

## 2-Foton Mikroskopi Görüntülerinde Otomatik Dendritik Diken Takibi Automated Dendritic Spine Tracking on 2-Photon Microscopic Images

Bike Kılıç\*, Lavdie Rada\*, Ertunç Erdil†, A. Özgür Argunşah‡, Müjdat Çetin†, Devrim Ünay\*,

\*Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bahçeşehir Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Email: bike.kilic@stu.bahcesehir.edu.tr, lavdie.rada@bahcesehir.edu.tr, devrim.unay@bahcesehir.edu.tr

†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

**Özetçe** —Dendritik dikenlerin morfolojilerindeki hızlı ve doğal değişimler bilginin beyinde nasıl saklandığı konusunda önemli ipuçları vermektedirler. Dikenlerin el ile analizi sağlıklı ve hastalar arasındaki farkların anlaşılması için gereklidir. Sinirbilim deneylerinde toplanan çok sayıda ve çeşitli imge verisinin daha detaylı analiz için otomatik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Buna ek olarak, dendritik dikenleri zamanla değişen yapılardır ve floresan mikroskopi ile elde edilen görüntüleri yöntemin optik özelliklerinden ötürü yüksek seviyede gürültü, bulanıklık ve kayma içerir. Bu çalışmada zaman aşımli iki foton mikroskopi görüntü serilerinde dendritik dikenlerin konularını takip ediyoruz. Bu amaçla tespit ve takibi birlikte kullanan bir çerçeve öneriyoruz. Diken tespiti için SIFT temelli bir yöntem, takip için ise imge çakıştırma ile uzaklık temelli diken eşlemeden oluşan bir yöntem kullanıyoruz. Deneysel sonuçlarımız, gürültü ve bulanıklığın görüntüleri bozmasına ve diken tespitini zorlaştırmasına rağmen, önerdiğimiz çerçeve ile zaman serilerinde diken takibinin yapılabildiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler**—İki-foton mikroskopi, dendritik diken takibi, diken tespiti, imge çakıştırma, SIFT özellikleri

**Abstract**—The rapid and spontaneous morphological changes of dendritic spines have been an important observation to understand how information is stored in brain. Manual assessment of spine structure has been a useful tool to understand the differences between wild type (normal) and diseased cases. In order to perform a more thorough analysis, automatic tools need to be developed due to the immense amount of image data collected throughout the experiments. Additionally, dendritic spines are very dynamic structures and fluorescence microscopy contains high level of noise, blur and shift due to the optical properties. In this study, we track locations of dendritic spines in a full series of a time-lapse two photon microscopic images. To achieve this we propose a combined detection and tracking framework. For the detection we use a SIFT based algorithm, while the tracking requires a combination of registration and distance based spine matching. Experimental results show that this technique helps to track detected spines in time series even though the noise or blur deformed the image and complicated the detection.

**Keywords**—2-photon microscopy, dendritic spine tracking, spine detection, image registration, SIFT features

978-1-4799-4874-1/14/\$31.00 ©2015 IEEE

### I. GİRİŞ

Zaman aşımli görüntülerden dendritik diken morfolojisini tanımlamak ve takip etmek nörobiyolojik araştırmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Dendritik dikenlerin hızlı ve spontane morfolojik değişimleri yaygın bir şekilde incelenmiştir[5], [6]. Bellek ve öğrenme gibi bilişsel fonksiyonların işlevi, dendritik dikenlerin morfolojik değişiklikleri ile ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır [7]. Dendritik dikenlerin bu bilişsel fonksiyonlara etkisini çalışmak için zaman aşımli mikroskopik nöron görüntülerinde dikenlerin etkili ve doğru tespiti ve takibi önemlidir. Dikenlerin zamandaki değişimini takip etmek için görüntü çakıştırma temelli bir dizi yarı-otomatik ve otomatik yaklaşım önerilmiştir [1], [2], [3], [4], [8]. Örneğin, Koh *v.d.*[2] imge çakıştırma için çapraz korelasyon tekniği kullanırken; Mosaliganti *v.d.*[4] iki tane nokta kümesindeki farklılıkları en küçülten ve dendritik orta çizgisine dayalı “iteratif en yakın nokta”(ICP) algoritmasını uyguladı. Ancak literatürde uygulanan bu yaklaşımlar hem gürültüye duyarlıdır hem de başarımları en çok 2 – 3 zaman noktalı veride denenmiştir.

