

**T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜNDE OTOMATİK  
HÜCRE SAYIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ali Furkan KAMANLI**

**Enstitü Anabilim Dalı : ELEKTRİK-ELEKTRONİK  
MÜHENDİSLİĞİ**  
**Enstitü Bilim Dalı : ELEKTRONİK**  
**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gökçen ÇETİNEL**

**Mayıs 2015**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜNDE OTOMATİK  
HÜCRE SAYIMI

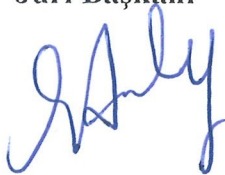
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali Furkan KAMANLI

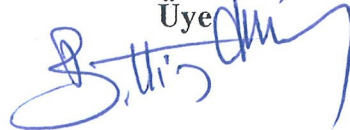
Enstitü Anabilim Dalı : ELEKTRİK-ELEKTRONİK  
MÜHENDİSLİĞİ  
Enstitü Bilim Dalı : ELEKTRONİK

Bu tez ... / ... /2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr.  
Gökçe CETİNEL  
.....  
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Burhanettin  
DURMUŞ  
.....  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Nilüfer YURTA  
.....  
Üye



## **BEYAN**

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Ali Furkan KAMANLI

15.05.2015

## ÖNSÖZ

Günümüzde sağlık alanındaki en ufak bir gelişme dahi büyük önem taşımaktadır. Sağlıklı ve sağlıksız insanlardaki hücre durumunun kontrol edilebilmesi birçok tedavinin temelini oluşturarak hayati önem kazanmıştır. Bu alanda yapılan her çalışma bir yapıtaşını niteliğinde Tıp alanında birçok yeniliğe kapı açabilmektedir. Ülkemizde bu konunun işlenmesi kaçınılmaz hale gelerek klinik uygulamaların teknoloji ile birleştirilmesi kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu sayede zor ve yorucu olan birçok işlem çok kısa zamanda çözülebilmektedir.

Yüksek lisans tez çalışması süresince her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Gökçen ÇETİNEL'e ve çalışmalarına destek veren, maddi manevi desteklerini esirgemeyen babam Prof. Dr. Ayhan KAMANLI, annem Fatma Meltem KAMANLI'ya ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	iv
ÖZET.....	vi
SUMMARY .....	vii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2.	
OTOMATİK HÜCRE SAYIMI.....	16
2.1. Görüntünün Kanallarına Ayrılması .....	19
2.2. Filtreleme .....	20
2.3. Eşikleme.....	28
2.4. Histogram Bölütleme ve Analizi.....	32
2.5. Maksimum Nokta Analizi .....	36
BÖLÜM 3.	
BENZETİM SONUÇLARI.....	38
BÖLÜM 4.	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	67
KAYNAKLAR .....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	77

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ANNs-YSA	: Yapay sinir ağıları
BLPF	: Butterworth alçak geçiren filtre
GLPF	: Gauss alçak geçiren filtre
HKH	: Hemotopoetik kök hücre
HSI	: Yoğunluk uzay
ILPF	: İdeal alçak geçiren filtre
KKH	: Kanser kök hücresi
LoG	: Laplace-Gauss
PCA	: Temel Bileşen analizi
RGB	: Renkli görüntü
RM	: Bölge birleştirme
TM	: Şablon eşleştirme

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Hematopoetik sistem ve hücresel elemanları.....	6
Şekil 1.2. Büyük ölçekli görüntüde bölütleme örneği.....	11
Şekil 2.1. Otomatik hücre sayımı algoritması blok diyagramı.....	16
Şekil 2.2. Kök hücre fluoresans görüntüsü.....	19
Şekil 2.3.(a)-(h) RGB görüntülerin, kırmızı(red), mavi(blue), yeşil(green) kanallar.	20
Şekil 2.4. Piksel'e göre oluşturulmuş test deseni.....	22
Şekil 2.5. ILPF'nin yarıçapa bağlı gösterimi.....	24
Şekil 2.6. Butterworth alçak geçiren filtre için çeşitli gösterim şekilleri.....	25
Şekil 2.7. (a) Asıl görüntü. (b)-(f) 2.Derecedeki BLPF uygulanması.....	26
Şekil 2.8. (a)-(d) 1, 2, 5 ve 30. Derecelerdeki BLPF'lerin uzamsal gösterimleri....	27
Şekil 2.9. GLPF transfer fonksiyonunun perspektif çizimi.....	28
Şekil 2.10. (a) Orijinal görüntü, Gauss (b) öncesi, (c) sonrası.....	28
Şekil 2.11. Gauss filtresi kombinasyonları.....	28
Şekil 2.12. Fluoresans görüntü.....	32
Şekil 2.13. Eşikleme yapılmış Yeşil kanal Fluoresans görüntü karşılaştırması.....	32
Şekil 2.14. Grilik seviyesi gösterimi. 8-bit, 256 gri seviye içerir.....	34
Şekil 2.15. (a) Koyu görüntü histogramı (b) açık görüntü histogramı.....	35
Şekil 2.16. (a) Düşük kontrastlı görüntü (b) yüksek kontrastlı görüntü.....	35
Şekil 2.17. Histogram genişletme örneği.....	36
Şekil 2.18. Histogram bölütleme.....	37
Şekil 2.19. Histogram analizi ile hücre maksimum noktası ve sınır belirlenmesi...	38
Şekil 3.1. Fluoresans görüntü örneği.....	40
Şekil 3.2. Hatalı alınmış görüntü durumları.....	41
Şekil 3.3. Fluoresans görüntü örneği.....	42
Şekil 3.4. Üst üste gelen hücrelerin bulunduğu Flüoresans görüntü örneği.....	43
Şekil 3.5. Sayılamayan kümelenmiş hücre içeren Flüoresans görüntü örneği.....	44
Şekil 3.6. Flüoresans görüntü örneği.....	45

Şekil 3.7. Çok sayıda hücre içeren Flüoresans görüntü örneği.....	46
Şekil 3.8. Hücre sınırları üst üste gelen Flüoresans görüntü örneği.....	47
Şekil 3.9. Flüoresans görüntü örneği.....	48
Şekil 3.10. Çok sayıda hücre içeren Flüoresans görüntü örneği.....	49
Şekil 3.11. Düşük gürültü içeren Flüoresans görüntü örneği.....	50
Şekil 3.12. Az parlaklık içeren Flüoresans hücre görüntüsü.....	51
Şekil 3.13. Yüksek ve düşük parlaklık içeren Flüoresans görüntü örneği.....	52
Şekil 3.14. Flüoresans görüntü örneği.....	53
Şekil 3.15. Çok sayıda hücre içeren Flüoresans görüntü örneği.....	54
Şekil 3.16. Hücre yığını içeren Flüoresans görüntü örneği.....	55
Şekil 3.17. Çok sayıda hücre içeren görüntü örneği.....	56
Şekil 3.18. Flüoresans görüntü örneği.....	57
Şekil 3.19. Ayrılma aşaması içeren Flüoresans görüntü örneği.....	58
Şekil 3.20. Yüksek gürültü içeren Flüoresans görüntü örneği.....	59
Şekil 3.21. Uzak mesafeden çekilmiş Flüoresans görüntü örneği.....	60
Şekil 3.22. Yüksek gürültü içeren Flüoresans görüntü örneği.....	61
Şekil 3.23. Göz ile sayılması mümkün olmayan Flüoresans görüntü örneği.....	62
Şekil 3.24. Hücre çekirdek parlaklığı az olan Flüoresans görüntü örneği.....	63
Şekil 3.25. Hücre yığını içeren Flüoresans görüntü örneği.....	64
Şekil 3.26. Flüoresans görüntü örneği.....	65



## ÖZET

Bu çalışmada mikroskop görüntüsü altında otomatik bir hücre sayım yöntemi sunulmuştur. İlerleyen bölümlerde de ayrıntılı bir şekilde açıklandığı gibi hücre sayımı, uzman bir kişi tarafından mikroskop merceğine sürekli bakılarak veya otomatik hücre sayımı yöntemleri kullanılarak yapılabilmektedir. Sayım uzman bir kişi tarafından yapıldığında oldukça yorucu uzun süren ve düşük doğruluklu bir işlem haline gelmektedir. Ayrıca farklı uzmanlar tarafından aynı hücre görüntüsünden farklı sayım sonuçları elde edilebilmektedir. Doğru sayım sonuçları elde etmek için mikroskop odağı da oldukça önemlidir. Mikroskop parametreleri doğru bir şekilde ayarlanmadıysa hücre sayımında önem taşıyan hücre kenarları bulanıklaşıp gölgelenebilir ve hücre sayımı oldukça zorlaşır. Bir görüntüde çok sayıda hücre olmasından kaynaklanan örtüşme problemi de sayımı zorlaştıran bir diğer problemdir. Hücrelerin gözle seçilebilir hale gelmesi için kullanılan bazı boyama teknikleri vardır. Boyama sonucu hücre merkezi açık, kenarları ise koyu renk olmaktadır. Ancak konsantrasyon fazla olduğunda iki veya daha fazla parlak kısım örtüşebilir ve bunun sonucu sayım zorlaşır ve doğruluğunu kaybeder. Yukarıda bahsedilen tüm problemler hücre sayımının otomatik bir şekilde yapılmasını ve sunulan sayım yöntemlerinin iyileştirilmesini gerektirir.

Bu tezde, flüoresans mikroskop görüntüsü altında aşama aşama otomatik hücre sayımının nasıl yapıldığı açıklanmaktadır. Hücre görüntüsünde gürültü gibi istenmeyen bileşenleri kaldırmak için bir ön işleme adımı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sırasıyla histogram bölütleme, histogram analizi ve maksimum nokta analizi gibi görüntü işleme teknikleri uygulanarak otomatik hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sunulan yöntemin etkinliğinin test edilmesi için simülasyon programları vasıtasıyla birçok sayım yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, sunulan yöntemin başarıya ulaştığını ve gelecek vadeden bir çalışma olduğunu göstermektedir.

# **AN AUTOMATIC EMBRYONIC STEM CELL COUNTING METHOD**

## **SUMMARY**

Keywords: cell, embryonic stem cell, image processing, cell counting, cell detection,

In this thesis, automatic cell counting method under microscopy is proposed. As discussed in the following sections in details, the counting process can be performed in two ways: The manual counting in which a specialist counts the cells with naked eye, the automatic counting that utilizes the computer-based techniques. The counting process becomes exhausting, long and incorrect when the counting performed by specialist. Even though same cell image taking into account if it's counted by the different specialist, different results can be obtained from them. The focus of the microscopy is quite important to generate the correct images. If the microscopy parameters are incorrect the edges of the cells will be shady and some cells cannot be counted manually. Overlap is another difficulty that causes from the presence of many cells in a single scene. Therefore manual counting becomes slower, inaccurate and demanding task with naked eye. There are several techniques for dying the cells to turn them visible with naked eye. However, if the concentration is more than normal, two or more lighter points can overlap which causes the difficult and inaccurate cell counting. Because of the all above mentioned problems, the cell counting process must be performed automatically and the proposed automatic cell counting methods must be improved.

In this study an automatic cell counting method under fluorescence microscopy has been discussed. The pre-processing step is used to eliminate the undesired components (noise) from the input images. Then, image processing technique as a histogram partitioning, histogram analysis and maximum point analysis are utilized respectively. To evaluate the effectiveness of the proposed study several computer simulations are performed. Simulations results show that the proposed method gives promising results.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Otomatik hücre sayımı tıp alanından gıda alanına birçok bölümde insan sağlığı için temel olarak gerçekleştirilen uygulamalarda yer bulmaktadır. Dikkat çekici uygulama alanları için örnekler verilebilir: Gıda alanında süt, peynir vb. ürünler içerisindeki yararlı veya zararlı bakterilerin sayılarak ürün hakkında gerekli olan tüm bilgilerin toplanması sağlanmak amacıyla meyve ve sebze gelişiminin takibinde kullanılmaktadır. Süt sığırcılığının en önemli problemlerinden birisi, hayvanda oluşan meme yangıdır(mastitis). Yetiştirici, bu rahatsızlığı ineğin memesinde şişme, kızarıklık ve sütün yapısında meydana gelen bozukluklarla (gözle) fark edebilmektedir. Bu tip mastitis vakalarında veteriner müdahalesi ile gereken tedavi yapılmaktadır. Eğer bu yapılmaz ise o memenin körelmesi ve hatta sürüdeki diğer ineklere bulaşarak sürü problemi olarak karşımıza çıkması da mümkündür. Ancak mastitis hastalığı, memede şişme kızarıklık ve sütün yapısında gözle görülebilen değişiklikler vermeden de gizli olarak seyredilmektedir. Ancak bu tip mastitiste, sütün yapısında yapılacak bazı testlerle belirlenebilecek değişiklikler olmaktadır. Ancak yetiştirici bu testleri bilmediği ve uygulaması bilgiye dayandığı için kullanamamaktadır. Meme hastalıklarının gelişmesinde pek çok faktör söz konusu olup ineğin hassasiyeti de ayrı bir faktördür. Bu nedenle bireysel süt örnekleri, somatik hücre sayısının takibi ile hassas olanların belirlenmesi mümkün olmaktadır. Sütte bulunan somatik hücreler temel olarak mikroskopla sayılmaktadır. Ancak bu iş uzmanlık gerektirdiği ve zaman alıcı bir iş olduğu için son yıllarda çeşitli cihaz tabanlı metotlar da geliştirilmiştir.

Otomatik hücre sayımının en yaygın kullanıldığı alan Tıp alanıdır. Tıp alanında ise otomatik hücre sayımının önem kazanmasının nedenlerinden biri teşhis ve tedavi aşamasında sağladığı katkılardır. Hücre sayımı sağlıklı bireylerde kontrol amaçlı kullanıldığından önem taşımaktadır. Herhangi bir hastalığa erken teşhis konulabilmesin olanak sağlamaktadır. Hücrelerin iç ve dış ortamda sayılabilmemesinin

getirileri teşhis aşaması ile başlamaktadır. Teşhis aşaması için hücre sayımı yapılarak hastalık hakkında detaylı bilgiyi uzman kişilere ulaştırmak mümkündür. Sağlık ile ilgili tüm sorunlar teşhis ile başladığından hastalığın teşhisinin hızlanması hayati önem taşımaktadır. Teşhisin hızlanması müdahale zamanının kısalması anlamına gelmektedir. Tedavi sürecinde ise uygulanması gereken tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Hücre sayımı ile çıkarılan bilgiler doğrultusunda doz ve süre konusunda uzman kişiler karar verebilmektedir. Hücre sayım işlemi çok uzun zamandır tıp alanının ayrılmaz bir parçası olmuştur. Fakat hücre sayımı çıplak göz ile yapılmakta ve bir uzman gerektirmektedir. Çok uzun ve yorucu bir süreç olan hücre bölünme aşamalarını çok dikkatli bir şekilde kontrol etmek gerektiğinden oldukça yorucudur. Fakat insan gözünün yorulması ile birlikte hücre sayımı sonuçları her uzman tarafından farklı kaydedilebilmektedir. Bu işlemin otomatik olarak gerçekleştirilmesi hata oranını azaltarak teşhis, tedavi ve kontrol aşamalarında doğru sonuca ulaşma olasılığını artırmaktadır.

