., 2019: Deep learning techniques for medical image segmentation: achievements and challenges. J. Digit. Imaging.;32(4):582–96. https://doi.org/10.1007/s10278-019-00227-x.

Buetti-Dinh, A., Galli, V., Bellenberg, S., Ilie, O., Herold, M., Christel, S., et al., 2019: Deep neural networks outperform human expert's capacity in characterizing bioleaching bacterial biofilm composition. Biotechnol. Rep. (Amst).;22: e00321. https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00321.

Ronneberger, O., Fischer, P., Brox, T. In: Navab, N., Hornegger, J., Wells, W.M., Frangi, A.F., 2015: U-net: convolutional networks for biomedical image segmentation. Cham: Springer International Publishing; 234–41.

Oldenburg, J., Maletzki, L., Strohbach, A., Bellé, P., Siewert, S. Busch, R., et al. 2021: Methodology for comprehensive cell-level analysis of wound healing experiments using deep learning in MATLAB. BMC Molecular and Cell Biology; 22:32.

Thielke W., 2020: PIVlab - particle image velocimetry (PIV) tool. https://www.mathworks.com/ matlabcentral/fileexchange/27659-pivlab-particle-image-velocimetry-703 piv-tool. Zugriff: 22.06.2021

Adrian RJ., Westerweel J., 2011: Particle image velocimetry. Cambridge: Cambridge University Press.

Yu W., Lee H.K., Hariharan S., Bu W. and Ahmed S., 2010: Evolving generalized Voronoi diagrams for accurate cellular image segmentation. Cytometry, Part A, 2010, 77A, 379–386. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20876

Vitorino P. and Meyer T., 2008: Modular control of endothelial sheet migration. Genes & Dev.; 22, 3268–3281. doi: 10.1101/gad.1725808