

3B Dendritik Dikenlerin Parametrik Olmayan Şekil Ön Bilgisi Kullanılarak Bölütlenmesi

3D Dendritic Spine Segmentation Using Nonparametric Shape Priors

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

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

{erdembocugoz, ertuncerdil, mctetin}@sabanciuniv.edu

†Zürich Üniversitesi, Beyin Araştırmaları Enstitüsü, Zürih, İsviçre

argunshah@hifo.uzh.ch

‡İzmir Ekonomi Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği, İzmir, Türkiye

devrim.unay@ieu.edu.tr

Özetçe —2-foton mikroskopi görüntüleme yöntemi kullanılarak elde edilen nöron görüntülerindeki dendritik dikenlerin (spine) zaman içindeki morfolojik ve hacimsel değişimlerinin analizi, sinirbilimi alanındaki araştırmacılar açısından önem taşımaktadır. Dendritik dikenlerin doğru bölütlenmesi, bu analizleri daha gübüz ve güvenilir yapacak otomatik araçların geliştirilmesi sürecinin önemli bir parçasıdır. Bu çalışmada, 3B dendritik dikenlerin bölütlenmesi için parametrik olmayan şekil ön bilgisi kullanan bir yöntem önermekteyiz. Önerdiğimiz yöntem, verilen bir eğitim kümesindeki şekillere Parzen yoğunluk kestiricisi uygulayarak önsel şekil dağılımını öğrenir. Daha sonra, öğrenilen önsel şekil dağılımı ve veri dağılımı Bayesçi çerçevede birleştirilerek sonsal şekil dağılımı elde edilir. Son olarak, elde edilen sonsal dağılımı en büyükleyen bölütleme sonucu etkin çevritler kullanılarak bulunur. Elde edilen ön sonuçlar, şekil ön bilgisi kullanmanın daha iyi 3B dendritik diken bölütlenmeleri elde edilmesine yardımcı olduğunu göstermektedir.

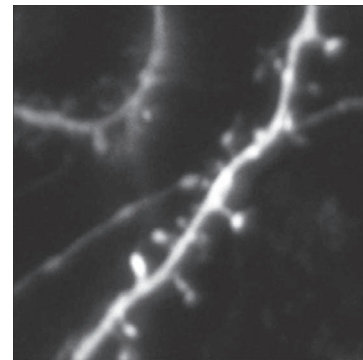
Anahtar Kelimeler—3B dendritik dikenlerin bölütlenmesi, parametrik olmayan şekil ön bilgisi, Parzen yoğunluk kestiricisi, seviye kümeleri.

Abstract—Analyzing morphological and structural changes of dendritic spines in 2-photon microscopy images in time is important for neuroscience researchers. Correct segmentation of dendritic spines is an important step of developing robust and reliable automatic tools for such analysis. In this paper, we propose an approach for segmentation of 3D dendritic spines using nonparametric shape priors. The proposed method learns the prior distribution of shapes through Parzen density estimation on the training set of shapes. Then, the posterior distribution of shapes is obtained by combining the learned prior distribution with a data term in a Bayesian framework. Finally, the segmentation result that maximizes the posterior is found using active contours. Experimental results demonstrate that using nonparametric shape priors leads to better 3D dendritic spine segmentation results.

Keywords—3D dendritic spine segmentation, nonparametric shape priors, Parzen density estimator, level sets.