Verilebilecek en önemli uygulama alanlarından biri de kan testleridir. Kan sayımı testlerinde birçok değere bakılır. Bunların bir kısmı önemli ve klinik olarak tanı koymada anlamlı iken klinik önemi fazla olmayan birçok parametrede kan sayımı testinde çalışılmaktadır. Kan sayımından kasıt, kanın yapısında bulunan özel kan hücrelerinin sayısının tespitidir. Hücre sayıları uzman tarafından çıplak göz ile veya otomatik hematoloji analizörleri ile belirlenebilir. İster göz ile ister otomatik metodlar ile yapılsın, sayımların doğruluğu ve kesinliği kan örneğinin doğru bir şekilde seyreltilmesine ve örneğin doğru ölçümüne bağlıdır. Kan çok sayıda farklı hücre içerdiğinden, doğru analiz için genellikle örneğin hücre tipine göre seyreltilmesi gerekir. Eritrositler izotonik bir çözelti ile seyreltilir. Lökosit ve trombosit sayımlarında ise eritrosit sayısı fazla olduğundan eritrositleri parçalayan bir seyrelti kullanılması sayımı kolaylaştırır. Seyreltilmenin derecesi de hücre tipine bağlıdır. Genel olarak eritrosit sayımı lökosit sayımından daha fazla seyreltme gerektirir. Çünkü lökosit sayısı eritrosit sayısından daha azdır. Hücre sayımlarındaki hatalar primer olarak örnek ölçümü, seyreltme veya hücre sayımı aşamalarındaki yanlışlıklardan kaynaklanır. Çok fazla sayıda örnek incelenebildiğinde kesinlik derecesi çok daha yüksek olur. Otomatik yöntemler çok fazla sayıda hücre ölçtüğünden ve istatistiksel hatanın çok az olmasından dolayı uzman tarafından

gerçekleştirilen yöntemlere göre çok daha üstündür. Hatalar genel olarak örneğin yapısından, uzmanın tekniğinden ve hatalı ekipmandan kaynaklanabilir. Sayım hacmindeki hücre dağılımına bağlı hatalara saha hataları adı verilir ve sadece daha fazla hücrenin sayılmasıyla en aza indirilebilir.

Hücre sayımı klinik araştırmalarda bir çok alanda yer almaktadır. Bunların başlıcaları patolojik, endoskopik, biyopsi yapılması gereken ve birçok çeşidi olan kanserlerin araştırılmasıdır. Günün en önemli hastalıklarından biri olan kanserin araştırılmasında kanserli doku hakkında bilgi edinebilmek büyük önem taşımaktadır. Kök hücre çalışmalarında kullanılarak kök hücrelerin her alanda (teşhis, tedavi) nasıl kullanılacağını anlamak içinde temel adımı oluşturmaktadır. Kök hücre tedavisinde bebeklerden, yetişkinlere kadar birçok organ yetmezliği ve doku hasarı sorunları çözebilmektedir.

Kök hücreler, kendisini yenileyebilme yeteneğine ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Bu dönüşüm, farklı gelişim evrelerinden elde edilen hücrelerde farklı derecelerde gözlenmektedir.

İki haploit gamet hücresinin (sperm ve yumurta) birleşmesiyle oluşan zigotun (totipotent) birbirini izleyen bölünmeleriyle blastokist oluşur ve bu aşamadaki hücreler bütün organizmayı oluşturmak üzere çoğalarak, farklılaşırlar. İnsanda 4-6 günlük bir blastokistin iç hücre kitlesinde yer alan bu hücreler embriyonik kök hücrelerdir bunlar, tüm germ tabakalarını (ektoderm, mezoderm, endoderm) ve onlardan köken alacak sistemleri oluşturabilme yeteneğindedirler (pluripotent). Embriyonik gelişimin ilerleyen dönemlerinde hücreler, uterus duvarına implante olana kadar pluripotent (yaklaşık 200 farklı tipte hücreye farklılaşabilme); implantasyondan sonra ise multipotent (üç germ tabakasına ait hücrelerden bazılarına farklılaşabilme) özelliği kazanırlar. Bu multipotent hücreler, gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fötal, prenatal, postnatal, çocukluk, yetişkinlik, v.b.), gerektiğinde çoğalıp farklılaşmak üzere, çeşitli dokularda (kemik iliği, yağ, kas, v.b.) varlıklarını devam ettirirler. Bunlara yetişkin kök hücreler denir ve embriyonik kök hücrelere göre sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilirler (pluripotent ya da multipotent).

Sağlıklı bir hücre, kanser hücresine dönüşür için arka arkaya ve çok sayıda genetik mutasyon geçirmesi durumunda kanser hücresine dönüşür. Telomer kısalması nedeniyle sınırlı bölünme kapasitesine sahip hücrelerin bu büyük genetik değişimi nasıl gerçekleştirdiği ve bu farklılaşma sürecini kısa yaşam süresine nasıl sığdırdığı, uzun yıllar boyunca merak edilen bir soru olmuştur [12, 14]. Bu soru, 2000'li yılların başında yanıt bulmuş ve ilk olarak akut myeloid lösemi hastalarında tanımlanan bir hücre topluluğunun kanserleşme mekanizmasını başlattığı fark edilmiştir. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip olmaları nedeni ile çok hızlı bir şekilde çoğalabilen bu hücreler, kanser kök hücreleri (KKH) olarak adlandırılmışlardır [5, 14].

Bazı solid kanser türlerinde de (meme kanseri, prostat kanseri, v.b.) hücre kitlesi içinde kök hücre özelliklerini barındıran belli sayıda KKH bulunmaktadır. Bunlar kendini yenileme ve çoğalma özellikleri sayesinde çoğalarak tümör kitlesinin yeniden ortaya çıkmasına ve büyümesine neden olmaktadır. Aşağıda, kanser kök hücreleri ile normal kök hücreler arasındaki benzerlikler özetlenmiştir [1].

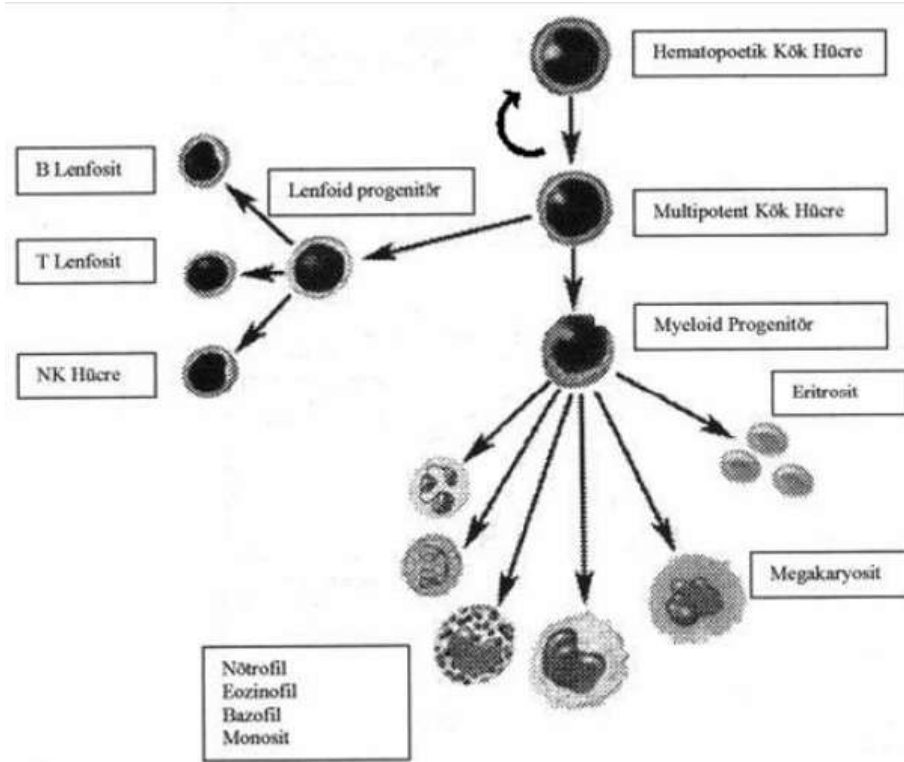
1. Kendini yenileme için kullanılan ortak sinyal yolları (Wnt, Sonic Hedgehog)
2. Oct4 ve Sox2 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu
3. Uzamış telomer boyu ve yüksek telomeraz aktivitesi sayesinde artmış hücre yaşamı
4. Anjiyojenik faktörler salgılayarak anjiyogenezi uyarmak
5. Metastaz ve belli bir bölgeye yerleşme (homing) ile ilgili ortak yüzey reseptörlerine sahip olmak.

İnsan vücudunda en hızlı şekilde izlenebilen Hemotopoetik kök hücreler(HKH) hakkında bilgi sahibi olunması bir zorunluluk haline gelmiştir. Hematopoetik sistem özel fonksiyonları olan birçok hücreden oluşmaktadır. Eritrositler dokulara oksijen taşımakla görevlidirler. Megakaryositlerden köken alan trombositler hemostazda rol alan hücrelerdir. Granülositik hücreler (nötrofil, bazofil ve eozinofiller) ve makrofajlar bakteri, mantar ve paraziter infeksiyonlara karşı savunma hattını sağlayan myeloid sistemi oluşturmaktadır. Bu hücrelerin bazıları aynı zamanda doku ve kemiklerin yeniden şekillendirilmesinde ve ölü hücrelerin ortamdan

uzaklaştırılmasında görev almaktadır. B lenfositler seri hücreleri spesifik antikor sentezinden sorumlu iken, T lenfositler virüsle enfekte hücreler ve kanser hücreleri gibi vücuda yabancı hücreleri direkt olarak öldürebilme yada izole edebilme özelliğine sahiptir. Kan hücrelerinin çoğunun periferik kanda yaşam süreleri kısadır ve devamlı olarak yenilenmeleri gerekmektedir.

Ortalama olarak günde bir milyar yeni hematopoetik hücreye ihtiyaç vardır. Bu üretimin devamlılığı HKH ile sağlanmaktadır. HKH ile ilgili çalışmalar yaklaşık 60 yıl önce başlamıştır. 1945’de Hiroşima ve Nagasaki’ye atom bombası atılması sonrasında daha düşük dozda ve uzun sürede radyasyona maruz kalarak ölen kişilerin hematopoetik sistemlerinin zayıfladığı ve yeterli kan hücresi üretemedikleri görülmüştür. Deneysel çalışmalarda; tüm vücut irradiasyonu yapılan farelerin iki hafta içinde hematopoetik yetersizlik nedeniyle öldükleri, kemik iliğinden hazırlanan hücre süspansiyonlarının verilmesi ile de hematopoetik yetmezliklerinin düzeldiği gösterilmiştir. Düşük doz radyasyon verilen kemik iliği hücrelerinin daha sonra dalakta myeloid ve eritroid hücre kolonileri meydana getirebildikleri bilinmektedir. Bu kolonilerin büyüklüklerinin infüze edilen hücre sayısı ile ilişkili olduğu ve tek bir prekürsör hücreden köken aldıkları saptanmıştır.

Kemik iliğindeki hücrelerin bazılarının diğer kan hücre popülasyonları yanı sıra kendi kopyalarını da oluşturabildikleri gösterilmiştir. Bu türdeki hücrelere önceleri “pluripotent” daha sonra değiştirilerek “multipotent” HKH denilmiştir.



Şekil 1.1.Hematopoetik sistem ve hücresel elemanları

Bu hücrelerin en önemli özellikleri kendi kopyalarını yaparak yine bir kök hücre olarak yollarına devam etme veya farklılaşarak bir progenitör hücre dizisine dönüşerek birçok matür hücre oluşturabilmeleridir. Ayrıca migrasyon yapabilme ve programlı hücre ölümü (apoptozis) yoluna girebilme özellikleri de vardır. Bu aktiviteleri arasındaki denge vücutta bulunan kök hücre sayısını belirlemektedir. Kök hücrelerin anlık olarak sayı bilgilerinin alınabilmesi çok önemlidir. HSC'ler hakkında vitro ortamında yapılan klinik çalışmalar ileriki zamanlarda kanser kök hücresi araştırmalarına da ışık tutacaktır. HKH'lerin otomatik olarak sayımının gerçekleştirilmesi hayati önem taşımaktadır.

Kanser hastalarına yapılan tedavilerin başında: Radyoterapi ve Fotodinamik terapi gelmektedir. Kanser tedavilerinde etkili tedavi yöntemi olmalarının yanısıra hafifletici yöntem olarak da kullanılmaktadırlar. Bu yöntemlerin başarısı sadece tedavi planlaması ve verilen doz miktarına değil ek olarak tümörün biyolojik yapısına da bağlıdır. Tümör ve kanser çeşitlerini kendilerine has özellikleri ile değerlendirmek bölgenin kendine has özellikleriyle tedavi edilmesine olanak verip iyileşme oranını ileri derecede arttırmaktadır [1,20]. Tümörün yayılımı, hipoksisi ve



vaskularitesi tedavi için anahtar rolünde olup tümörün tedaviye vereceği cevabın yönetilmesinde temel bilgi olarak görev yapmaktadır. Örnek olarak uzun süren radyoterapi tedavileri hızlı oluşan bir tümör karşısında çaresiz kalmaktadır. Aynı şekilde hipoksik hücreler radyasyona yeterli derecede oksijen içeren hücrelere göre 3 kat daha fazla dayanabilmektedir. Elimizdeki parametrelerin hayati önemi olmasına rağmen toplanan özellikleri genellikle görsel olarak yapılmaktadır. Bu yöntem klasik fakat genellikle potansiyel sonuçları çıkarmak için kullanılmasına rağmen yanlış sonuçlar verebilen bir yaklaşımdır. İşlem genellikle immünohistokimyasal olarak boyanmış doku örneklerinden yola çıkılarak gerçekleştirilmektedir. Birden fazla Floresans boyama işlemi olması durumunda hata oranı yüksek oranlara erişmektedir. Bu sebeplerden dolayı göz ile gerçekleştirilen hücresel sayma işlemleri kullanılabilirliğini kaybeder ve akılcı komplike işlemlere ihtiyaç duyulur. Doku parçaları için otomatik görüntü analizi giderek artan bir önem kazanmaktadır. Sunulan yöntemler ile hücresel materyallerin miktarına dahi karar verebilme özelliği sağlamaktadır. Görüntü analiz yöntemleri geçen 10 yıl içerisinde araştırmacılar ve doktorlar için teşhisi yüksek oranda kolaylaştırdığı için bir ihtiyaç olarak görülmeye başlanmıştır.

1970'lerden beri sitoloji otomasyonu biyomedikal araştırmalar alanında bilgisayar tabanlı görüntü analizinde büyük rol oynamaya başlamıştır. İlk çalışmaların bir çoğu hücresel analiz yapmaya odaklanmış ve özel olarak kan hücresi analizlerine yoğunlaşmış, sitolojik görüntüler alınmış ve otomatik hücre analizleri yapılmıştır. Sitolojinin aksine histolojik görüntülerden anlamlı bilgilerin çıkarılması için yapılan araştırmalar yeterli seviyede yapılmamıştır[2-3]. Histolojik mikroskopik parçalar genellikle sitolojik kısımlara göre çok daha yoğun olmaktadır, bunun sebebi küçük bir kısmın bütün dokunun yapısını yansıtmasıdır. Fakat bu sebeple üst üste gelen hücreler yüzünden çalışma yapılması zorlaşmaktadır. Görüntülerin genellikle gürültü ve standart bazı tekniklerden dolayı bozulmaya uğradığı görülmekte, buna bağlı olarak yapının bozulması ile hücrelerin geometrik yapısını tespit etmek zorlaşmaktadır [4]. Şartlara bağlı olarak hücrelerin çekirdek sınırları bulanıklaşır ve çekirdek sınırları ile arka plan arasındaki belirsiz geçişler segmentasyon sürecini daha da zorlaştırmaktadır. Hücreler arasındaki sınırlar görünmeze yakındır, bu yüzden hücrenin şeklini direkt olarak görüntünün içerisinden çıkarmak

araştırmacıların en çok zorlandığı işlemlerdendir. Histoloji içerisinde ayrıca düşük seviyelerde büyütme kullanılarak, görüntülerin daha önemli bilgileri taşıması sağlanır. Özellikle kanser tedavisi için kanser hücresinin yapısı incelenen kısımdan çıkarıldığında görüntü de kullanılan büyütme özelliği ile belirli hücelere odaklanılmaktadır. Sitoloji içerisinde büyütmenin yüksek derecede yapıldığı görüntüler kullanılmaktadır ve bu işlem doku dolaşımı zorlaştırdığından dolayı birden fazla görüntünün alınması gerekmektedir. Bundan dolayı görüntüler ne kadar karmaşık hale gelir ise bltme işleminin de aynı derecede karmaşık olması gerekmektedir [21-26].

