

2-Foton Mikroskopi Görüntülerindeki Dendritik Dikenlerin Bölütlenmesi için Watershed ve Etkin Çevritlere Dayalı Bir Yöntem

A Watershed and Active Contours Based Method for Dendritic Spine Segmentation in 2-Photon Microscopy Images

Ertunç Erdil*, A. Özgür Argunşah†, Devrim Ünay‡, Müjdat Çetin*,

*Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Sabancı Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Email: ertuncerdil@sabanciuniv.edu, mctetin@sabanciuniv.edu

†Champalimaud Neuroscience Programme, Champalimaud Centre for the Unknown, Lizbon, Portekiz

Email: ali.argunshah@neuro.fchampalimaud.org

‡Biyomedikal Mühendisliği, Bahçeşehir Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Email: devrim.unay@bahcesehir.edu.tr

Özetçe—2-foton mikroskopi görüntüleme yöntemi kullanılarak elde edilen görüntülerdeki dendritik dikenlerin (spine) morfolojik ve hacimsel özelliklerinin analizi, sinirbilimi alanındaki araştırmacıların son yıllarda ilgi gösterdiği bir çalışma konusudur. Bu analizleri daha gürbüz ve güvenilir yapacak otomatik araçların geliştirilebilmesi, dendritik dikenlerin doğru bölütlenmesine bağlıdır. Bu çalışmada, dendritik dikenlerin bölütlenmesi için watershed ve etkin çevrit yöntemlerine dayalı yeni bir bölütleme yöntemi öneriyoruz. Önerdiğimiz yöntemde öncelikle, dendritik diken bölgesi genel hatlarıyla, watershed algoritması kullanılarak bölütlenir. Elde edilen sonuç, bölge tabanlı etkin çevritlere dayalı bölütleme kullanılarak iyileştirilir. Önerdiğimiz yöntemin ve literatürdeki mevcut yöntemlerin bölütleme sonuçları, uzman bölütlemeleriyle karşılaştırılmıştır. Deneysel sonuçları, önerdiğimiz yöntemin, literatürde dendritik diken bölütlenmesi için sunulmuş mevcut yöntemlere göre daha iyi sonuçlar ürettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler—Dendritik diken bölütleme, Sinir görüntüsü analizi, Etkin çevritler.

Abstract—Analysing morphological and volumetric properties of dendritic spines from 2-photon microscopy images has been of interest to neuroscientists in recent years. Developing robust and reliable tools for automatic analysis depends on the segmentation quality. In this paper, we propose a new segmentation algorithm for dendritic spine segmentation based on watershed and active contour methods. First, our proposed method coarsely segments the dendritic spine area using the watershed algorithm. Then, these results are further refined using a region-based active contour approach. We compare our results and the results of existing methods in the literature to manual delineations of a domain expert. Experimental results demonstrate that our proposed method produces more accurate results than the existing algorithms proposed for dendritic spine segmentation.

Keywords—Dendritic spine segmentation, Neural image analysis, Active contours.

I. GİRİŞ

Görüntüleme teknolojilerindeki gelişmeler, nöronal yapılar ve bu yapıların fonksiyonları arasındaki ilişki-