I. GİRİŞ

Nöronal yapılar ve bu yapıların görevleri arasındaki ilişki, mikroskopi görüntüleme tekniklerinde son yıllarda yaşanan gelişmeler sayesinde, tek bir dendritik diken seviyesinde araştırılabilmektedir [1]–[3]. Dendritik diken, dendrite bağlı olan yuvarlağımsı yapılar olup en büyük yeğlilik izdüşümü (maximum intensity projection) yöntemiyle 2B görüntüye indirilmiş örnek bir 2-foton mikroskopi görüntüsü Şekil 1’de verilmiştir. 2-foton mikroskopi görüntüleme tekniği, hücrenin görüntüleme süresince canlı olarak kalmasını sağlayarak, dendritik dikenlerin zaman içindeki değişiminin görüntülenmesine imkan tanır. Bu yapıların zaman içindeki değişimlerinin incelenmesi, bilginin beyinde nasıl tutulduğu ile ilgili bilgi vermesinin yanında, dendritik diken yapısı ve görevlerindeki bozukluklarla ilişkilendirilen nörogelişimsel hastalıkların anlaşılmasına da katkı sağlayabilir. Dendritik dikenlerin zaman içindeki değişiminin el ile incelenmesi, analizlerin uzun zaman alması ve incelenmesi gereken verinin miktarının çok olması sebepleriyle mümkün değildir. Bu nedenlerle sinirbilimi araştırmacıları, bu analizleri otomatik yapabilecek görüntü işleme araçlarına ihtiyaç duyarlar. Dendritik dikenlerin doğru bir şekilde bölütlenmesi, bu araçların gerçekleştirilmesi beklenen önemli adımlardan biridir.



Şekil 1: En büyük yeğlilik izdüşümü yöntemiyle 2B görüntüye indirilmiş örnek bir 2-foton mikroskopi görüntüsü.

2-foton mikroskopi görüntüleme yöntemi, nöronların 3B ($x \times y \times z$) görüntülenmesine imkan tanımaktadır. Bu sebeple, analiz edilmek istenen görüntülerdeki dendritik dikenler de 3B yapılarıdır. Fakat, özellikle z boyutundaki çözünürlüğün çok düşük olmasından dolayı 3B dendritik dikenlerin bölütlenmesi zorlu bir problemdir. Bu sebeple, literatürdeki bir çok dendritik diken bölütleme algoritması 3B görüntüleri, en büyük yeşinlik izdüşümü yöntemiyle 2B görüntüye indirgeyip, 2B dendritik dikenleri bölütler [4]–[9]. Gerçek şekilleri 3B olan dendritik dikenlerin 2B görüntülere indirgenerek bölütlenmesi, yapılacak olan dendritik diken şekil ve hacim analizlerinde hatalara yol açabilir. 3B görüntülerde yapılan çalışmalarda daha çok 3B görüntülerin geri çatılarak daha iyi görüntüler elde edilmesine ve bu görüntüler üzerinde dendritik diken bölütlemesi yapılmasına yoğunlaşılmıştır [10]–[12]. Geri çatma yapmadan, mevcut 3B görüntü üzerinde dendritik diken bölütlemesi yapan nadir yöntemlerden biri Zhang v.d. [13] tarafından, konfokal mikroskopi ile elde edilen görüntülerdeki dendritik dikenlerin bölütlenmesi için önerilmiştir. Bu yöntem, dendritik diken merkezlerini tespit ettikten sonra, hızlı yürüyüş (fast marching) [14], yöntemiyle dendritik dikenleri bölütler. Konfokal mikroskopi ile elde edilen görüntüler z yönünde daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğu için 2-foton mikroskopi görüntülerine göre daha kolay bir problem oluşturmaktadırlar. Fakat, konfokal mikroskopi sırasında görüntülenen hücre canlı olmadığı için, dendritik dikenlerin zaman içindeki değişimini görüntülemeye imkan tanımaz.

Bu çalışmada, 3B dendritik dikenlerin 2-foton mikroskopi görüntülerinden parametrik olmayan şekil ön bilgisi kullanılarak bölütlenmesini sağlayan bir yöntem önermekteyiz. Parametrik olmayan şekil ön bilgisini kullanan bölütleme yöntemleri ilk olarak Kim v.d. [15] ve Cremers v.d. [16] tarafından önerilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, parametrik olmayan şekil ön bilgisi kullanan bölütleme yöntemleri literatürde daha önce 2-foton mikroskopi ile elde edilen görüntülerdeki 3B dendritik dikenlerin bölütlenmesi için kullanılmamıştır. Önerdiğimiz yöntemin sonuçları ve şekil ön bilgisi kullanmayan, sadece yeşinlik bilgisini kullanan, bir başka bölütleme yönteminin sonuçları, uzmanın el ile yaptığı bölütlemeler ile Dice ölçütü kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sayısal sonuçlar, parametrik olmayan şekil ön bilgisini kullanmanın bölütleme sonuçlarını iyileştirdiğini göstermektedir.