Geçen 10 yıl içerisinde yüksek teknoloji içeren görüntü analiz teknikleri ve yazılım uygulamaları genel olarak yapay zekâ alanında yapılan çalışmalar sayesinde hızlanarak histolojik hücre analizini daha hızlı hale getirmiştir. Özel olarak bu alanda farklı eğitim ve arka plana sahip araştırmacılar yapılan ilk çalışmaları genişleterek sitolojik görüntü analizi alanında ilerleme kaydetmeyi hedeflemektedirler. Ek olarak gelişen bir diğer avantaj ise yüksek teknoloji içeren yüksek znrlkl görüntü almayı sağlayan ve mikroskopik görüntülerde karşılaşılan sorunları temelden zebilen donanım ekipmanlarına ulaşabilmektir. Ek olarak histolojik işaretçilerin geliştirilmesi ile aynı görüntü ve aynı zaman içerisinde birçok farklı yapının görünür hale gelmesi sağlanarak birçok alandan grupların medikal görüntü işleme alanında çalışmalar yapabilmesi sağlanmıştır.

Medikal görüntülerin analizi çok geniş bir alanı kapsamaktadır: Görüntü kazanımı, görüntü yeniden yapılandırması, görüntü türetilmesi, görüntü sıkıştırılması ve saklanması, görüntü analizi ve görüntü tabanlı tanıma özellikleri olarak sıralanmaktadır. Bahsedilen tüm alanlar hücre sayımı aşamalarında zorlayıcı olan işlemleri kolaylaştırmak için kullanılabilir. Örneğin kök hücreler için otomatik sayım yöntemleri kullanılarak gerekli bilgiler szlebilmektedir.

Hücre sayımı için kullanılan yöntemler başlıca; eşikleme, renk transformasyonu, bölgesel birleştirme, kenar bulma, şablon eşleme, doku analizi, sınıflandırma olarak geçmektedir.

Bu sorunlar ve teknik veriler göz önüne alındığında bu tez içerisinde flüoresans görüntüleme yardımı ile kan hücrelerinden alınan HKH'lerin otomatik sayılarak sonuçları klinik araştırmalar, teşhis ve tedavi aşamaları için hızlı ve kolay bir şekilde bilgi sağlaması hedeflenmektedir. Hücre tespiti, sayımı ve tanınması tumor dokularının yapısının anlaşılması ile paralel bir konu olduğundan yapılan çalışmalar bu alanda da büyük yarar sağlamaktadır. Otomatik görüntü işleme aşamalarında kullanılan görüntü işleme teknikleri hücrelerin sınıflandırılmasına da olanak sağlamaktadır. Bu kısmı takip eden her bölümde ele alınan konu ile alakalı kısa bir açıklama yapılarak sorun olduğu düşünülen her konu için bir öngörü sağlanacaktır.

Tez çalışması ile ilgili literatür taraması yapılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan yöntemler ile ilintili çalışmalar aşağıda verilmiştir. Doku parçaları üzerinde gerçekleşen ilk çalışmalar genellikle bu alanda en popüler olarak görülen eşikleme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Eşikleme temel olarak grilik seviyesi üzerinde yapılan hesaplamalar ile arka planın ve görülmesi istenen nesnenin birbirinden ayırt edilebilmesi için piksel seviyesinde gerçekleştirilir. Bu alanda yapılan bir çok çalışmada grilik seviyesine göre seçilen manalı bir eşikleme değeri ile iyi sonuçlar elde edilebilmiştir [11-13]. Eşik değeri seçilirken keyfi olarak hareket edilen yöntemler de bulunmaktadır. Bu yöntemlerin amacı hücre sayımı yapabilmek olduğundan dolayı, sayının artması için denemeler yapılabilmektedir[14]. Yarı otomatik sayma sistemleri pikselleri uzaysal düzlemde inceleyerek kullanıcı tarafından seçilen eşikleme aralığında sayıma olanak sağlayarak interaktif olarak işlem yapılmasını sağlamaktadır [15]. Karaciğer hücrelerinin immunolojik olarak etiketlenmesi referans [16] içinde gerçekleştirilmiştir. Bir başka çalışma da Ki-67 ile etiketlenen proteinlerin çoğalma sonucu değişimleri histolojik olarak incelenmiştir [17]. Benzer bir çalışma global eşikleme uygulanarak aynı madde ile yapılmıştır fakat bu çalışmada sayım sonuçları daha doğru hale getirilmiş ve sayım hızlandırılmıştır [18]. Yakın zamanda göğüs kanseri için hücre çoğalma aktivitesinin incelenendiği çalışmalar yapılmıştır. Özel olarak yazılmış bir bilgisayar programı kullanılmıştır bu yazılım ile boyanmış çekirdek yüzdesi ve boyanmış tüm alan yüzeyi hesaplanabilmiştir [19]. Bir başka çalışma da görüntü işleme yöntemleri ile işaretlenmiş tümör hücreleri belirlenen parametreler ile eşikleme yaparak karşılaştırılmış [6-7].

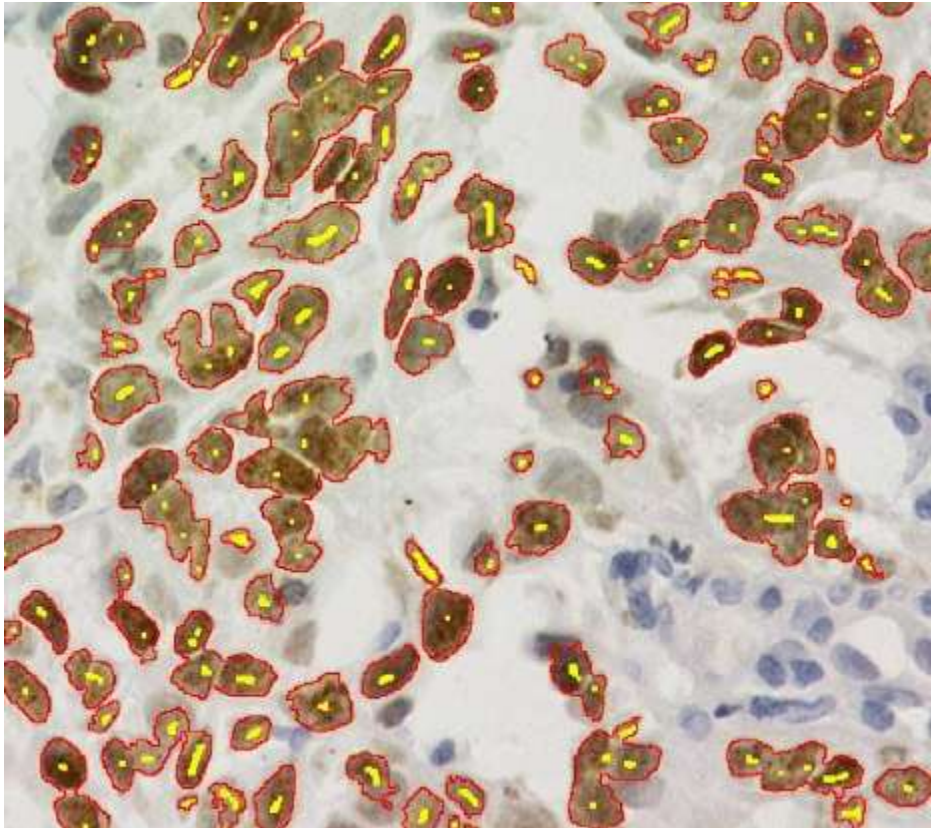
Bir önceki bölümden anlaşıldığı üzere eşikleme teknikleri genellikle grilik seviyesine bağlı olarak histogram tepe noktalarını ortaya çıkarmaktadır ve gözlemci yargısını daha önemli kılmaktadır. Grilik seviyesi kalitesinin yüksek yoğunluklu fluoresans boyama işlemi ve arka-plan ile olan kontrast farklılığıyla doğru orantılı olarak değiştiği görülmektedir. Boyama tekniklerinin birçoğu farklı hücresel yapıları gözlemleyebilmek için kullanılabilir. Bu sebeple renkli görüntü analizi, renklendirilmiş yapıları etrafındaki yapılardan ve arka plandan ayırabilmek için modern teknikler ve gelişen teknoloji sebebiyle histoloji ve hücre biyolojisi için daha da önemli hale gelmiştir. Görüntü içerisinde ilgilenilen alan işaretleme elemanları ile boyandıktan sonra kırmızı, yeşil, mavi kanallar için (RGB görüntüsüne ait her kanal) eşikleme uygulanır [27]. Bu fikir ışığında birçok çalışma yapılmıştır. Referans [28-30]' da renk ayrımı ilgilenilen alanlara manuel olarak yapılmıştır. Prosedürler kullanıcının görüntü içerisinde alt-görüntü seçmesi ile devam edip bu alt-görüntünün, görüntünün tamamı hakkında bilgi vermesi hedeflenmiştir. Daha sonra eşikleme değeri bütün görüntüye araştırmacının seçimine göre uygulanmıştır.

Her renk kanalına ayrı görüntülerden alınmış gibi işlem yapmak görüntüleme amacına uygun olmasına karşılık, veri kullanımı için en verimli yol değildir. Görüntünün içerisindeki çok-boyutlu verilerin kullanılabilmesi için birçok model geliştirilmiştir [31-34].

RGB görüntülerde boyama işleminden sonra lekelerin tanınabilmesi için pixel ayrımı algoritması çalıştırılmalıdır. Üç boyutlu verilerin işlenmesindeki zorluklardan dolayı bazı çalışmalarda hücre tespiti grilik seviyesi analizi, üç boyutlu renk verileri yüzey veya çizgiye yansıtıldıktan sonra yapılmıştır.

Örneğin, Kohlberger ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada RGB sinyal ile dönüştürülerek renk tonu, doygunluk ve yoğunluk (HSI) uzay, kavramları insan gözü ile incelenebilecek hale getirilmiştir. Göğüs kanseri hücreleri için farklı bir bakış açısı sağlamıştır [31-32]. Bir başka çalışmada, HSI renk modeli kemik iliği çalışmaları kullanılmıştır [33]. Bu yöntem kemik iliği çalışmalarında büyük avantaj kazandırmıştır. Benzer olarak Çalışma [34], doygunluğu ve yoğunluğu baz alan (HSI) modeli ile renk bileşenine bağımsızdır leke miktarı ölçülmüştür. RGB

görüntüde leke tanıma algoritması içerisinde piksel tanıma sınıflandırmasının olması gerekmektedir. Üç boyutlu datalarda gerçekleştirilmesi zor olan algoritmalarından kurtulabilmek için hücre tanıma çalışmaları üç boyutlu renk değişimleri (RGB, HSI vb.) bir çizgi veya alan üzerine işlenmiştir. Referans [35] parça analizi kullanarak [PCA] statik olmayan değişim bazlı lineer kombinasyonlar kullanılarak boyanmış hücreler tespit edilmiştir. PCA ayrıca büyük alan içeren görüntülere de uygulanarak histogram ve binari görüntü işleminin kombine edilmesi ile bölütleme uygulanarak çekirdek sınırlarına uygulanmıştır [9]. Hücre sınırları kırmızı ile hücrenin çekirdeğinin sınırları ise sarı ile boyanmıştır. Algoritma referans [9]' da belirtildiği gibi yapılmıştır. [26,36-40] referanslarında belirtilen farklı olarak boyanmış alanlarda biyolojik yapının araştırılması ve lineer kombinasyonlar ile hücreler birbirinden ayrılarak belirlenmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında görüntüleme sistemleri spektral avantajları göz önüne alarak araştırmaları bir ileri seviyeye taşımıştır [26, 39, 40].



Şekil 1.2. Büyük ölçekli görüntüde bölütleme örneği

Histoloji alanında bölge birleştirme işlemi bölütlemeye alternatif olarak kullanılmaktadır. Grilik seviyesi eşiklemesi ve renk eşiklemesi sağlıklı bölütleme

yapılmış bir görüntüyü garanti edememektedir. Karmaşık alt bölgeler içeren görüntülerde bu işlemlerin başarısı daha da azalmaktadır. Görüntü piksellerini bölütleme işlemi sırasında ele alabilmek için bölge birleştirme(region merging-RM) işlemine alternatif bir yaklaşımdır. Sitoloji ile karşılaştırıldığında histoloji içerisindeki görüntü karmaşıklığından dolayı RM yeteri kadar ön plana çıkamamıştır. [41]'de böbrekteki zar kısmının elektron mikroskobu altındaki görüntüsü üzerinde tipik bir RM tabanlı çok parçalı algoritma sunulmuştur. Laser tarama özelliğine sahip bir mikroskop ile yapılan çalışmalar [43] içerisinde belirtilmiştir. Watershed algoritması kullanılarak yapılan çalışmalarda yüksek doğruluk içeren sonuçlar elde edilmiştir [43]. Gri-seviyeli Watershed algoritması ile referans [44]'te kanser hücreleri incelenmiştir.

Görüntü içerisindeki nesnenin dış sınırlarını bulabilmek için kenar tespiti yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sayede görüntünün analizi ve sınıflandırması yapılabilmektedir. En yaygın yaklaşım kenar artırımı/eşikleme methodu ile bazı eksik olan kenarların yüzeysel olarak tamamlanmasıyla yapılır. Yapılan önceki çalışmalarda konvolüsyon kullanılarak parlaklık fonksiyonunun türevi ile köşeler görülebilir hale getirilmiştir. İlk adımda çekirdek kısmının yoğunluğuna göre sınıflandırma yapılacak tepe noktası tespit edilir [45-48]. Daha sonra bulunan tepe noktası üzerinde radyal olarak yönlendirilmiş kenar bulma işlemi gerçekleştirilir. Hücresel sınırları belirleyebilmek için dışbukey nesnel algoritma ile hücre merkezine olan eğimlerinden yararlanılır ve hücre tanınması gerçekleştirilir.

Dijital görüntü işleme yöntemlerinin bazıları türev operatörü kullanılarak tespit edilir. Bu yöntemlere örnek olarak Laplace operatörü ve Laplace-Gauss (LoG) yöntemi verilebilir [49-50].

Sayısal görüntü işleme tekniklerinin yaygınlaşması ile gürce sınırlarının doğru bir şekilde tespiti sağlanmaktadır. Görüntüde bulunan bir nesnenin hücre olup olmadığına karar vermek için kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemlerden biri şablon eşleştirme yöntemidir. Ancak çok sayıda farklı hücre modelleri olmasından dolayı bu yöntem tercih edilmez. Hücre türünün belirlenmesi için farklı

çalışmalar yapılmaktadır. Tezin amaçları arasında hücre türünün belirlenmesi olmadığından bu konuya ayrıntılı bir şekilde değinilmemiştir.