lerin tek bir dendritik diken seviyesinde araştırılmasına imkan tanımıştır [1], [2], [3]. Dendritik dikenlerin (dendritic spine) zaman içindeki morfolojik ve hacimsel değişiklikleri, bilginin beyinde nasıl tutulduğu ile ilgili önemli bilgiler vermesinin yanında, Frajil X ve Rett sendromu gibi diken yapısı ve fonksiyonlarındaki anormalliklerle ilişkilendirilen çeşitli nörogelişimsel bozuklukların anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Bu alanda çalışan araştırmacı sayısının hızla artması ve el ile yapılan analizlerin çok uzun zaman almasıyla birlikte, analiz edilmesi gereken veriler hızla birikmektedir. Dolayısıyla, bu analizleri otomatik yapabilecek görüntü işleme araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Geliştirilen bir otomatik görüntü işleme aracının sinirbilimi alanında çalışan araştırmacılar tarafından kullanılabilir olması için, bu aracın bir dendritik dikenin zaman içindeki morfolojik ve hacimsel değişimini gürbüz ve güvenilir olarak analiz edebilmesi gerekir. Bu şekilde çalışan bir araç geliştirebilmenin en önemli adımı, dendritik dikenlerin tespit edilip tüm zaman noktalarında doğru bir şekilde bölütlenmesidir. Literatürde, bir dendrit üzerindeki tüm dikenleri 3 boyutlu ve 2 boyutlu görüntülerde tespit eden çalışmalar vardır [4], [5]. Bu çalışmalarda dendritik dikenlerin doğru bölütlenmesi değil, sayılarının ve yerlerinin tespit edilmesi esas amaçtır. Bölütleme üzerine daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada [6], ilk olarak 2 boyutlu görüntüdeki dendritik diken olmaya aday tüm bölgeler otomatik olarak bulunur. Bulunan bölgelerin genel hatlarıyla bölütlenmesi watershed algoritmasıyla yapıldıktan sonra bu bölütlemeyi iyileştirmek için sırasıyla çizge tabanlı [7] ve sıradüzensel (hierarchical) kümeleme algoritmaları uygulanır. O çalışmamızda sunulan yöntem, ilgilenilen tek bir dendritik diken seçilerek sadece o dendritik dikenin bölütlenmesi için de kullanılabilir. Öte yandan, [8]'de bir dendrit üzerindeki tüm dikenlerin tespiti ve bölütlenmesi için jeodezik etkin çevritler tabanlı bir yöntem sunulmuştur. Bu yöntemde öncelikle tüm görüntü, Otsu eşikleme kullanılarak ikili görüntüye dönüştürülür. Ardından ikili görüntü üzerinde inceltme uygulanarak dendritik dikenlerin uç bölgeleri tespit edilir. Bulunan uç bölgeler, jeodezik etkin

çevritlere dayalı bir bölütleme algoritmasına başlangıç çevriti olarak verilerek dendritik dikenler bölütlenir. Bu çalışmayı, bizim bu makalede sunmakta olduğumuz çalışmadan ayıran en önemli fark, jeodezik etkin çevrit modelinin kenar tabanlı (edge-based), bizim çalışmamızda kullanılan etkin çevrit modelinin ise bölge tabanlı (region-based) olmasıdır. Ayrıca [8] çalışmasında kullanılan görüntüler, 2-foton mikroskopi'den farklı bir modalite olan optik floresans mikroskopi ile elde edilmiştir.

Bu çalışmada, dendritik dikenlerin bölütlenmesi için kullandığımız etkin çevrit modeli [9]'da önerilen model olup, literatürde farklı problemlerde sık kullanılmış bir modeldir. Bölge tabanlı etkin çevritlere dayalı bölütlemenin daha önce dendritik diken bölütlemesi probleminde kullanılmamış olması bu çalışmadaki en önemli katkılardan biridir. Ayrıca, 2-foton mikroskopi görüntülerinde etkin çevritlere dayalı bölütleme ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır. Önerdiğimiz yöntem ve literatürdeki mevcut yöntemler, uzman bölütlemeleriyle Dice ölçütü kullanılarak karşılaştırılmıştır. Dice ölçütü ile elde edilen sayısal sonuçlar, önerdiğimiz yöntemin, uzman bölütlemelerine daha yakın bölütlemeler ürettiğini göstermiştir. Etkin çevritlere dayalı bölütleme yönteminin parametrelere diğer yöntemlere göre daha az duyarlı olması bir diğer yarar kazanımıdır.

II. DENDRİTİK DİKENLERİN WATERSHED VE ETKİN ÇEVİRLER İLE BÖLÜTLENMESİ

Bu bölümde öncelikle, dendritik dikenlerin bölütlenmesinde kullanılan etkin çevrit modelinin tanımı verilmiş, ardından önerdiğimiz algoritma anlatılmıştır.

A. Etkin Çevrit Modelinin Tanımı

Verilen bir I_0 görüntüsünün, her bir bölgedeki yoğunluk değerleri yaklaşık olarak aynı olan (piecewise-constant) iki bölgeden, I_0^i ve I_0^o , oluştuğunu kabul edelim. Bu bölgelerin sınırı C ile gösterilsin. Bu durumda c_1 ve c_2 sırasıyla I_0^i ve I_0^o bölgelerinin ortalama yoğunluk değeri olmak üzere, aşağıdaki enerji fonksiyonunu tanımlayalım:

$$\begin{aligned} F(C) &= F_1(C) + F_2(C) \\ &= \int_{inside(C)} |I_0(x, y) - c_1|^2 dx dy \\ &\quad + \int_{outside(C)} |I_0(x, y) - c_2|^2 dx dy \end{aligned} \quad (1)$$

Bu enerji fonksiyonunun en küçüklenmesiyle I_0 görüntüsünün, I_0^i ve I_0^o bölgelerinin yoğunluk varyansları toplamı en küçük olacak şekilde, iki bölüte ayrılması hedeflenir.