II. YÖNTEM

Verilen bir I imgesi için, bu imgeyi bölütleyen C çevritinin sonsal dağılımı, Bayesçi yaklaşımla

$$p(C|I) \propto p(I|C)p(C) \quad (1)$$

şeklinde yazılabilir. Buradan hareketle, C çevritine bağlı bir enerji fonksiyonu denklem (1)'in negatif logaritması alınarak aşağıdaki şekilde yazılır:

$$E(C) = -\log p(I|C) - \log p(c) \propto -\log p(C|I). \quad (2)$$

Denklem (2)'deki $-\log p(I|C)$ veri terimi için, Mumford-Shah fonksiyonunun, [17] çalışmasında önerilen parçalı sabit versiyonunu kullanılmaktadır. Bu terim, C_{ic} ve C_{dis} sırasıyla C çevritinin içi ve dışı, m_{ic} ve m_{dis} sırasıyla C çevritinin içindeki ve dışındaki ortalama yeşinlik değerleri olmak üzere

$$-\log p(I|C) = \left[\int_{C_{ic}} (I(x) - m_{ic})^2 dx + \int_{C_{dis}} (I(x) - m_{dis})^2 dx \right] \quad (3)$$

denklemlerle yazılır. Denklem (2)'deki $-\log p(C)$ terimi ise eğitim veri kümesinden öğrenilen önsel şekil dağılımının negatif logaritması olup, $p(C)$, Parzen yeşinlik kestiricisi ile aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$p(C) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n k(d_{L_2}(C, C_i), \sigma). \quad (4)$$

Denklem (4)'de, C_1, C_2, \dots, C_n hizalanmış eğitim şekilleri, $k(\cdot, \sigma)$, σ standart sapmalı 1B Gauss fonksiyonu, $d_{L_2}(\cdot, \cdot)$ ise L_2 uzaklık metriğidir.

Bölütleme problemi, Denklem (2)'de verilen enerji fonksiyonunu en küçükleme problemine dönüşmektedir. Bu fonksiyonu en küçükleme için gradyan azalımı yöntemini kullanılmaktadır. Bu sebeple, $E(C)$ enerji fonksiyonunun C çevritine göre türevinin hesaplanması gerekmektedir. $E(C)$, veri ve şekil terimlerinin toplamı şeklinde yazıldığı için bu terimlerin C çevritine göre türevleri ayrı ayrı hesaplanabilir. Buna göre Denklem (3)'ün türevi $-\frac{\partial \log p(I|C)}{\partial C}$ aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$\frac{-\partial \log p(I|C)}{\partial C} = -(I(x) - m_{ic})^2 + (I(x) - m_{dis})^2. \quad (5)$$

Denklem (2)'deki şekil teriminin türevi ise

$$\frac{-\partial \log p(C)}{\partial C} = \frac{1}{p(C)} \frac{1}{\sigma^2} \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n k(d_{L_2}(\phi_C, \phi_{C_i}), \sigma) (\phi_{C_i} - \phi_C) \quad (6)$$

şeklinde hesaplanır. Denklem (6)'daki ϕ_C ve ϕ_{C_i} sırasıyla C bölütleme çevritinin ve i . eğitim şekli C_i 'nin seviye kümesi temsilidir [18]. Seviye kümesi temsilinde, C çevritinin içinde kalan bölgede $\phi_C < 0$, dışında kalan bölgede ise $\phi_C > 0$ olmaktadır. Önerilen bölütleme yönteminde, öncelikle verilen bir C başlangıç çevritinin ϕ_C seviye kümesi temsili hesaplanır. Daha sonra ϕ_C özyineli olarak, α basamak büyüklüğü olmak üzere, $\alpha \frac{\partial E(C)}{\partial C}$ ile güncellenir. Yeterli sayıda özyineleme adımı sonunda ϕ_C istenilen bölütleme sonucuna yakınsar.