Şablon eşleştirme yöntemi hücre sınırlarının belirlenmesinde istatistiksel modeller ile birlikte kullanıldığında daha iyi sonuçlar vermektedir. Bu yöntem için tipik olarak gösterilebilecek hücre tespiti yöntemleri [50-53] referansları arasında bulunmaktadır. Kenar bulma yöntemi ile optimal hücresel sınırları arasındaki bağlantıyı Bayes tabanlı istatistiksel model kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir.

Diğer önemli bir yaklaşım ise yapısal içeriği bölgesel olarak kontrol ederek gerçekleştirilir. Eğer yapı üzerinde belirli bir şekil ve içerik yok ise karakteristik tekrar eden yapılar veya yapıların tekrar etmesi ile oluşan bölgeler ile bulunur. Genel olarak görüntü üzerindeki yapıyı açıklamak için istatistiksel, yapısal ve spektral olmak üzere 3 yaklaşım vardır [32]. İstatistiksel yaklaşımlara örnek olarak: standart sapma, eş oluşum matrisi, enerji, entropi, etkileşim katsayısı ve lokal ortalama parametreleri kullanılarak yapılan çalışmalar gösterilebilir [54]. Yapısal teknikler için ise görüntünün temel bileşenlerinin ayarlanması gerekmektedir. Spektral teknikler de görüntünün frekans spektrumu özellikleri dikkate alınır.

Bir doku parçasına ait görüntünün yapısal analizi son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bu method genel olarak teşhis için uygun kısmın tespiti, kanserli ve sağlıklı dokunun ayırt edilebilmesive tümörün derecelendirilmesi için kullanılmaktadır [55-56]. [57]'de yumuşak dokunun ve dokuda bulunan tümörün yapısını tespit etmek için kullanılan bir yöntem sunulmuştur. Anormal doku bölgesini ve doku tümörlerini sınıflandırabilecek bir şablon eşleştirme yöntemi [58-59]'da sunulmuştur. [59]'da yapılan çalışmada yapısal parametreler çıkarılarak eş oluşum matrisi elde edilmiş fluoresans mikroskobu altında alınan görüntüler, hücre çekirdeklerini belirlemek için yüzeysel heterojenlik açısından incelenir. Standart yapısal ölçüm teknikleri [60]'te karşılaştırılmıştır.

Fraktal geometri, patoloji alanında yapısal analiz yapabilmek için kullanılan bir diğer ölçüttür. Fraktal geometri ile çalışmalar [61-63]'de sunulmuştur. Fraktal geometri analizi çekirdek boyutu ve pragnoz tahmini için de kullanılmıştır.

Hücre çekirdeği bölütlemesi sonuçlarında olduğu gibi sınıflandırma alanında yapılan birçok çalışmada mikroskopik görüntüler kullanılarak sitolojik hücre sınıflandırılması yapılmıştır. Son zamanlarda histolojik çalışmalarında içeren mesafe, basit geometrik şekiller, çevre yapısı, boyut, şekil ve renk modelleri (RGB, HSI, etc) içeren birçok görüntü algoritması geliştirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan sınıflandırma teknikleri değişim göstermekle beraber en yaygın olarak kullanılan yöntem [64]'de verilmiştir.

Histolojik görüntülerin sınıflandırılması veya kimliklendirilmesi sırasında analizleri vasıtası ile çıkarılan bilgiler kullanılır. Geleneksel olarak sınıflandırma işlemi istatistiksel ve karar mekanizma parametreleri ile yapılır [65]. Renk analizi, şablon eşleştirme, yapısal analiz, frekans domeni teknikleri ve yüzey modelleme kullanılarak yapılan bir lenf nodu kanseri araştırması [66]'da sunulmuştur. Benzer bir çalışma da kolon mukozası tanınması için yapılmıştır [59]. Sınıflandırma aşamaları bazı çalışmalarda eğitimsel olarak yapılmaktadır. Bu durumda veriler eğitim ve test verisi olarak ikiye ayrılır. Eğitim verileri kullanılarak test verileri hakkında otomatik olarak bilgi edinebilmesi planlanmıştır. Bu yöntem histolojik alanda birçok çalışmada ana hatları oluşturmaktadır [4, 58, 67, 68].

Doku görüntülerinin karmaşıklığı bölütleme ve sınıflandırma sürecinde bilgisayar kaynaklı sistemlerde aşılması zor bir üst üste binme problemi çıkarmaktadır. Bu problem araştırmacıları yapay zeka alanlarında çalışmalar yapmaya itmiştir. [69-70]'de iyi sonuçlar veren bir histolojik tümör derecelendirme sistemi verilmiştir. Makine tabanlı görüş sistemi ile yapılan histopatolojik teşhis yöntemi referans [71] içinde verilmiştir. Bölütleme işleminde bulunan modüler tanı koyulması ve tanı kararı için destek oluşturmaktadır.

Yapay sinir ağları sistemleri (YSA) ile yapılan miktarsal patolojik çalışmalar bu alanda yeni yerini almaya başlamıştır. YSA tabanlı sistemlerin kullanılmasının avantajlarından biri belirlenemeyen bazı yöntemleri yapay zekâ sayesinde yeni fonksiyonlar çıkararak elde edebilmek ve bu yöntemleri sınıflandırma içerisinde kullanabilmektir [72-75]. Gerçek zamanlı histolojik problemlerin YSA tabanlı



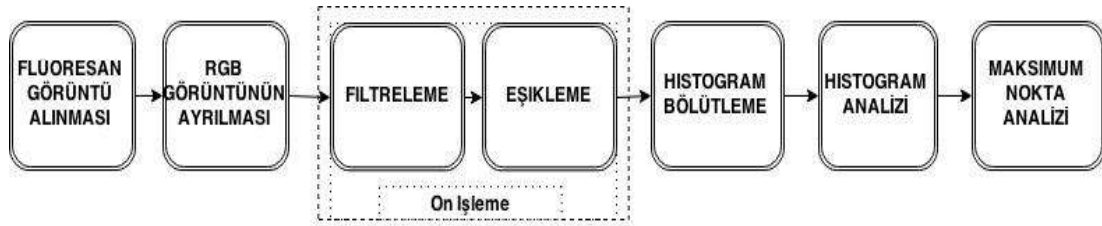
çözümü yapılan hücre bölütleme ve sınıflandırma işlemi ile başarıya ulaşılmıştır [76-77].

YSA sistemleri son zamanlarda doku içersindeki biyolojik yapıların bölütlenmesi için kullanılmaktadır. Fakat yayınlanan makaleler, sınıflandırma yapılan makalelere kıyasla sınırlı sayıdadır. Doku parçalarındaki hücre sayısını bulabilmek için YSA yardımı ile yapılan sistem örneği referans [78]'de sunulmuştur. Bu çalışma hücre sayımı alanında manuel sistemi, bilgisayar tabanlı olarak taklit edebilmek için yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalardandır [82].

Yapılan literatür taraması ışığında, bu tezde sunulan mikroskop görüntüsü kullanılarak otomatik hücre sayım yöntemi Bölüm 2'de tüm aşamaları ile açıklanmıştır.

## BÖLÜM 2. OTOMATİK HÜCRE SAYIMI

Otomatik hücre sayımı yapılabilmesi için bu çalışmada kullanılan yöntemler sırasıyla: Alınan Floresans görüntünün (RGB) kanallara ayrılarak Yeşil (Green) kanal üzerinde Gauss filtresi uygulanmıştır. Düzeltile görüntüye daha sonra Eşikleme (thresholding) yapılarak görüntüdeki hücrelerin ön plana çıkması sağlanmıştır. Daha sonra Histogram bölükleme uygulanarak görüntünün bit haritası çıkarılmıştır. Bu harita ile görüntüdeki değerlerin hangi aralıkta toplandığı ve birbiri üzerine denk gelen hücrelerin belirlenmesi sağlanmıştır. Aralıklar arasında yapılan eşleştirme çalışması ile birbiri üzerine denk gelen aralıklar algoritma yardımı ile ayrılarak birleşik halde duran hücrelerin belli bir yüzde oranında ayrılması sağlanmıştır. Birbirinden ayrılan bit haritasındaki değerler sayesinde maksimum nokta analizi ve dairesel sınır analizi yapılarak hücrelerin orta noktası belirlenerek sayım işlemine uygun hale getirilmiştir.



Şekil 2.1. Otomatik hücre sayımı algoritması blok diyagramı

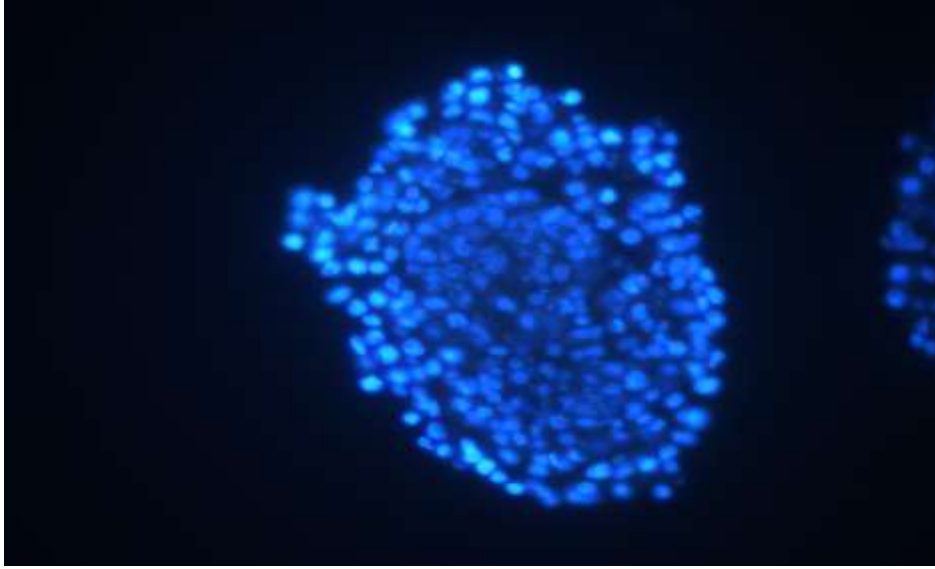
Çalışmanın anlaşılabilmesi için floresan görüntüleme hakkında bilgi verilmesi öngörülmüştür.

Temel tıp bilimleri ve biyolojide sistem, organ ve doku fonksiyonu hakkında bugün eriştiğimiz bilgi düzeyinin temeli, fonksiyonel birim olan hücre ve yapıları hakkındaki bilgilerimiz nedeniyledir. Bu nedenle bilim insanları tarih boyunca, gözle göremedikleri bu mikro evrendeki yapıları görünür hale getirip, deneysel bilgiler

toplayabilmek için farklı büyütme araçları, mikroskoplar üretme çabasında olmuşlardır. Her ne kadar Janssen'in 16. yüzyılda ürettiği bileşik mikroskop ilk olsa da, tarihte bu girişimlerin başlangıcı Hooke'un çalışmaları olarak kabul edilir. Hooke bilindiği üzere, bir boru içine yerleştirdiği merceği ve oküleri, bir yağ lambası (ışık kaynağı) ve su dolu küre (kondensör) yardımıyla, ince kesilmiş şişe mantarı dilimleri üzerine odaklayarak gördüğü yapıyı çizdi. Mantar diliminin delikli yapısını tanımlamak üzere Hooke ilk defa hücre terimini kullandı. Hooke'un mikroskobu ile bugünkü modern mikroskopların arasında görüntü itibariyle çok büyük farklar olmasına rağmen görüntülemenin temel prensibini oluşturan fizik kanunları aynıdır. Bugün laboratuvarlarda görüntüleme maksadıyla en sık ışık, elektron demeti ve ultrases kullanan mikroskoplardan yararlanılmaktadır. Ultrases mikroskopları kısıtlı olarak kullanılmaktadır, elektron mikroskopi tekniği ise ancak fikse edilmiş metal kaplanmış hücrelere (dokulara) uygulanabildiğinden, referans makalenin kalan kısmında canlı hücrelere uygulanabilen ışık mikroskopi tekniklerine yer verilmiştir [1-4]. Beyaz ışık, elektromanyetik dalga spektrumun gözümüzün görebildiği 400-800 nm arasındaki kısmına karşılık gelmektedir. Görünebilir spektrumdan daha küçük dalga boyundaki ışık ışını ultraviyole, daha büyük dalga boyundaki ise infra-red spektrumunda yer alır. Farklı maksatlarla tüm bu dalga spektrumlarının seçilmiş bir bandı veya tek dalga boyuna sahip ışık ışınları kullanılmaktadır. Büyütmenin en bilinen aracı büyüteçtir. Burada objeden yansıyan paralel ışık ışınları lensten geçerek odak noktasına kırılır ve retinada görüntü oluşur. Görüntünün boyu lensin arkasında oluşan büyütülmüş sanal görüntüye ait olduğundan büyütme gerçekleşmiş olur. Mikroskoptaki fizik prensipler özünde büyüteçtekine benzemekle birlikte bazı farklar arz eder. Mikroskopta ambient ışık yerine belli bir ışık kaynağı kullanılır. Aydınlatma ışığı bir kondensör (yoğunlaştırıcı) lens yardımıyla numuneye odaklanır. Numuneden geçen ışık ışınları (transmitted light) objektif lens tarafından birinci defa büyütülür. Oluşan görüntü paralel ışık demetleri halinde mikroskop tüpünden okülere ulaştıktan sonra ikinci büyütme uğrar, odağa kırılan ışık demetleri gözlem planında final görüntüyü oluşturur. Oluşan görüntü aslında iki kez büyütülmüş sanal görüntüye ait olduğundan numunenin yeterince büyük bir görüntüsünü gözlemek mümkündür. Bu yöntemle numunenin 1,000 kez büyütülmüş görüntülerini elde etmek mümkündür. Klasik ışık mikroskobu ile şiddet kontrastı, faz kontrastı, modülasyon kontrastı, interferans kontrastı yöntemleri ile örneğin farklı vasıflarını ön plana çıkartan

görüntülerini elde etmek mümkündür. Bilinen parlak alan mikroskopisi ile numunenin görme alanına giren kısmının ışığı geçirme özelliklerinden yararlanılır. Bu yöntemle numunenin bir kısmına ait spesifik görüntüleme elde etmek mümkün değildir [79-81].

Numuneden spesifik görüntü veya sinyal almak için flüoresan mikroskopi yöntemi geliştirilmiştir. Flüoresan prensip temel seviyedeki (ground state) bir elektronun eksternal enerji ile uyarılarak bir üst seviyeye yükseltilmesi ve bu seviyede labil olan elektronun tekrar temel seviyeye dönerken spesifik bir dalga boyunda ışımaya yapması şeklinde özetlenebilir. Eğer uyarı enerjisi bir ışık kaynağıysa buna uyarı (excitation) ışığı, geri dönüşte yayılan ışığa da emisyon (emission) denir. Bazı moleküllerin floresan vasıfları daha etkindir, belli bir dalga boyunda uyarıldığında stabil olarak başka bir dalga boyunda orantılı bir ışımaya yaparlar, bunlara da floresan madde veya florofor denir. Floresan prensibin mikroskopideki uygulaması açıklandığı gibidir. Burada ışık kaynağından optik filtreler yardımıyla uyarı ışığı süzülerek numuneye yönlendirilir, numunenin çıkarttığı emisyon bariyer filtreden geçirilerek uyarı ışığından arındırılır ve göze (veya fotoğraf makinesine) düşürülerek görüntülenir. Bu sayede numunenin kendi yaydığı spesifik floresan emisyon görüntülenmektedir. Eğer, numunenin belli bir kısmının floresan olarak işaretlendiğini düşünürsek sadece bu kısımlar spesifik olarak işaretlenecektir. Şekil 2,2'de bir mikroelettrotla floresan boya doldurulmuş bir hücreye ait görüntü gösterilmiştir. Bu sayede nöronun ince dendritleri en ince ayrıntılarına kadar görüntülenebilirken, diğer yapılar elimine edilmiştir. Görüldüğü gibi floresan mikroskopi en temel olarak spesifik yapıların morfolojisinin araştırılmasında kullanılmaktadır [83].