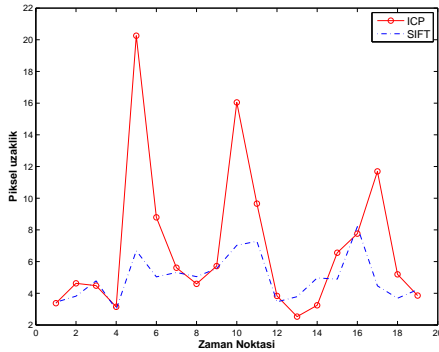
Bu çalışmanın amacı dendritik dikenlerinin zamansal veride tespiti ve takibi için kurguladığımız görüntü işleme temelli çerçeveyi ve ilgili ön-çalışma sonuçlarını sunmaktır. Bu amaçla ilk olarak, Rada *v.d.*[9] tarafından önerilen SIFT temelli tespit algoritması kullanarak zaman serisindeki bütün dendritik dikenler tespit edilir, bunun ardından SIFT temelli imge çakıştırması kullanarak zaman serisinde örtüşen dikenlerin merkez noktaları bulunur. Ardışık görüntülerdeki dikenler arasındaki uzaklıklara bakarak takip edilen, yeni bulunan ve kaybolan dikenler belirlenmektedir.

### II. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dendritik dikenlerin tespiti ve bölütlenmesi için bir çok yöntem kullanılmıştır [2],[8],[10],[12],[13]. Bunların arasında, Rada *v.d.*[9] zamansal görüntülerdeki dendritik dikenlerin tespiti için uygulanan doğruluk payı yüksek (36 farklı diken için ortalama Dice ölçütü 0.82) bir çalışma sundu. Bu çalışmada biri gözetimli diğeri gözetimsiz olan iki farklı tespit tekniği geliştirilmiştir. Gözetimli olmayan teknik nokta iyileştirme filtrelerini ve dendritik iskelet bilgilerini birleştirir. İkinci teknik

önceden işaretlenmiş “ölçeklemeden bağımsız öznitelik dönüşümü”(SIFT)[11] öznitelik tanımlayıcıları kullanarak destek vektör makinesi (SVM) sınıflandırıcısını eğitir ve bu sınıflandırıcıyı yeni görüntülerde dendritik dikenleri tespit etmekte kullanır. Tespit edilen dikenlerin bölütlenmesi için her iki yöntem havuzlama (watershed) algoritması uygular. Elde edilen deney sonuçları iki yöntemin de dikenlerin tespitinde benzer performansa sahip olduğunu gösteriyor, bu sebeple bu çalışmada sunulan takip yaklaşımı yukarıda bahsedilen gözetimli tespit yöntemi üzerine kurulmuştur.

Bu bildirinin temel amacı dendritik dikenlerin zengin bir veri setinde zamansal takibi için bir yaklaşım geliştirmektir. Dendritik dikenlerin hareketliliği veya görüntülerdeki kayma sebebiyle dikenlerin ardışık görüntülerde eşleştirilmesi zor bir problemdir. Bu hedefle dikenlerin zamansal verideki konumunu takip edebilmek için SIFT temelli imge çakıştırma yöntemini uyguladık. Nirengi noktası [14] veya ICP [15] temelli içge çakıştırma gibi farklı yöntemlere kıyasla SIFT temelli yöntemin bazı avantajları vardır: 1)Ardışık görüntülerde dikenlerin merkez noktaları arasındaki ortalama uzaklık SIFT temelli imge çakıştırma yöntemi kullanıldığında sabit kalırken, ICP temelli yöntem kullanıldığında yüksek sapmalar içermektedir (Şekil 1). Nirengi temelli yöntemin [14] sonuçlarının çakıştırılan görüntülerdeki deformasyon ve dolayısıyla yanlış diken tespiti nedeniyle daha kötü olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2). 2) SIFT temelli yöntem yeğinlik gibi yerel bilgileri de hesaba katarken; ICP sadece noktalar arasındaki uzaklığı dikkate alır ve dolayısıyla gürültüye ve yerel değişimlere duyarlıdır. İlerleyen bölümlerde tespit