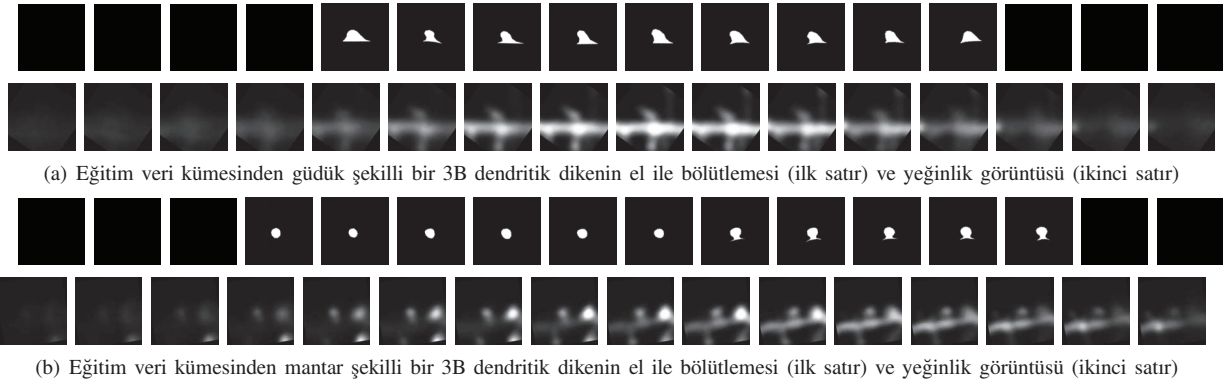
III. DENEYSSEL SONUÇLAR

Bu bölümde 2-foton mikroskopi görüntüleme yöntemiyle elde edilmiş görüntülerdeki 3B dendritik dikenlerin bölütlenmesi için yaptığımız deney sonuçlarını sunuyoruz. Bölütleme sonuçlarının doğruluğu, uzmanın el ile yaptığı bölütlemeler baz alınarak Dice ölçütü [19] ile karşılaştırılmıştır. Dice ölçütü, verilen iki X ve Y kümesi arasındaki benzerliği ölçmektedir. Bölütleme sonuçlarını karşılaştırırken X ve Y sırasıyla, uzmanın el ile yaptığı ve bir algoritma tarafından bulunan bölütleme sonuçlarını gösteren ikili görüntülerdir. Dice ölçütü, $[0, 1]$ aralığında değerler almakta olup, 1 değeri X ve Y kümelerinin tamamen aynı olduğunu göstermektedir. Dice ölçütü

$$D(X, Y) = \frac{2|X \cap Y|}{|X| + |Y|} \quad (7)$$

formülüyle hesaplanmaktadır.

Deneyslerimizde kullandığımız 3B dendritik diken veri kümesi 30 adet dendritik diken görüntüsünden oluşmaktadır. Bu görüntülerin 15 adedi mantar, geriye kalan 15 adedi ise güdük dendritik diken sınıfına aittir. Veri kümesindeki her bir dendritik diken görüntüsü uzman tarafından el ile bölütlenmiştir. Deneyslerimizde kullandığımız eğitim veri kümesi, her bir dendritik diken sınıfından 10 adet olmak üzere, rastgele



Şekil 2: Eğitim veri kümesinden mantar ve güdük dendritik diken sınıfına ait birer 3B dendritik diken örneği. Her bir satırdaki 2B görüntüler, soldan sağa 3B dendritik dikenin z eksenindeki dilimlerini gösterir.

seçilmiş toplam 20 adet ikili 3B dendritik diken görüntüsünden oluşmaktadır. Eğitim veri kümesinden bir mantar bir de güdük şekilli 3B dendritik diken örneği Şekil 2’de verilmiştir. Geriye kalan 5 mantar ve 5 güdük sınıfına ait 3B dendritik dikenlerin görüntüleri test için kullanılmıştır. Test veri kümesi, eğitim veri kümesinden tamamen farklı dendritik diken şekillerinden oluşmaktadır. 3B dendritik dikenlerin bölütlenmesi için önerdiğimiz parametrik olmayan şekil ön bilgisi tabanlı bölütleme yöntemi, sadece yeğinlik bilgisini kullanan, Chan ve Vese tarafından önerilmiş [17] etkin çevritlere dayalı bölütleme yöntemiyle karşılaştırılmıştır.