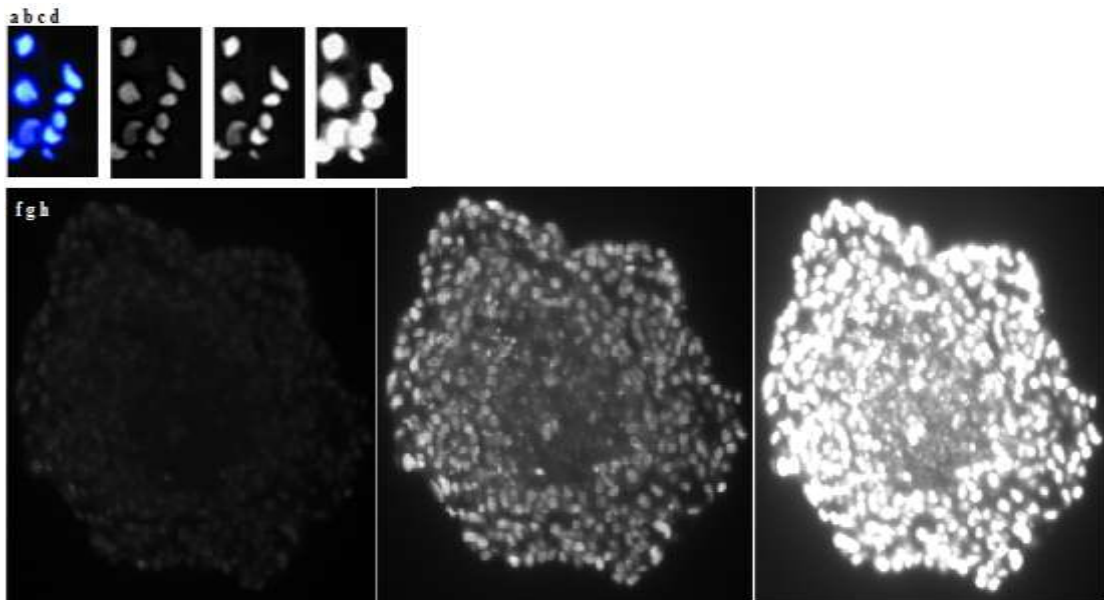
Şekil 2.2. Kök hücre fluoresans görüntüsü

## 2.1. Görüntünün Kanallarına Ayrılması

Bir görüntünün temel bileşeni piksel-resim elemanıdır (pixel-picture element). Dolayısı ile görüntü deyince  $M \times N$  boyutlu piksellerden oluşan bir matris gelmelidir. Bir pikselin iki temel özelliği söz konusudur:

**Radyometrik özelliği:** Pikselin algılandığı elektromanyetik spektrumdaki gri değeri  
**Geometrik özelliği:** Görüntü matrisinde sahip olduğu matris koordinatları, Bir resmin sayısallaştırılmasının açıklanması amacı ile öncelikle Siyah-Beyaz resim göz önünde bulundurulmuştur. Siyah-Beyaz resim sadece iki gri değerden oluşan bir resimdir. Böylesi bir görüntüde her bir piksel ya siyah ya da beyaz olarak oluşur. Burada sembolik olarak beyaz pikseller 1, siyah pikseller 0 değeri ile gösterilecektir[3]. Şekil-2.2' de görüntüye ait piksellerin 0 ve 1 kodlanmış hali verilmiştir. Bu şekilde 0 ve 1 kodlanmış piksellerden oluşan görüntülere ikili görüntü (binary image) adı verilir. Renkli görüntüler bilgisayar ekranlarında 24 bit lik veri olarak görüntülenir. Görüntüleme R(Kırmızı), G(Yeşil), B(Mavi) kodlanmış aynı objeye ait üç adet gri düzeyli görüntünün üst üste ekrana iletilmesi ile oluşur. Elektro-manyetik spektrumda 0,4-0,5 mm dalga boyu mavi renge; 0,5-0,6 mm dalga boyu yeşil renge; 0,6-0,7 mm dalga boyu kırmızı renge karşılık gelir. Bu dalga boylarında elde edilmiş üç gri düzeyli görüntü bilgisayar ekranında sırası ile kırmızı-yeşil-mavi

kombinasyonunda üst üste düşürülecek olursarenkli görüntü elde edilmiş olur. Renkli görüntü kavramı; 1 band bir anlamda kırmızı filtrelenmiş, başka bir deyişle orijinal görüntüdeki gri değerler kırmızının tonları şeklinde ifade edilmiş, benzer şekilde 2 ve 3 bandlar da da yeşilin ve mavinin tonları şeklinde ifade edilip üstüste çakıştırılmış ve oluşan renk karışımından da doğal renkler elde edilmiştir, şeklinde de açıklanabilir. Öyle ise band kombinasyonu şekilden de görüleceği üzere 3-2-1 dir. Yapılan işlem floresans mikroskobu altında alınan görüntülerin özellikleri göz önüne alındığında optimum sonuca ulaşabilmek için bütün kanallar üzerinde sonuçlar denenerek sayıma en elverişli kanal bulunmak istenmiştir. Bunun sonucunda bu işlemlere en elverişli kanal Yeşil kanal olduğundan dolayı işlemlere yeşil kanal üzerinde devam edilmiştir [83].



Şekil 2.3.(a)-(h) RGB görüntülerin, kırmızı(red), mavi(blue), yeşil(green) kanallar

## 2.2. Filtreleme

Filtreleme görüntü üzerinde daha rahat işlem yapmamızı sağlayacak bir adım olarak görülmektedir. Bir görüntüdeki ayrıtlar ve diğer keskin yeğinlikli geçişler (gürültü gibi) Fourier dönüşümünün yüksek frekanslı içeriğine önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Bu yüzden, frekans bölgesinde yumuşatma (bulandırma) yüksek frekanslı zayıflama, yani alçak geçiren süzme sayesinde gerçekleştirilmektedir. Bu kısımda, üç tür alçak geçiren süzgeci ele alacağız; bunlar ideal, Butterworth ve Gauss

filtreleridir. Bu üç kategori çok keskinden (ideal) çok yumuşağa (Gauss) kadar olan süzme aralığını kapsamaktadır. Butterworth filtresi filtre derecesi adında bir parametreye sahiptir. Yüksek derecedeki değerler için Butterworth süzgeci daha çok Gauss süzgecine benzemektedir. Yani, Butterworth filtresi iki ‘aşırılık’ arasında geçiş sağlamaktadır.

İdeal alçak geçiren filtreler  $D_0$  yarıçaplı daire içerisindeki tüm frekansları zayıflatmadan geçiren ve bu daire dışındaki tüm frekansları ‘kesip ayıran’ 2-D alçak geçiren filtre ideal alçak geçiren filtre olarak adlandırılır(ILPF); bu filtre şu fonksiyon ile ifade edilir

$$H(u, v) = \begin{cases} 1 & \text{ise, } D(u, v) \leq D_0 \\ 0 & \text{ise, } D(u, v) > D_0 \end{cases} \quad (2.1)$$

Burada  $D_0$  pozitif bir sabit sayıdır ve  $D(u, v)$ , frekans bölgesindeki bir nokta  $(u, v)$  ile frekans dikdörtgeni merkezi arasındaki mesafedir, yani

$$D(u, v) = \left[ \left( u - \frac{P}{2} \right)^2 + \left( v - \frac{Q}{2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.2)$$

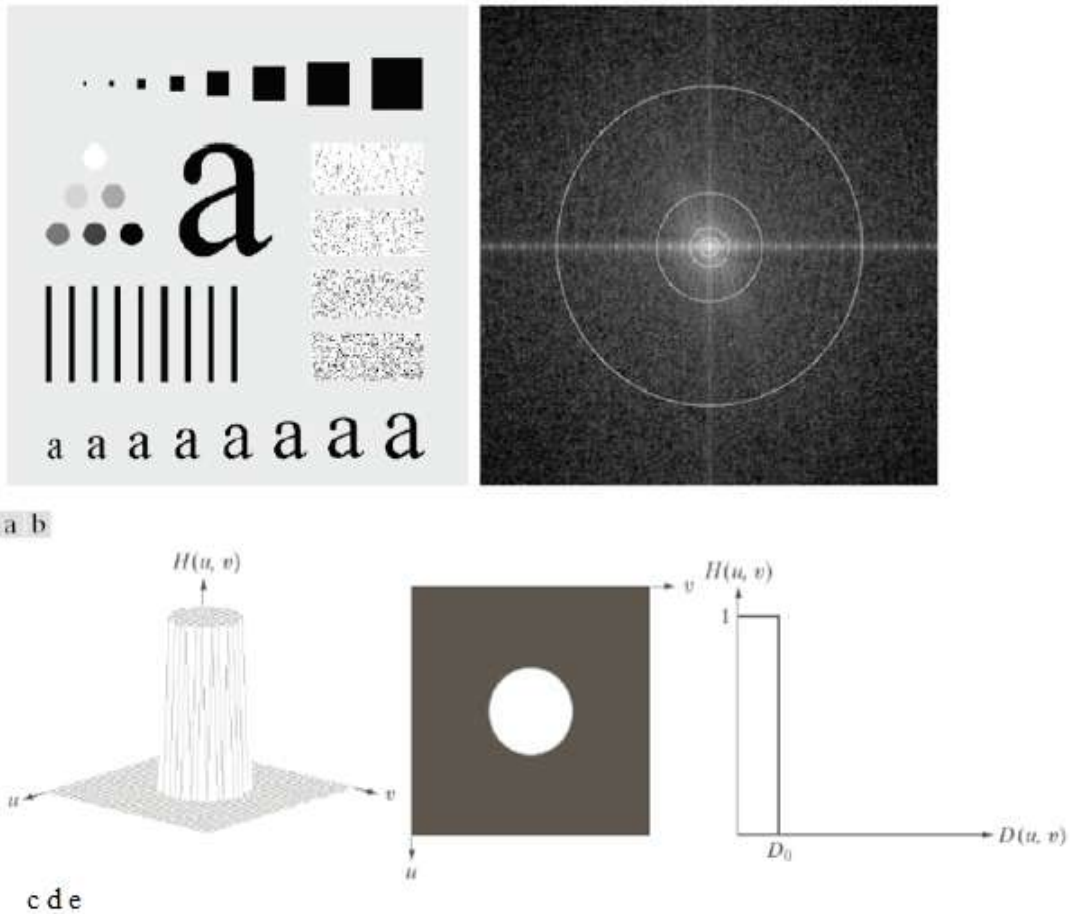
Önceden olduğu gibi burada  $P$  ve  $Q$  eşitlikler  $P \geq 2M - 1$  ve  $Q \geq 2N - 1$  den alınan dolgu yapılmış boyutlardır. İdeal alçak geçiren filtre radyal olarak simetriktir, bu ise filtrenin tamamen bir yarıçapsal kesit tarafından tamamlandığı anlamına gelir. Enine kesitini 360 derece döndürdüğümüzde 2-D’deki filtreyi elde ederiz[83].

Bir ILPF enine kesiti için,  $H(u, v) = 1$  ve  $H(u, v) = 0$  arasındaki geçiş noktasına kesim frekansı denir. Bir ILPF’nin keskin kesin frekansları elektronik bileşenlerle gerçekleştirilemez, ancak bilgisayar simülasyonu ile yapılabilir. Sayısal bir görüntüde fiziki olmayan filtrelerin kullanılmasında bazı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir.

Şekil 2.4’ de kesim frekansları Şekil 2.5(b)’de gösterilen yarıçaplardayken ILPF’lerin uygulanmasının sonuçları gösterilmektedir. Bulandırmadaki amaç en büyük nesnelere

temsil eden damlalar hariç bir görüntüdeki tüm ayrıntıları ortadan kaldırmak olmadığı sürece şekil 2.5(b) tüm uygulamaya dönük amaçlar açısından kullanışsızdır. Bu görüntüdeki ciddi ölçüdeki bulandırma görüntüdeki çoğu keskin ayrıntı bilgilerinin süzgeç tarafından çıkarılan %13'lük güç içerisinde bulunduğu açık bir göstergesidir. Süzgeç yarıçapı arttıkça giderek daha az güç çıkarılmaktadır, bu ise daha az bulandırma yapılması sonucunu doğurur.

Bu örnekte görüldüğü gibi ideal alçak geçiren süzme çok pratik değildir. Ancak, süzme kavramlarını açıklayabilmenin bir parçası olarak bunların davranışlarının irdelenmesi yararlı olacaktır.

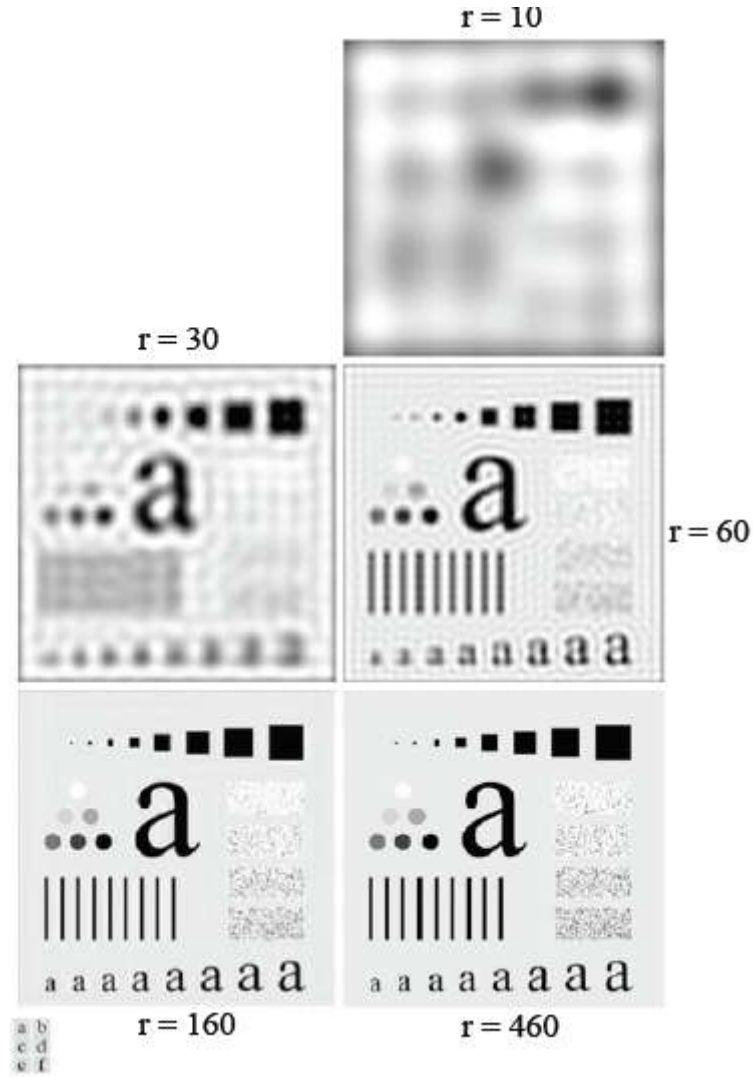


Şekil 2.4. Pikel'e göre oluşturulmuş test deseni

Şekil 2.4. içerisinde (a) 688x688 piksel boyutlu test deseni,(b) bunun Fourier spektrumu. Üst üste binen dairelerin tam boyut spektrum görüntüsü bakımından 10, 30, 60, 160 ve 460'a eşit olan yarıçapları bulunmaktadır. Bu yarıçaplar sırayla, dolgu



yapılan görüntü gücünün %87, 93,1, 95,7, 97,8 ve 99,2'sini çevrelemektedir. (c)-(e) İdel filtrenin 3 farklı gösterimi olarak verilmiştir. ILPF'lerin bulanıklaşma ve salınım özellikleri katlama teoremi kullanılarak açıklanabilmektedir. 10 yarıçapındaki bir ILPF'nin uzamsal gösterimi olan  $h(x,y)$  gösterilmektedir. Frekans bölgesindeki ILPF'nin bir enine kesitli pencere süzgeci gibi gözüktüğü için karşılık gelen uzamsal süzgecin en kesitinin sinc fonksiyonun şekline sahip olmas beklenmedik bir durum değildir. Uzamsal bölgede filtre  $h(x,y)$ 'nin görüntü ile katlanması yoluyla gerçekleşir. Görüntüdeki her bir pikselin ayırık darbeler olduğunu ve bu darbelerin dayanımının o konumdaki görüntünün yeğinliğiyle orantılı olduğunu farz edin. Bir sinc'in darbe ile katlanması sonucu darbe konumundaki sinc'i kopyalar. Sinc'in merkez kulağı darbe konumundaki bulandırmanın temel nedenidir, ancak dıştaki daha küçük kulaklar temek olarak salınımın oluşmasına neden olur. Sinc'in görüntüdeki her bir pikselle katlanması ILPF'lerin davranışlarının açıklanması için güzel bir model oluşturmaktadır.