Bu noktadan hareketle, [9]'da sunulan etkin çevrit modeli, (1) denklemine, C çevritinin uzunluğu ve C çevritinin içinde kalan alan gibi düzenleyici terimler eklemektedir. Eğri uzunluğu kısıtlamasındaki temel

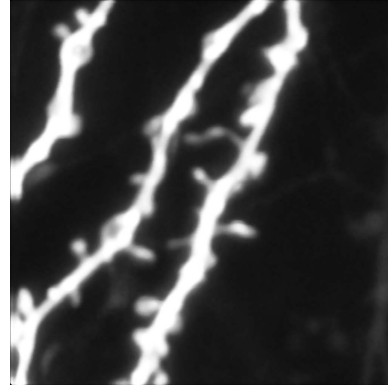
düşünce; kısa eğrilerin doğru şekle daha yakın olacağıdır [10]. Böylece, enerji fonksiyonu, $\mu \geq 0$, $v \geq 0$, $\lambda_1, \lambda_2 \geq 0$ kısıtlara verilen ağırlık katsayıları olmak üzere,

$$\begin{aligned} F(c_1, c_2, C) &= \mu.Length(C) + v.Area(inside(C)) \\ &\quad + \lambda_1. \int_{inside(C)} |I_0(x, y) - c_1|^2 dx dy \\ &\quad + \lambda_2. \int_{outside(C)} |I_0(x, y) - c_2|^2 dx dy \end{aligned} \quad (2)$$

olarak tanımlanmıştır. Bu bildiride sunduğumuz tüm test sonuçları $\lambda_1 = \lambda_2 = 1$, $v = 0$ ve $\mu = 0.2$ katsayılarıyla elde edilmiştir.

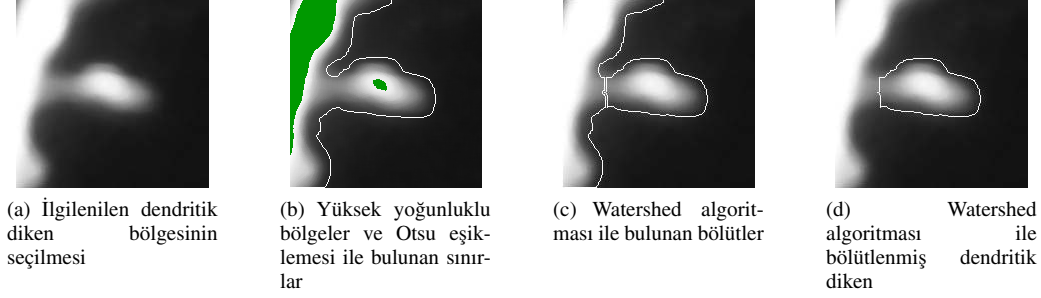
B. Dendritik Dikenleri Bölütleme Algoritması

2-foton mikroskopi kullanılarak elde edilen görüntüler 3 boyutludur ve bu görüntüler z eksenini yönünde en yüksek yoğunluk izdüşümü (maximum intensity projection) [11] alınarak 2 boyuta indirgenir. Önerdiğimiz algoritmanın girdisi bu 2 boyutlu görüntüdür. Görüntüleme sırasında oluşan gürültülerden dolayı önışleme gerekmektedir. Bu çalışmada 2 boyutlu görüntü üzerinde 11 x 11 boyutunda ortanca süzgeci (median filter) kullanılmıştır. Önışleme aşamasından sonra bölütlenmek istenen (ilgilenilen) dendritik dikenin olduğu bölge, dendritik diken seçilen bölgenin ortasına yakın olacak şekilde elle seçilir. Ortanca süzgeci uygulanmış görüntü ve ilgilenilen bir dendritik diken sırasıyla Şekil 1 ve Şekil 2(a)'da gösterilmiştir.