Tablo I’de deneyler sonucunda elde edilen, Dice ölçütü ile hesaplanmış sayısal sonuçlar gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre, 3B dendritik dikenlerin bölütlenmesi için önerdiğimiz yeğinlik bilgisinin yanında parametrik olmayan şekil ön bilgisini de kullanan bölütleme yöntemi, Chan ve Vese [17] tarafından önerilen ve sadece yeğinlik bilgisini kullanan bölütleme yönteminin sonuçlarını önemli derecede iyileştirmektedir.

TABLO I: DICE ÖLÇÜTÜ SONUÇLARI

	Önerilen Yöntem	Chan ve Vese [17]
Diken 1	0.605	0.006
Diken 2	0.592	0.131
Diken 3	0.492	0.002
Diken 4	0.413	0.014
Diken 5	0.569	0.058
Diken 6	0.497	0.099
Diken 7	0.559	0.136
Diken 8	0.438	0.038
Diken 9	0.457	0.062
Diken 10	0.504	0.002
Ortalama	0.512	0.055

Deneyler sonucunda elde edilen bazı görsel bölütleme sonuçları Şekil 3’te verilmiştir. Şekil 3 (a)’daki görüntüler Diken 2 test görüntüsüne, Şekil 3 (b)’deki görüntüler de Diken 6 test görüntüsüne aittir. Görsel bölütleme sonuçlarına göre önerdiğimiz yöntem, [17] yöntemine göre daha doğru bölütlemeler oluşturmaktadır. Chan ve Vese tarafından önerilen [17] yöntemi sadece görüntülerdeki yeğinlik bilgilerini kullanarak görüntüyü parlak ve koyu olmak üzere 2 bölgeye ayırdığı için, bölütleme sonuçlarına parlak olan bütün bölgeleri dahil etme eğilimindedir. Önerdiğimiz, parametrik olmayan şekil ön bilgisi kullanan bölütleme yöntemi ise evrilen çevritin

dendritik diken şekline çok fazla uzaklaşmasına izin veremeyerek veriden kaynaklanan yanlış yönlendirmelerin önüne geçer. Böylece önerdiğimiz yöntem 3B dendritik diken şekline daha yakın bölütleme sonuçları üretir.

IV. VARGILAR

Bu bildiriye, 3B dendritik dikenlerin bölütlenmesi için parametrik olmayan şekil ön bilgisi kullanan bir bölütleme yöntemi önerilmiştir. Önerdiğimiz yöntemin 3B dendritik diken veri kümesi üzerindeki ön sonuçları sunulmuştur. Önerilen yöntemin, sadece yeğinlikten elde edilen bilgiyi kullanan yöntemle göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

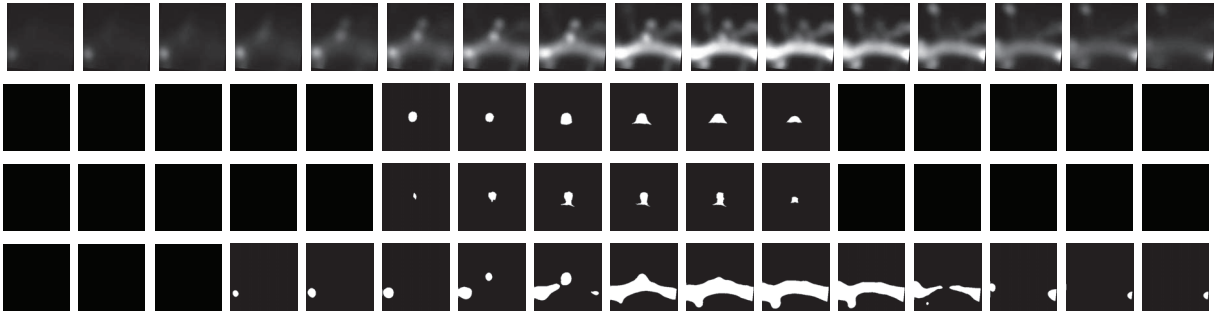
3B dendritik diken bölütlemesi probleminin en büyük zorluklarından biri veriden elde edilen bilginin çok limitli olmasıdır. Veriden gelen limitli bilgi, şekil bilgisinin de yerince etkin bir şekilde kullanılmasını engellemektedir. Bu yüzden ilerleyen çalışmalarımızda daha karmaşık veri terimlerini kullanmayı planlamaktayız [20], [21]. Bu problemdeki bir diğer zorluk ise dendritik dikenlerin birbirine şekil olarak benzeyen farklı sınıflara ait olmasıdır. Dendritik dikenlerin bu özelliği, şekil önsel dağılımının, Parzen yoğunluk kestiricisinde olduğu gibi, şekiller arası uzaklıkların ölçülerek kestirilmesini zorlaştırmaktadır. [9] çalışmasında olduğu gibi görüntülerden farklı öz nitelikler çıkarıp, öznitelik ve şekil ortak yoğunluğunu kestirmek, daha iyi bölütleme sonuçları elde edilmesine yardımcı olabilir.