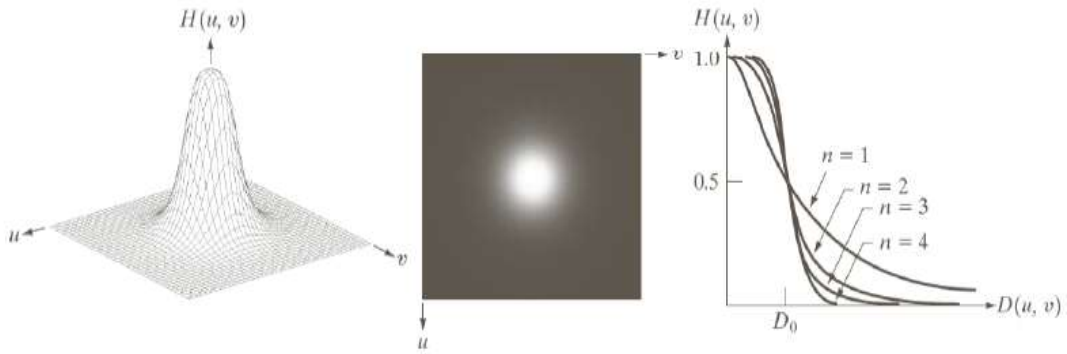


Şekil 2.5. ILPF'nin yarıçapa bağlı gösterimi

Şekil 2.5 içerisinde gösterilen (a) Asıl görüntü. (b)-(f) Gösterildiği gibi kesim frekansları 10,30,60,160 ve 460 yarıçap değerlerine ayarlanmış halde ILPF'ler kullanarak filtreleme sonuçları olarak verilmiştir. Butterworth alçak geçiren filtrenin (BLPF)  $n$  dereceli transfer özelliği ve aslından  $D_0$  gibi bir uzaklıkla bulunan kesim frekansı şu şekilde tanımlanmaktadır:

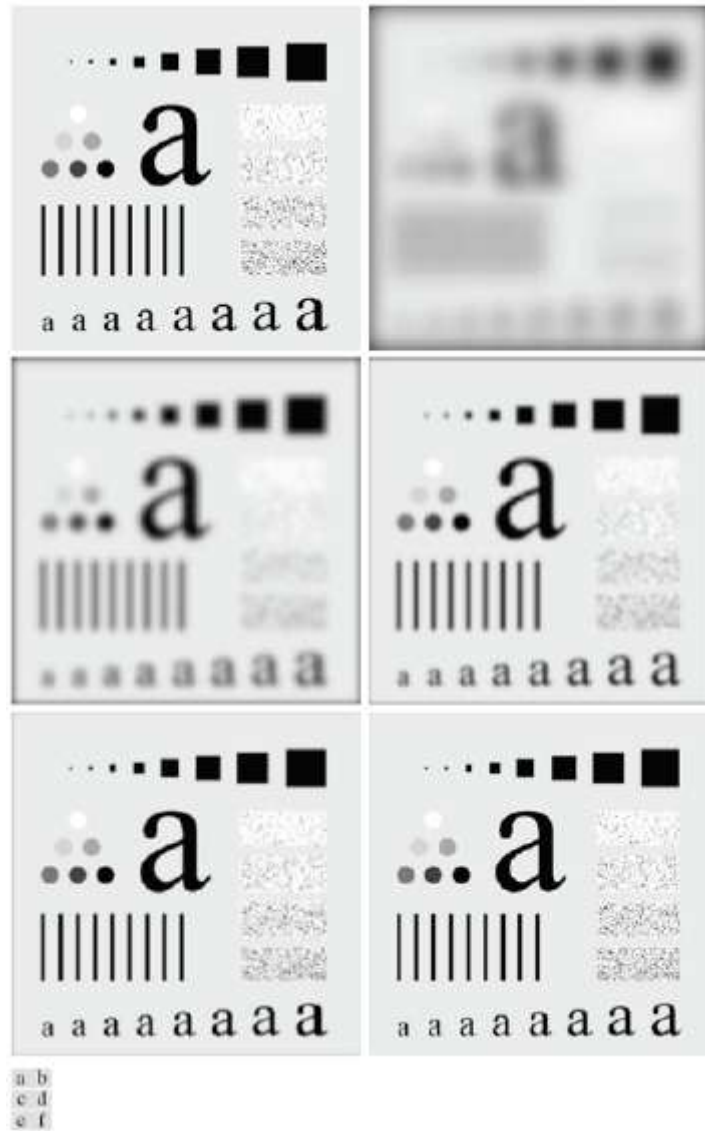
$$H(u, v) = \frac{1}{1 + \left[\frac{D(u, v)}{D_0}\right]^{2n}} \quad (2.3)$$

Burada  $D(u, v)$ , Eşitlik 2.2 ile verilmektedir. Şekil 2.7'de perspektif çizimi, görüntü gösterimi ve BLPF fonksiyonunun yarıçap en kesitleri verilmiştir.



Şekil 2.6. Butterworth alçak geçiren filtre için çeşitli gösterim şekilleri

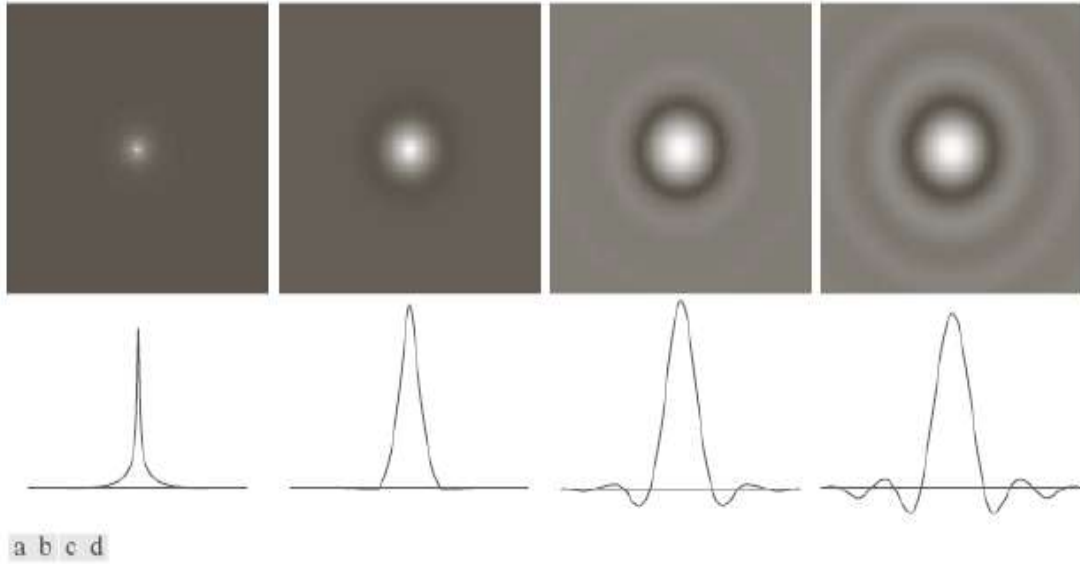
Butterworth alçak geçiren filtre transfer fonksiyonunun perspektif çizimi. (b) filtrenin görüntü olarak gösterimi. (c) 1 ila 4 arası derecelerdeki filtre yarıçap en kesitleri şekil 2.6 da verilmiştir. ILPF'nin aksine, BLPF transfer fonksiyonu, geçirilen ve süzülen frekanslar arasında açık bir kesim sağlayan keskin bir süreksizliğe sahip değildir. Yumuşak transfer fonksiyonlarına sahip süzgeçler için,  $H(u, v)$ 'nin azami değerinin aşağısında belirli bir kısımda olduğu noktalarda bir kesim frekansı yerinin tanımlanması alışıl gelmiş bir durumdur. Eşitlik 2.3'te (azami değeri olan 1'in %50 aşağısında)  $D(u, v) = D_0$ 'dır. Şekil 2.8(a)'da,  $n=2$  ve  $D_0$  Şekil 2.4(b)'deki beş yarıçapa eşitken Eşitlik 2.3'teki BLPF'nin Şekil 2.8(a)'ya uygulanmasının sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 2.7. (a) Asıl görüntü. (b)-(f)2.Derecedeki BLPF uygulanması

1.derecedeki bir BLPF uzamsal bölgede herhangi bir salınımına sahip değildir. Genel olarak salınımlar 2. Derecedeki filtrelerde anlaşılabilir ancak daha yüksek derecelerdeki filtrelerde önemli hale gelebilir. Şekil 2.9'da, çeşitli derecelerdeki BLPF'lerin ( tüm durumlarda 5'in kesim frekanslarını kullanarak) uzamsal gösterimi karşılaştırmayı göstermektedir. Ayrıca gösterilenler arasında her bir filtrenin ortasından geçen yatay tarama çizgisi boyunca var olan yeğinlik profili bulunmaktadır. 1. Derecedeki BLPF'de ne salınım ne de negatif değerler bulunmaktadır. 2. Derecedeki süzgeç orta düzey salınım ve küçük negatif değerler göstermektedir, ancak bunlar kesinlikle ILPF'de olduğundan daha az açığa vurulmuştur. Kalan görüntülerde görüldüğü gibi, BLPF'deki salınım yüksek

derecedeki filtreler için önemli bir hale gelmektedir. 20. Derecedeki BLPF'ler verimli alçak geçiren süzgeçler ve kabul edilebilir salınım arasında iyi bir uzlaşma örneğidir.

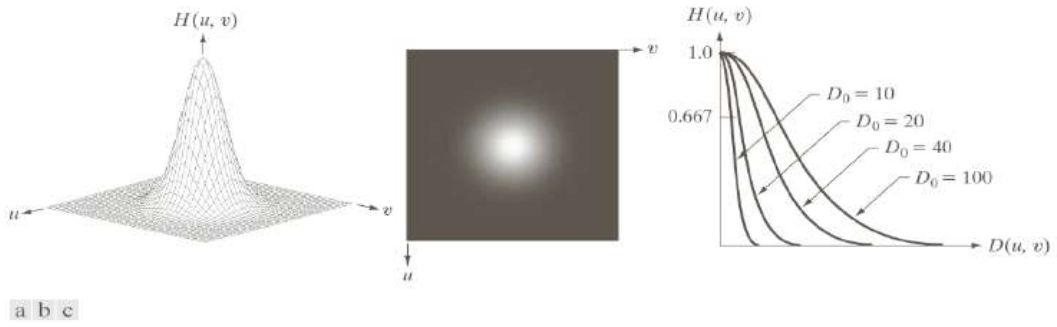


Şekil 2.8. (a)-(d) 1, 2, 5 ve 30. Derecelerdeki BLPF'lerin uzamsal gösterimleri

Gauss alçak geçiren filtrenin iki boyuttaki biçimi  $H(u, v) = e^{-D^2(u,v)/2\sigma^2}$  (2.4) olarak verilmiştir. Burada,  $D(u, v) = [(u - \frac{P}{2})^2 + (v - \frac{Q}{2})^2]^{1/2}$  (2.5) eşitliğinde olduğu gibi  $D(u, v)$  frekans çerçevesinin merkezinden olan uzaklıktır. En yüksek değeri 1 olan ve bu kısımda incelenen süzgeçlerle tutarlı olması için sabit sayı kullanılmamaktadır. Önceki gibi,  $\sigma$  merkez civarında yayılmanın bir ölçüsüdür.  $\sigma = D_0$  dersek, bu kısımdaki diğer süzgeçlerin gösterim biçimini kullanarak süzgeci ifade edebiliriz:

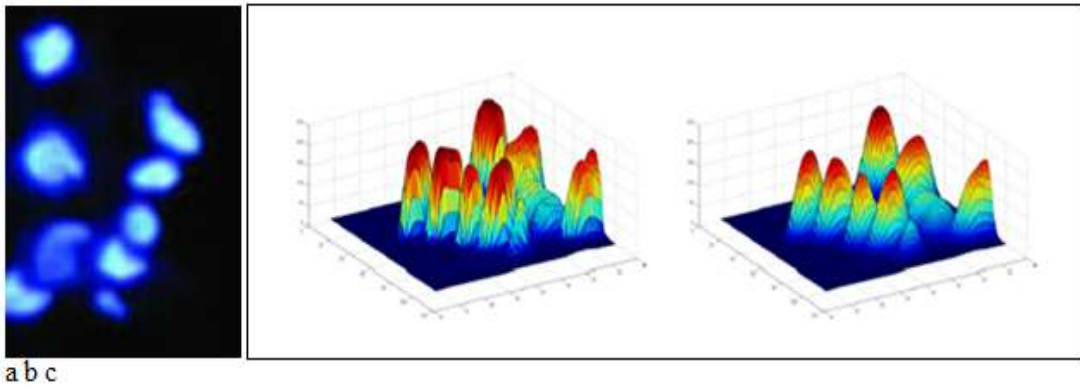
$$H(u, v) = e^{-D^2(u,v)/2D_0^2} \quad (2.6)$$

Burada  $D_0$  kesim frekansıdır.  $D(u, v) = D_0$  olduğunda, GLPF, azami değerinin 0.607 altındadır. GLPF'nin ters fourier dönüşümü de Gauss'tur. Bu durum, Eşitlik 2.4 veya 2.5'nin IDFT'sini hesaplayarak elde edilen uzamsak Gauss süzgecinin salınımlarının olmayacağı anlamına gelir. Şekil 2.10'da perspektif çizimi, görüntü gösterimi ve GLPF fonksiyonunun yarıçap enkesiti verilmiştir.