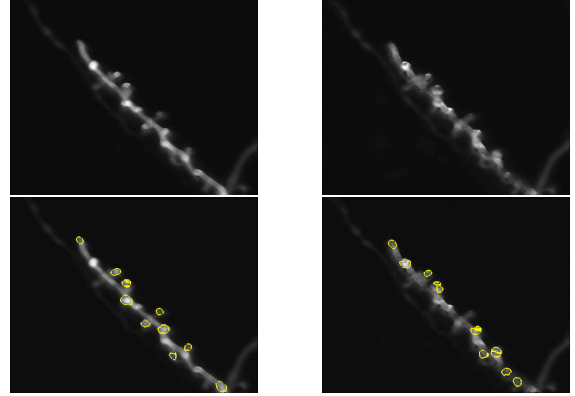
Şekil 1. Zamansal görüntülerde eş dendritik dikenler arasında ortalama toplam mesafe

edilen dendritik dikenlerin herbirinin zamansal veride SIFT imge çakıştırması ve ardından uzaklık temelli eşleştirme uygulanarak dikenlerin takibi için nasıl bir yaklaşımda bulunduğu detaylı anlatılacaktır.

### III. ÖNERİLEN YAKLAŞIM

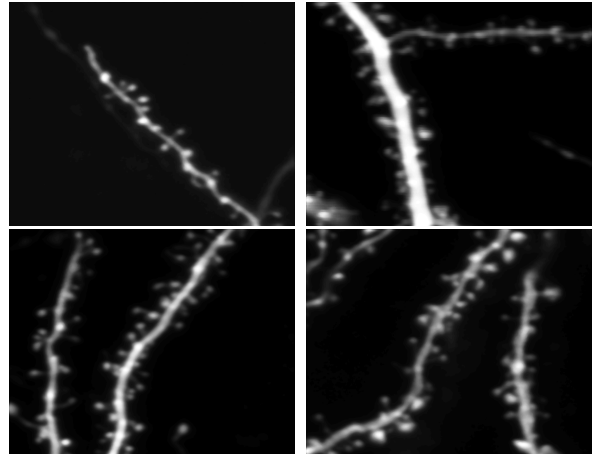
#### A. Dendritik Diken Tespiti

Öncelikle 2-foton mikroskopi kullanılarak elde edilen her zaman noktasına ait 3 boyutlu veri z ek-



Şekil 2. Esnek imge çakıştırması sonrası tespit yöntemi uygulanmış 2-foton mikroskopi görüntüleri. a),c) t=1 ve t=2 görüntülerinin çakıştırılmış hali. b),d) t=2 ve t=3 görüntülerinin çakıştırılmış hali

seni yönünde en yüksek yoğunluk izdüşümü (maximum intensity projection) alınarak 2 boyuta indirgenir. Şekil 3 bu çalışmada kullanılan farklı 2 boyuta indirgenmiş verileri gösterir. Makine öğrenmesi içeren

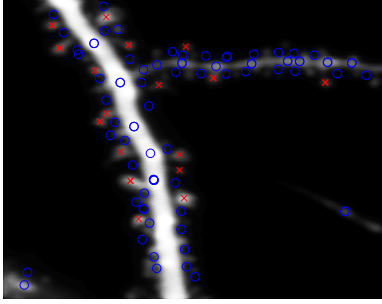


Şekil 3. Deneysel Veri Örnekleri

SIFT temelli yöntemin eğitimi için önceden etiketlenmiş ve test kümesinden farklı dendritik diken görüntüleri kullanılmıştır. Bu veride bulunan SIFT nirengi noktaları bir dendritik diken merkezine denk düşüp düşmediğine göre diken veya değil diye el ile etiketlenir. Daha sonra önceden etiketlenmiş öznitelik vektörlerini kullanarak doğrusal çekirdekli bir SVM sınıflandırıcı eğitilir. Test aşamasında, bu sınıflandırıcı kullanılarak test görüntüsündeki her bir SIFT öznitelik vektörü diken veya değil olarak işaretlenir (Şekil 4’te kırmızı işaretler ile gösterilenler).

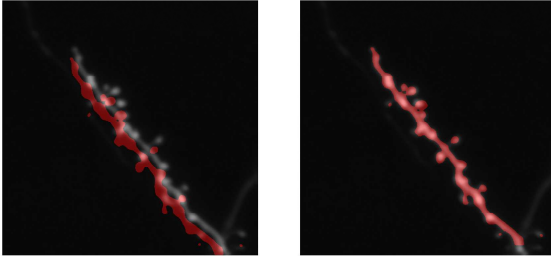
#### B. Tespit Edilen Dendritik Dikenlerin Takibi

Bu bölümde, iki ardışık görüntüde tespit edilmiş dikenlerin aralarındaki ilişkilerin belirlenmesi detaylı anlatılmaktadır.