TEŞEKKÜR

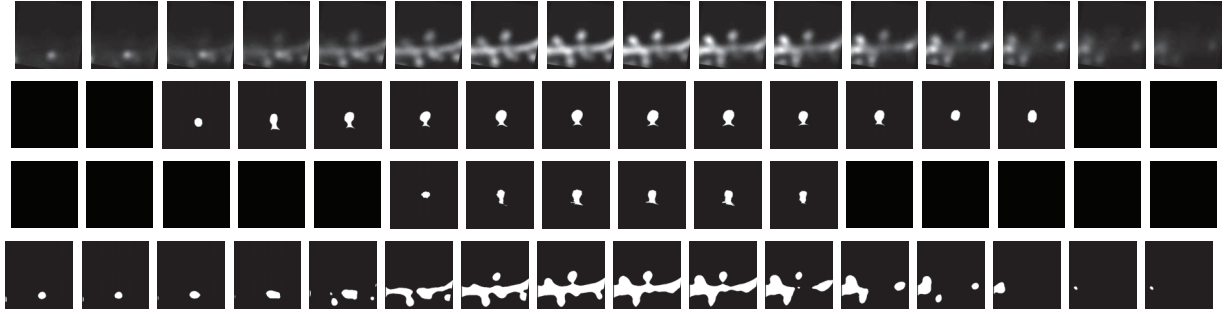
Bu çalışma 113E603 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] M. Matsuzaki, N. Honkura, G. C. Ellis-Davies, and H. Kasai, “Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines,” *Nature, cilt 429, syf. 761–766*, 2004.
- [2] A. Govindarajan, I. Israely, S.-Y. Huang, and S. Tonegawa, “The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent ltp,” *Neuron, cilt 69, syf. 132–146*, 2011.
- [3] J.-i. Tanaka, Y. Horiike, M. Matsuzaki, T. Miyazaki, G. C. Ellis-Davies, and H. Kasai, “Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines,” *Science, cilt 319, syf. 1683–1687*, 2008.



(a) Diken 2 test görüntüsüne ait görsel sonuçlar. İlk satır: yeğlilik görüntüsü, ikinci satır: uzmanın el ile yaptığı bölütlemeler, üçüncü satır: önerilen yöntemin bölütleme sonuçları, dördüncü satır: [17] yönteminin bölütleme sonuçları.



(b) Diken 6 test görüntüsüne ait görsel sonuçlar. İlk satır: yeğlilik görüntüsü, ikinci satır: uzmanın el ile yaptığı bölütlemeler, üçüncü satır: önerilen yöntemin bölütleme sonuçları, dördüncü satır: [17] yönteminin bölütleme sonuçları.

Şekil 3: Mantar ve güdük dendritik diken sınıfına ait birer 3B dendritik diken test görüntüsüne ait görsel sonuçlar. Her bir satırdaki 2B görüntüler, soldan sağa 3B dendritik dikenin z eksenindeki dilimlerini gösterir.