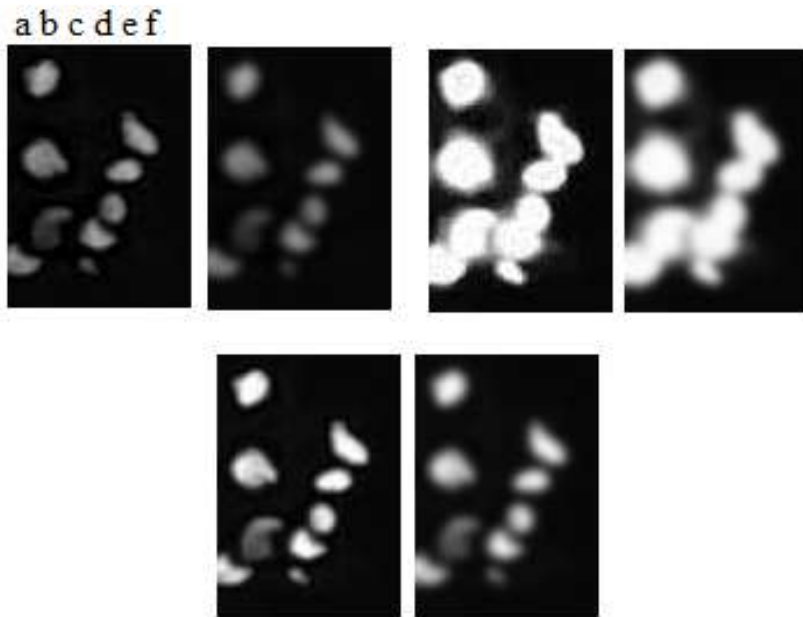


Şekil 2.9. GLPF transfer fonksiyonunun perspektif çizimi

GLPF'nin söz konusu olduğu durumlarda salınım olmayacağından emin olmaktadır. Bu yüzden Gauss filtresi kullanarak fluoresans görüntülerdeki gürültü yok edilerek Şekil 2.11'ki hale getirmek hedeflenmiştir.



Şekil 2.10. (a) Orijinal görüntü, Gauss (b) öncesi, (c) sonrası



Şekil 2.11. Gauss filtresi kombinasyonları

Şekil 2.11.(a) Kırmızı kanal Gauss öncesi, (b) Kırmızı kanal Gauss sonrası, (c) Mavi kanal Gauss öncesi, (d) Mavi kanal Gauss sonrası, (e) Yeşil kanal Gauss öncesi, (f) Yeşil kanal Gauss sonrası yapılan çalışmalar verilmiştir. Gauss çapı  $\sigma=2$  olarak belirlenen filtre görüntülerdeki dalgalı görüntüyü yok etmek için kullanılmıştır. Şekil 2.12'de görüldüğü üzere tek bir pik noktası kalacak ve ayrık şekilde en net görülebilen kanal Yeşil kanal olduğundan işlemlere yeşil kanal ile devam edilmiştir.

### 2.3. Eşikleme

Görüntü bölütleme, görüntü ve örüntü analizinin en önemli basamağını oluşturmaktadır. Yapılacak analizin başarılı olup olmaması gerçekleştirilen bölütlenmenin başarımına doğrudan bağlıdır. Bir görüntüyü oluşturan parçalarına veya nesnelere ayırma işlemine görüntü bölütleme denir [1]. Başka bir deyişle görüntü bölütleme, homojen bir küme içerisinde aynı karakteristiğe sahip alanların çıkartılması, arka plandan ayrılması ve daha belirgin hale getirilmesi işlemine verilen addır. Eşikleme, görüntü bölütleme teknikleri içerisinde hem en temel hem de en çok kullanılanıdır. Başka bir deyişle görüntünün sadece parlaklık bilgisi göz önüne alınarak gerçekleştirilen bölütleme işlemidir. Görüntü eşikleme yöntemleri, bölütlemeyi, görüntü histogramındaki vadilere eşikler yerleştirerek gerçekleştirirler. Literatürde birçok eşikleme algoritması önerilmiştir [2-11]. Bu algoritmalar otomatik olarak histogramın vadi noktalarını tayin edebilmek için bir dizi işlem önerirler. Histogram entropisine dayalı görüntü eşikleme son yirmi yılda bir hayli ilgi görmüştür. Entropi bir sistemdeki bilgi miktarı olarak tanımlanır [12]. Histogram entropisine dayanan yöntemlerden bazıları görüntüdeki bilginin göstergesi olarak eşiklenmiş görüntünün entropisi en büyük olacak şekilde eşik değeri belirlemeye çalışırken, bazıları da gri seviye görüntü ile eşiklenmiş görüntü arasındaki çapraz entropinin en düşük olduğu değeri bulmaya çalışmaktadırlar. Tek boyutlu entropi ile eşiklemeyi ilk kez Pun önermiştir [2]. Pun'a göre optimum eşikleme, gri seviyesi görüntüyü ön ve arka plan olacak şekilde iki kümeye ayırabilecek maksimum sonrasal bir entropi değerinin bulunması ile sağlanabilir. Daha sonra bu çalışma Kapur tarafından geliştirilmiştir [3]. Lee ve Li, minimum çapraz entropi yaklaşımını kullanarak eşikleme işlevini gerçekleştirmiştir [4]. Benzer şekilde Pal, minimum çapraz entropi yaklaşımı ile görüntü eşikleme önermiştir [5]. Pal, sonrasal olasılıklar

için Poisson dağılımının görüntüler için daha uygun olduğunu önermiştir. Sahoo ve diğ., Renyi entropisini kullanarak yeni bir eşikleme yöntemi önermiştir [6]. Burada kullanılan eşik değeri, alfa parametresine bağlı olarak bulunan üç farklı eşik değerinin ağırlıklı ortalamasıdır. Diğer taraftan, bölütleme için sadece gri-seviyesi histogramının kullanımı, görüntüde bulunan ve daha iyi bir bölütleme için gerekli olan bazı bilgilerin kaybedilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle Abutaleb ve diğ., iki boyutlu bir histogram (gri seviyesi/ yerel ortalama gri seviyesi) yapısı önermiştir [7]. Benzer bir yaklaşım daha sonraları Brink tarafından sunulmuştur [8]. Pal ve Pal, eş-oluşum (cooccurrence) matrisi yaklaşımını önermiştir [9]. Sahoo ve diğ., iki boyutlu Renyi entropisini kullanan bir eşikleme yöntemi önermiştir [10].

Sezgisel özellikleri, gerçekleştirilmesinin basitliği ve hesaplama hızı nedenleriyle, görüntü eşikleme görüntü bölütleme uygulamalarında önemli bir yere sahiptir. Görüntülerde yeğinlik histogramının siyah arkaplan üzerinde parlak nesnelere oluşmuş bir  $f(x, y)$  görüntüsüne ait olduğunu düşünün. Bu histogramdaki nesne ve arkaplan pikselleri iki ayrı baskın grupta toplanmış yeğinlik değerlerine sahiptirler. Nesnelere arkaplandan çıkarmak için basit bir yol bu biçimleri ayırabilecek  $T$  eşik seviyesini seçmektir. Daha sonra  $f(x, y) > T$  için görüntüdeki  $(x, y)$  noktaları nesne noktası olacak; diğer noktalar ise arkaplan noktası olacaklardır. Diğer bir deyişle, bölütlenmiş  $g(x, y)$  görüntüsü 2.7 eşitliği ile ifade edilir.

$$g(x, y) = \begin{cases} 1, & f(x, y) > T \text{ ise} \\ 0, & f(x, y) \leq T \text{ ise} \end{cases} \quad (2.7)$$

$T$  bir bütün görüntü boyunca uygulanabilir sabit bir değer olduğunda, bütün eşitlikte verilen işlem global eşikleme olarak adlandırılacaktır.  $T$ 'nin değeri bütün görüntü boyunca değişirse, değişken eşikleme terimi kullanılacaktır. Görüntünün herhangi bir  $(x, y)$  noktasındaki  $T$  değeri seçiminin,  $(x, y)$ 'nin komşu piksel özelliklerine bağımlı olacağı durumlarda (örneğin komşu piksellerin ortalama yeğinlik değeri), bazen yerel veya bölgesel eşiklemeyi belirtmek için değişken eşikleme kullanılacaktır.  $T$  bunların  $(x, y)$  uzamsal koordinatlarına bağımlı ise, değişken eşikleme yerine adaptif eşikleme kullanılır. Bu terimlerin kullanılması çok genel değildir ve görüntü işleme literatüründe değişik biçimlerde kullanılabilirliklerini görmek olası bir durumdur. Bir

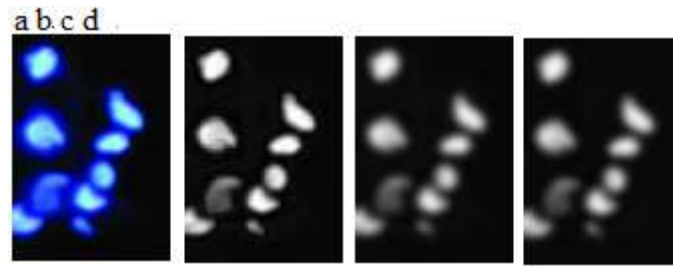


görüntünün sadece iki temel parlaklık bölgesinden oluştuğu varsayılırsa böyle bir görüntüye ilişkin histogram, parlaklık olasılık yoğunluk fonksiyonu  $p(z)$ 'in kestiriminde kullanılabilir. Bu olasılık yoğunluk fonksiyonu, biri koyu diğeri de açık olmak üzere iki parlaklık bölgesine ilişkin olasılık yoğunluk fonksiyonlarının bir toplamı veya karışımı olacaktır. Karışım parametreleri, her bir parlaklık bölgesinin alanı ile orantılıdır. Eğer ki bu parlaklık bölgelerini temsil eden yoğunluk fonksiyonlarının biçimi bilinirse veya bu fonksiyonlar üzerinde bir varsayım yapılırsa, görüntüyü iki parlaklık bölgesine ayırmak için gerekli olan en iyi (optimum) eşik değerini en küçük hata ile tanımlamak mümkün olacaktır. Bir görüntünün toplamsal Gauss görüntüsü ile birleştirilmiş iki değerden oluştuğunu varsayarak,  $p_1(z)$  arka plana ve  $p_2(z)$  nesneye ilişkin olasılık yoğunluk fonksiyonları ile temsil edilirse karıştırılmış olasılık yoğunluk fonksiyonu  $p(z) = (1 - \theta) p_1(z) + \theta p_2(z)$  ile verilir. Burada  $\theta$ , görüntü içerisinde nesneye ilişkin piksellerin var olma olasılığına karşı düşer.

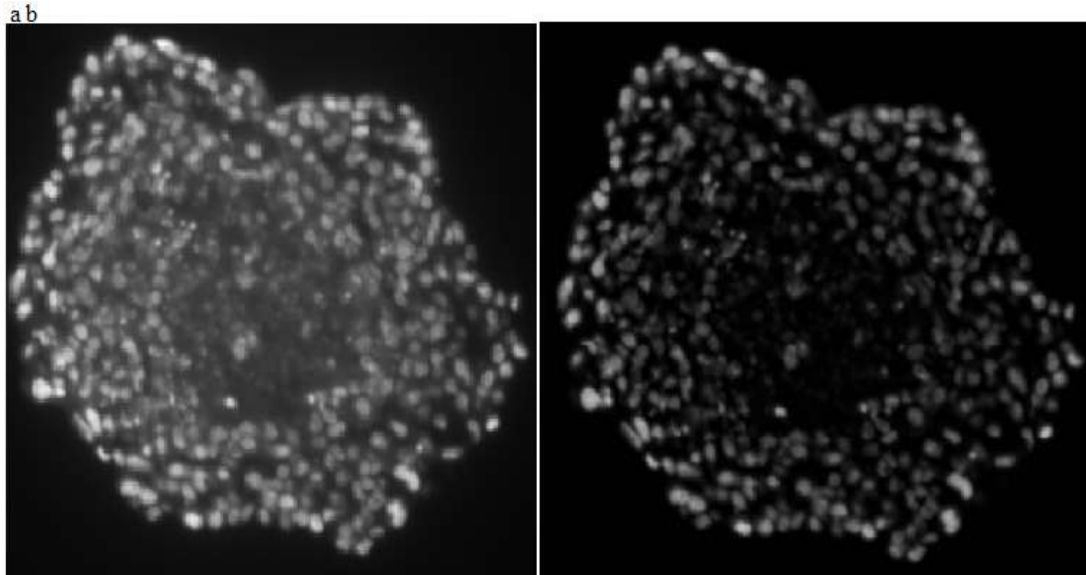
Doku parçaları üzerinde gerçekleşen ilk çalışmalar genellikle bu alanda en popüler olarak görülen eşikleme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Eşikleme temel olarak grilik seviyesi üzerinde yapılan hesaplamalar ile arka planın ve görülmesi istenen objenin birbirinden ayırt edilebilmesi için pikseller seviyesinde birbirinden ayrılması ile gerçekleştirilir. Örneğin mikroskopik bir görüntü içerisinde grilik seviyesine bağlı olan eşikleme değeri ( $t^*$ ) dikkatli bir şekilde seçilerek hücrelerin dominant değeri ile arka plan yoğunluğu arasında olması sağlanır. Method basit görünmesine rağmen medical görüntü analizinde en önemli ve temel olanlardan biri olarak görülür. Eşikleme yapılan çalışmalarda 4 kategori'de toplanmıştır ve bunlar: Nokta bazlı global eşikleme, alan bazlı global eşikleme, local eşikleme ve çoklu eşikleme olarak belirlenmiştir. Doku parçalarının görüntü analizinde eşikleme tekniği temel olarak histogram tabanlı olarak gerçekleştirilir bunun sebebi yöntemin basit olmasına karşılık yüksek çözünürlüklü görüntülerde çok iyi sonuçlar vermesinden kaynaklanmaktadır. Bu alanda yapılan bir çok çalışmada grilik seviyesine göre seçilen manalı bir eşikleme değeri ile iyi sonuçlar elde edilmiştir [11-13]. Bu alanda ayrıca bazı araştırmacılar hücreleri sayabilmek için eşikleme yöntemini kullanmıştır. Eşik değeri seçilirken keyfi olarak hareket edilen analizlerde bulunmaktadır. Bu analizlerin amacı daha çok çok hücre sayımı yapabilmek olduğundan dolayı sayının

artması için denemeler yapılabilmektedir [14]. Yarı otomatik sayma sistemleri pikselleri mekansal düzlemde inceleyerek kullanıcı tarafından seçilen eşikleme aralığında kullanıma olanak sağlayarak interaktif olarak sayım yapılmasını sağlamaktadır [15].

Uygulanan yöntem içerisinde flüoresans görüntülemekten dolayı tek parça olmayan arka plana eşikleme yöntemi uygulanmıştır. Eşikleme değeri  $t = \mu + x\delta$  formülü ile elde edilmiştir.  $\mu$  ortalama değer,  $\delta$  görüntünün standart sapması,  $x$  ise deneysel olarak belirlenmiş sabit sayı, şeklinde kullanılmaktadır.  $t$ 'den daha küçük olan piksel yoğunlukları 0'a eşitlenerek hücre görüntülerinin daha ön plana çıkması hedeflenmiştir.