Şekil 4. SIFT öznelik konumları

1) *SIFT Temelli İmge Çakıştırması*: Dikenlerin ardışık görüntülerdeki konumunu gürbüz biçimde takip edebilmek için görüntüleme aşamasında oluşan kaymaların en aza indirgenmesi yani imge çakıştırması uygulanması gereklidir. Bu amaçla SIFT temelli imge çakıştırması uygulanmıştır. Bu yaklaşımda ilk olarak, tespit edilmiş dikenlerin merkez noktaları ve ilgili SIFT öznelik vektörleri elde edilir. Benzer öznelik vektörleri bulunur (kosinüs benzerliği deneme yanılma ile belirlenmiş eşik seviyesinin altında kalanlar) ve bu vektörlerin konumlarını birleştiren doğruların eğimleri hesaplanır. En fazla görülen eğimin doğru eşleşmeye karşılık geldiği tahminiyle, eğimi farklı doğrular elenerek ideal eşleşmeler belirlenir ve bu eşleşmeler kullanılarak ardışık zaman görüntüleri birbirine çakıştırılır (Şekil 5).



Şekil 5. Ardışık zaman noktalarındaki SIFT temelli imge çakıştırması sonucu

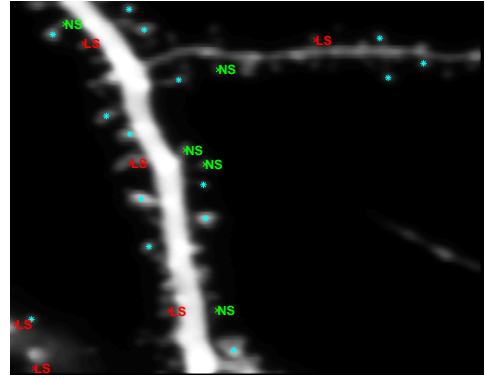
2) *Uzaklık Temelli Eşleştirme*: İmge çakıştırma ile elde edilen değişim vektörü şablon görüntüde önceden tespit edilmiş dikenlerin merkez koordinatlarına eklenir. Ardından ilk anda tespit edilen dikenlerin herbirinin merkez noktası ile ayrı ayrı bir sonraki anda tespit edilenler arasındaki Öklid uzaklık hesaplanır. Kullanıcı tarafından önceden belirlenen uzaklık eşliğini geçen bir sonraki anda tek bir diken varsa bu dikenler eşleştirilir. Uzaklık eşliğini geçen birden fazla diken varsa, en küçük mesafeye sahip olanı seçilir. Eğer eşiki geçen hiç bir diken yoksa ilk an görüntüsündeki diken merkezi kayıp diken olarak işaretlenir. İlk anda tespit edilemeyen takip eden anda bulunan dikenler ise yeni diken olarak tanımlanır.

Diken eşleştirme ardışık görüntülerde olmak üzere tüm zaman serisinde gerçekleştirilir. Her dikenin kaç zaman noktasında takip edildiği hesaplanır ve o veri setindeki toplam zaman noktasına oranlanır.

#### IV. DENEYSSEL SONUÇLAR

Bu çalışmada 30 ila 50 zaman noktası içeren 4 farklı 2-foton mikroskopi veri seti kullanılmıştır.