Şekil 1. Ortanca süzgeci uygulanmış 2-foton mikroskopi görüntüsü

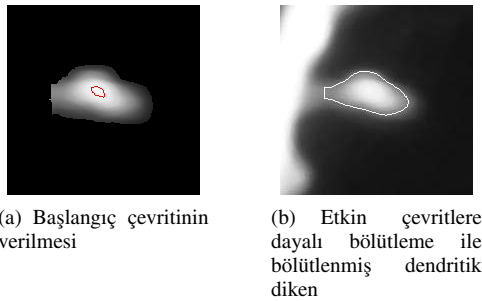
İlgilenilen dendritik dikenin olduğu bölge seçildikten sonra, bu bölge watershed algoritması kullanılarak bölütlenir. Bu bildiride, watershed ile bölütleme, [6] çalışmasında olduğu gibi uygulanmıştır. Bu yöntemde, dendritik dikenlerin genellikle, yüksek yoğunluğa sahip bölgeler içerdiği kabul edilerek, ilgilenilen bölgedeki yüksek yoğunluğa sahip alanlar genişletilmiş en yüksek dönüşümü (extended maxima transform) [12] ile Şekil 2(b)'de gösterildiği gibi bulunur. Yüksek yoğunluğa sahip alanlar, Otsu eşiklemesi ile bulunan düşük



Şekil 2. Watershed algoritması ile ilgiilenen bir dendritik dikenin bölütlenmesi

yoğunluğa sahip alanlarla birlikte, ilgiilenen bölgedeki havuzların tabanını oluşturur. Watershed algoritması havuzları bu bölgelerden başlayarak doldurur. Sonuçta oluşan setler bölütlerin sınırlarını belirler (Şekil 2(c)). Oluşan bölütler arasından, dendritik diken ilgiilenen bölgenin ortasına yakındır kabullenmesi kullanılarak dendritik diken bulunur (Şekil 2(d)). Watershed algoritmasıyla oluşturulan dendritik diken bölütlemesinin sınırları, uzman bölütlemesinden genellikle büyük olmaktadır [6].

Watershed algoritması sonucu bulunan bölütlemenin iyileştirilmesi için etkin çevritlere dayalı bölütleme kullanılmaktadır. Bu amaçla, watershed algoritması ile bulunan dendritik diken bölgesinin içinde kalan alan, etkin çevritler ile tekrar bölütlenir. Etkin çevritlere dayalı bölütleme algoritmasına girdi olarak watershed ile bölütlenen bölgenin yanı sıra bir başlangıç çevriti de verilmelidir. Bu çalışmada başlangıç çevriti olarak, dendritik diken bölgesinde halihazırda bulunmuş olduğumuz yüksek yoğunluklu bölgenin sınırları verilmiştir. Şekil 2(d)'de gösterilen dendritik diken bölgesine verilen başlangıç çevriti Şekil 3(a)'da gösterilmektedir.



Şekil 3. Etkin çevritlere dayalı bölütlemenin adımları

Bölütlenmesi istenen bölgeye verilen başlangıç çevriti, (2) de verilen enerji fonksiyonu en küçüklene veya belirli bir iterasyon sayısına kadar gelişir. Bu bildiride yaptığımız deneylerde en çok yapılabilecek iterasyon sayısı 500 olarak belirlenmiştir. Başlangıç çevritinin gelişimi tamamlandıktan sonra oluşan bölütleme Şekil 3(b)'de gösterilmiştir.

III. DENEYSEL SONUÇLAR

Bu bölümde elde ettiğimiz deney sonuçlarını sunuyoruz. Bölütleme sonuçlarının doğruluğu, uzmanın el ile yaptığı bölütlemeler baz alınarak Dice ölçütü ile karşılaştırılmıştır. Bu ölçüt, verilen iki küme, X ve Y , arasındaki benzerliği ölçmektedir. Bizim uygulamamızda X ve Y , uzmanın el ile yaptığı ve bir algoritma tarafından bulunan bölütlemelerin olduğu ikili görüntülerdir. Dice ölçütü $[0, 1]$ aralığında değerler almakta olup, (3) formülüyle hesaplanmaktadır.