- [4] W. Bai, X. Zhou, L. Ji, J. Cheng, and S. T. Wong, "Automatic dendritic spine analysis in two-photon laser scanning microscopy images," *Cytometry Part A*, cilt 71, syf. 818–826, 2007.
- [5] J. Cheng, X. Zhou, E. Miller, R. M. Witt, J. Zhu, B. L. Sabatini, and S. T. Wong, "A novel computational approach for automatic dendrite spines detection in two-photon laser scan microscopy," *Journal of neuroscience methods*, cilt 165, syf. 122–134, 2007.
- [6] E. Erdil, A. M. Yagci, A. Ö. Argunşah, Y. Ramiro-Cortés, A. F. Hobbiss, I. Israely, and D. Unay, "A tool for automatic dendritic spine detection and analysis. part i: Dendritic spine detection using multi-level region-based segmentation," in *International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA)*, syf. 167–171. IEEE, 2012.
- [7] E. Erdil, A. O. Argunşah, T. Tasdizen, D. Unay, and M. Cetin, "A joint classification and segmentation approach for dendritic spine segmentation in 2-photon microscopy images," in *International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, syf. 797–800. IEEE, 2015.
- [8] E. Erdil, A. Ö. Argunşah, D. Ünay, and M. Çetin, "A watershed and active contours based method for dendritic spine segmentation in 2-photon microscopy images," in *Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU)*, syf. 1–4. IEEE, 2013.
- [9] E. Erdil, L. Rada, A. O. Argunşah, I. Israely, D. Unay, T. Tasdizen, and M. Cetin, "Nonparametric joint shape and feature priors for segmentation of dendritic spines, syf. 343–346," in *2016 IEEE 13th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, April 2016.
- [10] A. Rodriguez, D. B. Ehlenberger, D. L. Dickstein, P. R. Hof, and S. L. Wearne, "Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images," *PLoS one*, cilt 3, 2008.
- [11] S. Wearne, A. Rodriguez, D. Ehlenberger, A. Rocher, S. Henderson, and P. Hof, "New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales," *Neuroscience*, cilt 136, syf. 661–680, 2005.
- [12] F. Janoos, K. Mosaliganti, X. Xu, R. Machiraju, K. Huang, and S. T. Wong, "Robust 3d reconstruction and identification of dendritic spines from optical microscopy imaging," *Medical image analysis*, cilt 13, syf. 167–179, 2009.
- [13] Y. Zhang, K. Chen, M. Baron, M. A. Teylan, Y. Kim, Z. Song, P. Greengard, and S. T. Wong, "A neurocomputational method for fully automated 3d dendritic spine detection and segmentation of medium-sized spiny neurons," *Neuroimage*, cilt 50, syf. 1472–1484, 2010.
- [14] J. A. Sethian, "A fast marching level set method for monotonically advancing fronts," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, cilt 93, syf. 1591–1595, 1996.
- [15] J. Kim, M. Çetin, and A. S. Willsky, "Nonparametric shape priors for active contour-based image segmentation," *Signal Processing*, cilt 87, syf. 3021–3044, 2007.
- [16] D. Cremers, S. J. Osher, and S. Soatto, "Kernel density estimation and intrinsic alignment for shape priors in level set segmentation," *International journal of computer vision*, cilt 69, syf. 335–351, 2006.
- [17] T. F. Chan and L. A. Vese, "Active contours without edges," *IEEE Transactions on image processing*, cilt 10, syf. 266–277, 2001.
- [18] J. A. Sethian, *Level set methods and fast marching methods: evolving interfaces in computational geometry, fluid mechanics, computer vision, and materials science*. Cambridge university press, cilt 3, 1999.
- [19] L. R. Dice, "Measures of the amount of ecologic association between species," *Ecology*, cilt 26, syf. 297–302, 1945.
- [20] A. Soğanlı, M. G. Uzunbaş, and M. Çetin, "Combining learning-based intensity distributions with nonparametric shape priors for image segmentation," *Signal, Image and Video Processing*, cilt 8, syf. 789–798, 2014.
- [21] F. Mesadi, M. Cetin, and T. Tasdizen, "Disjunctive normal shape and appearance priors with applications to image segmentation," in *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, syf. 703–710. Springer, 2015.