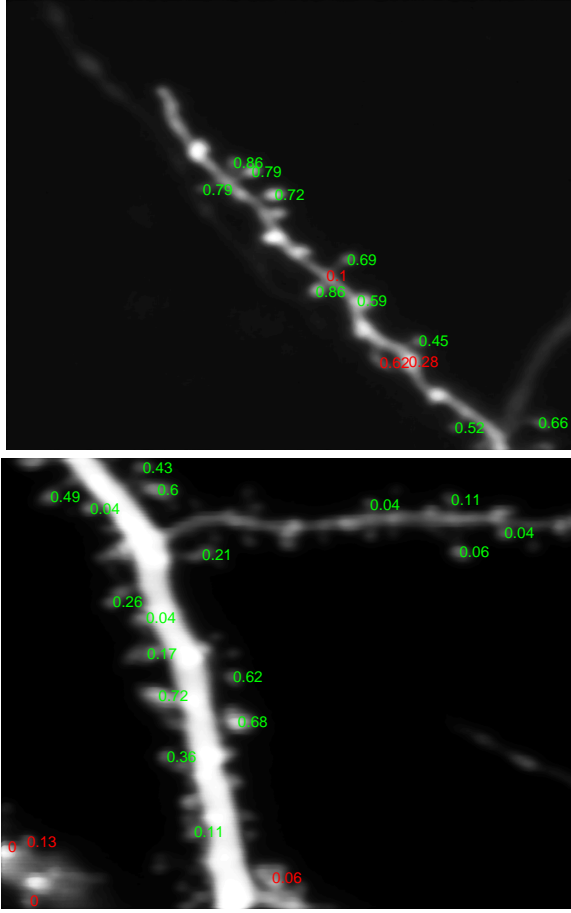
Ardışık iki görüntüdeki diken takibi için örnek bir sonuç Şekil 6'da görülebilir. Önerilen yöntem dikenlerin çoğunluğunu eşleştirmiş (mavi işaretliler), herhangi bir anda tespit edilemeyen az sayıda dikenin de kayıp ('LS' etiketli) ya da yeni ('NS' etiketli) olarak işaretlemiştir. Diken takibi bütün veri setinde tekrar-



Şekil 6. Ardışık zaman noktalarındaki görüntülerde eşleşen/yeni oluşan ve kaybolan dendritik dikenler

lanarak dikenlerin veri seti boyunca tespit ve takip tutarlılığı nicel olarak incelenebilir. Bu çalışmada kullanılan Dataset-1, 29 zaman noktası ve Dataset-2, 37 zaman noktası içerir. Şekil 7'de, Dataset-1'de bütün zaman noktası boyunca dikenlerin ortalama 0.60 (standart sapma = 0.23) oranında takip edildiği görülmektedir. Buna karşılık alttaki sonuçta gözlemlenen görece düşük değerler (ortalama = 0.24, standart sapma = 0.24) diken takibinin görüntüdeki gürültü seviyesinden ve en yüksek yoğunluk izdüşümü sonucu 3 boyut bilgisindeki kayıptan etkilendiğini göstermektedir.

Dataset-1 ve Dataset-2'deki takip sonuçları, uzman tarafından görsel değerlendirilmiş ve gerçek dikenler (Şekil 7'de yeşil ile işaretlenenler) ile diken olmayanlar (kırmızı ile işaretlenenler) belirlenmiştir. Önerilen yöntemin doğru tespit ettiği dikenlerde Dataset-1'de ortalama takip oranı 0.70 iken (Dataset-2'de 0.30) hatalı tespitlerde bu oran daha düşüktür (Dataset-1 = 0.3, Dataset-2 = 0.05). Bu sonuç göstermektedir ki önerdiğimiz takip yöntemi diken tespiti adımının hatalarını telafi etmek için kullanılabilir. Son olarak, Dataset-1'de 16 dikenden 5'inin (hata oranı = 0.30) ve daha gürültülü olan Dataset-2'deki 36 dikenden ise 19'unun (hata oranı = 0.50) kaçırıldığı gözlemlenmiştir. Daha gürbüz ve doğru tespit ve takip yaklaşımlarıyla bu hatalar azaltılabilir.



Şekil 7. Her dikenin takip edildiği zaman nokta sayısının o veri setindeki toplam zaman noktasına oranı ile işaretlenmiş iki örnek sonuç. Uzman görsel değerlendirmesi sonucu gerçek dikenler (yeşil) ile diken olmayanlar (kırmızı) işaretlenmiştir.

## V. VARGILAR

Bu çalışmada zaman aşımli 2-foton mikroskopi görüntülerinde dendritik diken takibi için görüntü işleme temelli bir çerçeve ve ilgili ön-çalışma sonuçları sunulmuştur. Diken takibi için ardışık görüntülerdeki diken merkez noktaları ile SIFT öznelik konum bilgilerini birlikte kullanan, imge karşılaştırma ve uzaklık temelli bir yöntem önerilmiştir.