$$\mathcal{D}(X, Y) = \frac{2|X \cap Y|}{|X| + |Y|} \quad (3)$$

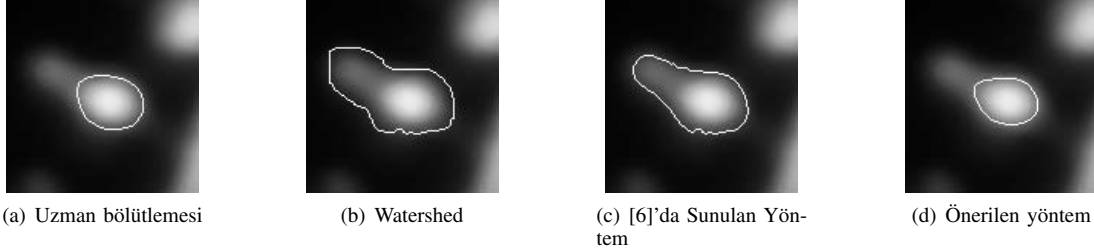
Önerdiğimiz yöntem, 5 farklı veri kümesinden seçilen birer dendritik diken üzerinde test edilmiştir. Kullanılan birinci veri kümesi 48, ikinci, üçüncü ve dördüncü veri kümeleri 54, beşinci veri kümesi ise 41 zaman noktasında kaydedilmiş görüntüler içermektedir. Her veri kümesinde seçilen birer dendritik diken tüm zaman noktalarında bölütlenmiştir. Aynı testler, watershed ve [6] çalışmasında sunulan yöntem için de yapılmış ve önerdiğimiz yöntemle karşılaştırılmıştır.

Tablo I'de, deney sonuçlarında elde edilen sayısal değerler gösterilmektedir. Sayfa sayısı kısıtlarından dolayı tüm zaman noktalarındaki Dice skorları yerine, ortalama ve varyansları verilmiştir. Ayrıca, ortalama Dice skorları arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı t -testi ile incelenmiştir. Ortalama Dice skoru sonuçları, dendritik diken bölütlemesi için önerdiğimiz yöntemin, diğer yöntemlere göre uzman bölütlemelerine daha yakın sonuçlar ürettiğini göstermektedir.

İlgiilenen bir dendritik dikenin tüm zaman noktalarındaki hacim veya şeklinin otomatik olarak analiz edilebilmesi, bölütleme için önerilen yöntemin parametrelerine olan hassaslığıyla doğrudan ilgilidir. Bu nedenle, tüm zaman noktalarında aynı parametreler kullanılarak yapılan bölütlemelerin varyansının çok fazla olmaması beklenir. Tablo I'de tüm zaman noktalarındaki Dice skorlarının varyansı, 5 farklı veri kümesi için de verilmiştir. Bu sonuçlar, etkin çevritlere dayalı bölütlemenin aynı parametrelerle, daha gürbüz ve tutarlı bölütlemeler ürettiğini göstermektedir.

Veri Kümesi	Dice Skor Ortalaması \pm Varyans		
	Watershed	[6]'da Sunulan Yöntem	Önerilen Yöntem
1	0.8293 \pm 0.0038	0.8675 \pm 0.0031	0.8739 [†] \pm 0.0014
2	0.5885 \pm 0.0057	0.6320 \pm 0.0064	0.8239 ^{†‡} \pm 0.0066
3	0.6735 \pm 0.0064	0.7300 \pm 0.0051	0.9169 ^{†‡} \pm 0.0045
4	0.7965 \pm 0.0038	0.8388 \pm 0.0046	0.8711 ^{†‡} \pm 0.0031
5	0.7029 \pm 0.0037	0.7544 \pm 0.0046	0.9173 ^{†‡} \pm 0.0016

Tablo I. 5 FARKLI VERİ KÜMESİNDEN ELDE EDİLEN DICE SKORLARIN ORTALAMALARI VE VARYANSLARI. Anlamlılık derecesi $\alpha = 0.05$ olmak üzere; [†]: Önerilen yöntemin ve watershed algoritmasının sonuçları arasında anlamlı bir fark vardır. [‡]: Önerilen yöntemin ve [6]'da sunulan yöntemin sonuçları arasında anlamlı bir fark vardır.



Şekil 4. Görsel bölütleme sonuçları

Şekil 4'te bir dendritik dikenin farklı bölütleme yöntemleriyle elde edilmiş görsel bölütleme sonuçları verilmiştir. Şekil 4(b) ve Şekil 4(c)'de arka plandaki bulanık bölge de dendritik diken olarak bölütlenmiştir. Etkin çevritler modelindeki çevrit uzunluğu terimi, çevritin çok fazla genişlemesini engellediği için bulanık bölge bölütlemeye dahil edilmez. Önerdiğimiz yöntemin bölütleme sonucunun (Şekil 4(d)) uzman bölütlemesine (Şekil 4(a)) daha yakın olduğu açıkça görülmektedir.

IV. VARGILAR

Bu bildiriye, dendritik dikenlerin bölütlenmesi için watershed ve etkin çevritlere dayalı bir yöntem önerilmiştir. Önerilen yöntem ile yüksek yoğunluğa sahip bölgeler içeren dendritik dikenler, tüm zaman noktalarında aynı parametreler kullanılarak, başarılı bir şekilde bölütlenebilmektedir.

İncelenmek istenilen dendritik dikenin yüksek yoğunluğa sahip bölgeler içermediği durumlarla karşılaşılabılır. Ayrıca, 3 boyutlu görüntünün 2 boyuta indirgenmesi sırasında bazı dendritik dikenlerin bir kısmı ya da tamamı kaybolabilir. Bu tür durumlardaki dendritik dikenlerin incelenebilmesi için 3 boyutlu görüntü üzerinde şekil ön bilgisi kullanan bölütleme algoritmaları geliştirmek, ilerideki çalışmalarımız içinde olacaktır.

V. TEŞEKKÜR

Yazarlar, faydalı tartışmaları ve kod paylaşımı için Murat Yağcı'ya; 2-foton mikroskopi görüntüleri ve uzman bölütlemeleri sağlama konusundaki yardımlarından ötürü Inbal Israely, Yazmín Ramiro-Cortés ve Anna F. Hobbiss'e teşekkürlerini sunar.

KAYNAKÇA

- [1] Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., ve Kasai, H., Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines, *Nature*, Cilt 429, s. 761 - 766, 2004.
- [2] Govindarajan, A., Israely, I., Huang, S. Y., ve Tonegawa, S., The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP, *Neuron*, Cilt 69, s. 132 - 146, 2011.
- [3] Tanaka, J. I., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C., ve Kasai, H., Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines, *Science Signalling*, Cilt. 319, s. 1683 - 1687, 2008.
- [4] Bai, W., Zhou, X., Ji, L., Cheng, J., ve Wong, S. T. C., Automatic dendritic spine analysis in two-photon laser scanning microscopy images, *Cytometry Part A*, Cilt 71, s. 818 - 826, 2007.
- [5] Zhang, Y., Chen, K., Baron, M., Teylan, M. A., Kim, Y., Song, Z., Greengard, P., ve Wong, S. T., A neurocomputational method for fully automated 3d dendritic spine detection and segmentation of medium-sized spiny neurons, *NeuroImage*, Cilt. 50, s. 1472 - 1484, 2010.
- [6] Erdil, E., Yagci, A. M., Argunsah, A. Ö., Yazmín, R. C., Hobbiss, A. F., Israely, I., ve Unay, D., A Tool for Automatic Dendritic Spine Detection and Analysis. Part I: Dendritic Spine Detection Using Multi-Level Region-Based Segmentation, *IEEE Conference on Image Processing Theory and Applications*, s. 167-171, 2012.
- [7] Mimaroglu, S. ve Erdil, E., ASOD: Arbitrary shape object detection, *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, Cilt. 84, s. 1295 - 1299, 2011.
- [8] Son, J., Song, S., Lee, S., Chang, S., ve Kim, M., Morphological change tracking of dendritic spines based on structural features, *Journal of Microscopy*, Cilt 241, s. 261 - 272, 2011.
- [9] Chan, T.F. ve Vese, L.A., Active contours without edges, *IEEE Transactions on Image Processing*, Cilt 10, s. 266 - 277, 2001.
- [10] Mumford, D. ve Shah, J., Boundary detection by minimizing functionals, *IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, s. 137 - 154, 1985.
- [11] Wallis, J.W. ve Miller, T.R., Three-dimensional display in nuclear medicine and radiology, *Journal of Nuclear Medicine*, Cilt 32, s. 534 - 546, 1991.
- [12] Soille, P., *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*, Springer-Verlag, NY, 2003.