Bu yapılan çalışmaların verimliliği yanısıra, çalışmamızda bazı kısıtlamalar var. Öncelikle, bazı dendritik dikenlerin bilgileri en yüksek yoğunluk izdüşümü sırasında kaybolmaktadır. İkinci olarak, imge karşılaştırması sırasında sadece dendritik dikenlerin merkez noktaları arasındaki mesafe bilgisi kullanılmıştır; fakat bu yaklaşım birbirine çok yakın dikenler için çalışmayabilir. Bu sebeple, yöntem yeni öznelik vektörleri ile güçlendirebilir. Üçüncü olarak, bu çalışmada dendritik diken tespiti ve takibi ayrı yapılmaktadır. İleride, bu iki prosedürü birleştirerek hem tespit kısmını hem de takip doğruluk derecesini geliştirmek amaçlanmaktadır. Ek

olarak, biyoloğlara daha fazla morfolojik bilgi sağlamak için dendritik dikenlerin tespit ve takibinin üç boyutta gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma 113E603 numaralı Tübitak projesi tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKÇA

- [1] Fan, J., Zhou, X., Jennifer.G, Dy, Zhang, Y. ve Wong,S.T.C, An automated pipeline for dendrite spine detection and tracking of 3D optical microscopy neuron images of in vivo mouse models, Neuroinformatics, Cilt 7(2), s. 113 - 130, 2009.
- [2] Koh, I. ve Lindquist, W., Automated 3D dendritic spine detection and analysis from two-photon microscopy, BiOS 2001 The International Symposium on Biomedical Optic, s. 48-59, 2001.
- [3] Li, Q., Deng, Z., Zhang, Y., Zhou, X., Nagerl, U. V., ve Wong, S.T.C, A global spatial similarity optimization scheme to track large numbers of dendritic spines in time-lapse confocal microscopy, Medical Imaging, IEEE Transactions on, Cilt. 30(3), s. 632-641, 2011.
- [4] Mosaliganti, K., Janoos, F., Xu, X., Machiraju, R., Huang.C ve Wong, S. T. C., Temporal matching of dendritic spines in confocal microscopy images of neuronal tissue sections, MIC-CAI Workshop on Medical Image Analysis with Applications in Biology,s. 106-113, 2006.
- [5] Und, H., Oliver, V.B. , Structure and function of dendritic spines within the hippocampus, Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger,s. 518 - 531, 2009.
- [6] Fischer, M., Kaeck, S., Knutti, D., Matus, A. , Rapid actin-based plasticity in dendritic spines, Neuron,s. 847-854, 1998.
- [7] Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., Noguchi, J., Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition, Trends in neurosciences, Cilt. 33(3), s. 121-129, 2010.
- [8] Son, J., Song, S., Lee, S., Chang, S. and Kim, M., Morphological change tracking of dendritic spines based on structural features, Journal of microscopy, Cilt. 241(3), s. 261-272, 2011.
- [9] Rada, L., Erdil, E., Argunsah, A.O., Unay, D. and Cetin, M., Automatic dendritic spine detection using multiscale dot enhancement filters and sift features, IEEE (Institute of Electrical and Electronics Engineers), 2014.
- [10] Cheng, J., Zhou, X., Miller, E., Witt, R.M., Zhu, J., Sabatini, B.L., Wong, S.T.C, A novel computational approach for automatic dendrite spines detection in two-photon laser scan microscopy, Journal of neuroscience methods,s. 122-134, 2007.
- [11] Lowe.D.G, Distinctive image features from scale-invariant keypoints, International journal of computer vision, Cilt. 60(2), s. 91-110, 2004.
- [12] Al-Kofahi, Y., Dowell-Mesfin, N., and Pace, C., Shain, W., Turner, J.N., Roysam, B., Improved detection of branching points in algorithms for automated neuron tracing from 3D confocal images, Cytometry Part A, Cilt. 73(1), s. 36-43, 2008.
- [13] Zhang, Y., Zhou, X., Witt, R.M., Sabatini, B.L., Adjero, D., Wong, S.T.C., Dendritic spine detection using curvilinear structure detector and LDA classifier, Neuroimage, Cilt. 36(2), s. 346-360, 2007.
- [14] Modersitzki,J., FAIR: Flexible Algorithms for Image Registration, Fundamentals of Algorithms, 2009.
- [15] Low,K.L., Linear least-squares optimization for point-to-plane icp surface registration, 2004.