Şekil 2.12. Fluoresans görüntü



Şekil 2.13. Eşikleme yapılmış Yeşil kanal Fluoresans görüntü karşılaştırması

Şekil 2.12 içerisinde sırasıyla (a) orijinal, (b) yeşil kanal, (c) yeşil kanal Gauss filtresi, (d) yeşil kanal Gauss filtresi uygulandıktan sonra eşikleme işlemi olarak

verilmiştir. Eşikleme yapılması ile hücre seviyesinde fluoresans parlaklığı olmayan pikseller 0 değerine getirildiğinden dolayı hücreler ön plana çıkarılmıştır. Bu sayede sayım işlemi için ister bu işlemten sonra manuel olarak ister otomatik olarak devam edilecek ise dahi sayımda büyük kolaylık sağlamaktadır. Bu bölümde, incelenen iki boyutlu entropi eşikleme algoritmalarından sadece yerel entropi yönteminin, farklı görüntüler üzerindeki uygulama sonuçları verilmiştir. Yine aynı görüntülere tek boyutlu entropi eşikleme algoritmalarından bazıları uygulanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. İncelenen algoritmaların bilgisayar benzetimleri MATLAB ortamında yapılmıştır. Bulunan en uygun eşik değeri, hücreleri arka plandan ayırabilecek olandır.

#### 2.4. Histogram Bölütleme ve Analizi

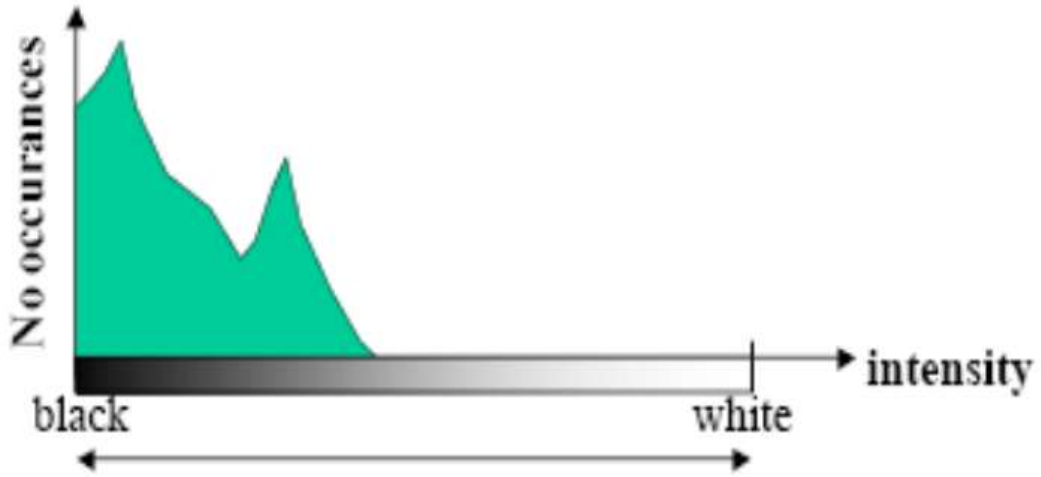
Gri seviyesi histogramı, görüntü içindeki her bir gri seviyesine karşılık gelen ilgili gri seviyesindeki piksel sayısını karşılık düşüren bir fonksiyondur. Apsis eksenini gri seviyesini gösterirken ordinat eksenini ise meydana gelme sıklığını göstermektedir. Şekil bir örnek göstermektedir. Histogram, sayısal bir resim içerisinde her renk değerinden kaç adet olduğunu gösteren grafikdir. Bu grafiğe bakılarak resmin parlaklık durumu ya da tonları hakkında bilgi sahibi olunabilir. Verilen kötü kontrastlı bir görüntüyü iyileştirmek için, görüntünün histogramını geniş bir alana yayabiliriz. Bu iki şekilde gerçekleştirilebilir.

Histogram Germe-Kontrast germe(Histogram stretching): Histogram germe, histogram değiştirmenin özel bir halidir.

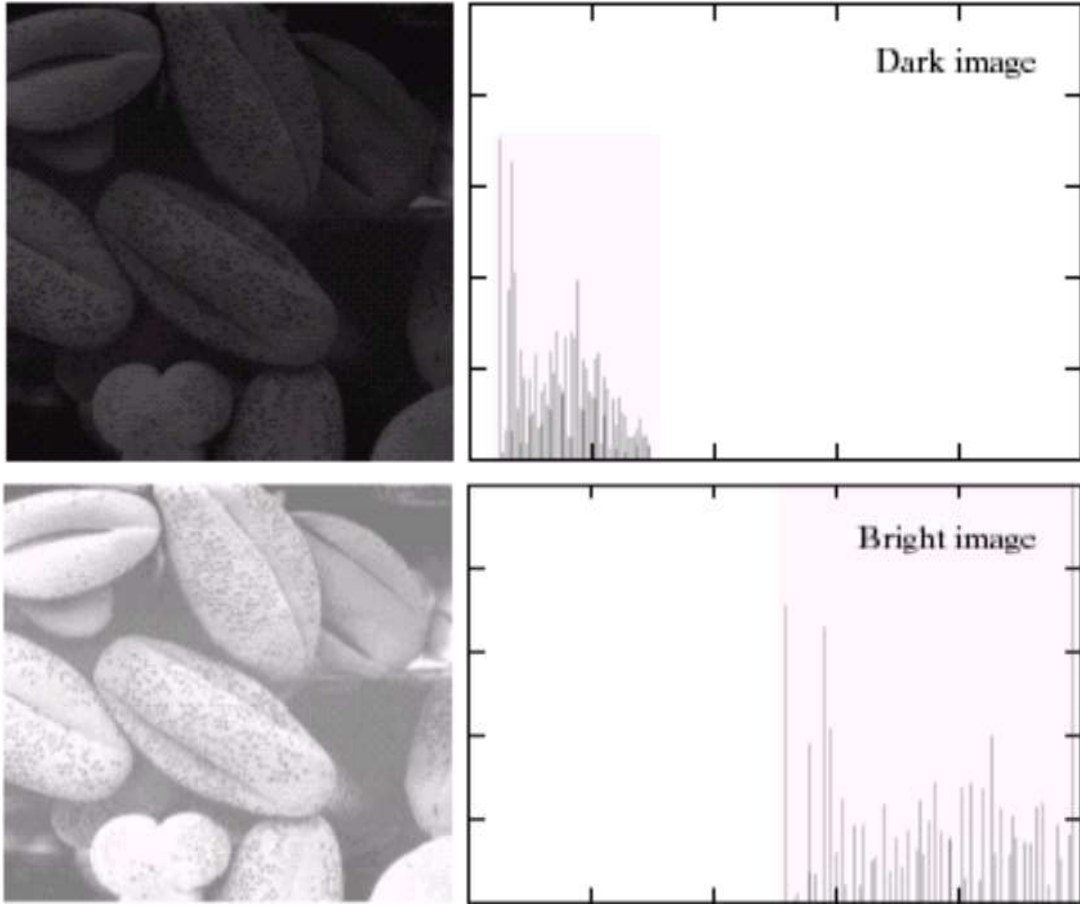
Histogram Eşitleme ( Histogram equalization):Kötü kontrastlı resimlerin (histogramı dar bir alana yayılmış görüntüler), kontrastlarını iyileştirmek için bir genel yöntemdir. Temel esprisini histogramı geniş bir bölgeye yaymaktır. Varsayalım ki histogramı ve ilişkin tablosu aşağıda verilen bir görüntüye sahibiz. Burada;  $n_i$ ,  $i$ . gri seviyedeki piksel sayısı değeridir. Biz bu gri seviye değerlerini, parça parça lineer bir fonksiyon uyguluyarak, orijinal aralığın dışına yayabiliriz. Bu fonksiyon; 5-9 arasındaki gri seviyeli pikselleri 2-14 gri seviyeleri arasına yayar. Aşağıdaki denklemde  $i$ , orijinal gri seviye ve  $j$  dönüşümden sonraki değerdir. Bu aralığın dışındaki Gri seviyeleri ya

(bu durumda olduğu gibi) tek başına kalır ya da aşağıdaki parça parça lineer fonksiyonun işlevine göre değişir. Bu uygulamada tek başına (değiştirilmeden) bırakılmıştır [83].

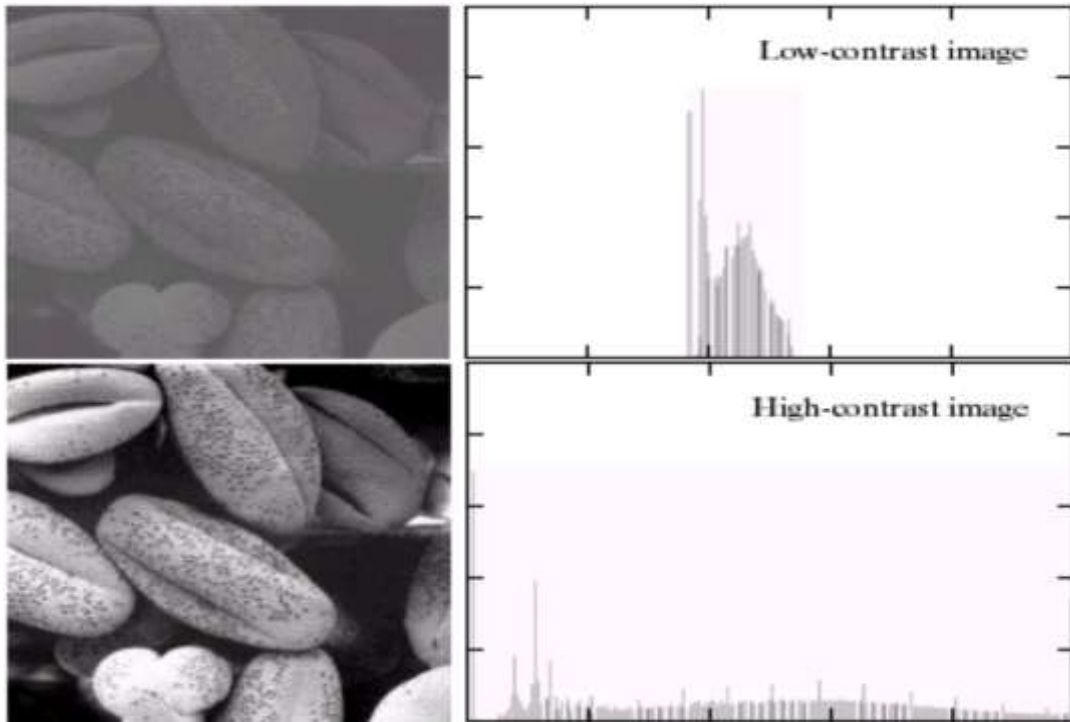
Histogram matematiksel olarak aşağıdaki şekilde gösterilebilir.  $h(r_k) = n_k$  ,  $r_k$  : k'nıncı parlaklık değeri  $n_k$  : k'nıncı parlaklık değerinin görüntüdeki sayısı



Şekil 2.14. Grilik seviyesi gösterimi. 8-bit, 256 gri seviye içerir

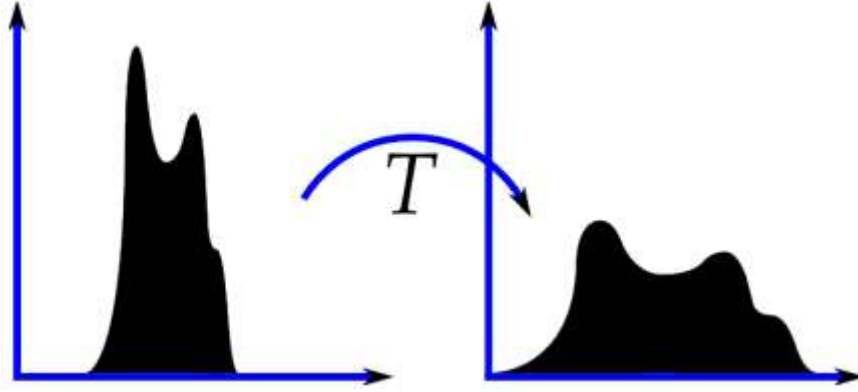


Şekil 2.15. (a) Koyu görüntü histogramı (b) açık görüntü histogramı



Şekil 2.16. (a) Düşük kontrastlı görüntü (b) yüksek kontrastlı görüntü

Dönüştürülen ve orijinal histogramlar olasılık yoğunluk fonksiyonları ile ifade edilebilirler.

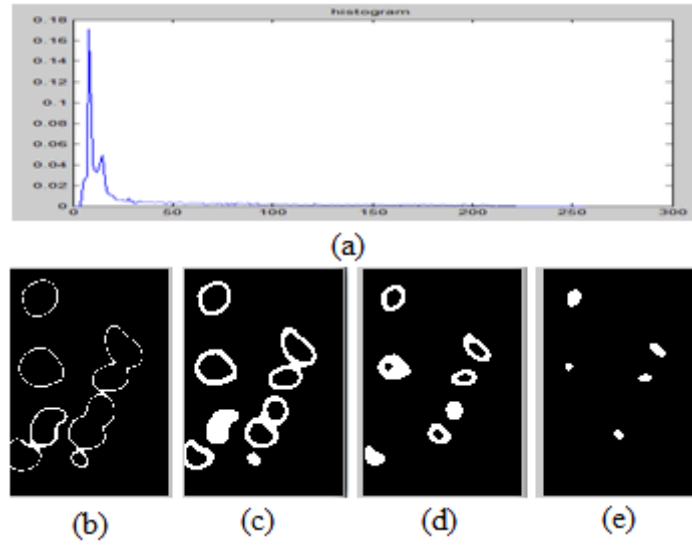


Şekil 2.17. Histogram genişletme örneği

$$p_x(i) = p(x = i) = \frac{n_i}{n}, 0 \leq i < L \quad (2.8)$$

Histogram, sayısal bir resim içerisinde her renk değerinden kaç adet olduğunu gösteren grafikdir. Bu grafiğe bakılarak resmin parlaklık durumu ya da tonları hakkında bilgi sahibi olunabilir. Histogram eşitleme ile belirli bir ton etrafında toplanan histogram eğrisi (0-255) tonları arasına düzgün bir şekilde dağıtılır böylece resmin gri ton dağılımının homojen olarak yapılandırılması sağlanır. Histogram eşitleme işleminde, resmin kümülatif gri seviye dağılım skalası üzerinde normal dağılım uygulanmaktadır. Bu yeniden dağılım, gri seviye dağılımında dengeleme sağlamaktadır.

Bu sayede alınan Flüoresans görüntü içerisinde yapılan işlemlerden sonra histogram bölükleme uygulanması durumunda birbiri üzerine denk gelen hücrelerin ayrılması sağlanarak sayım için hazırlanmıştır.



Şekil 2.18. Histogram bölütleme

Şekil 2.18 içerisinde: a) Şekil 2.3 (a)'nın Histogram görüntüsü b) [0, 63], c) [64,127] d) [128,191], ve e) [192,255] görüntünün bit haritasını göstermektedir.

Bu analiz ile görüntüde grilik seviyesinin toplandığı yerler ve kesikli olan kısımlar bulunarak. Hücrelerin görüntü üzerinde kaybolmadan birbirinden ayrılabilmesi histogram sonucunda çıkan görüntülerin kombinasyonu ile gerçekleştirilecektir.

## 2.5. Maksimum Nokta Analizi

Izole nokta, ince çizgi veya resim kenarları gibi (gri seviye değerleri ani değişen) süreksizlikleri, düşük ve yüksek filtrelemeye benzer maskeler kullanarak tespit edebilmeye dayanır. Bu maskelerin temelini türev işlemleri (1. ve 2. türev) oluşturur.

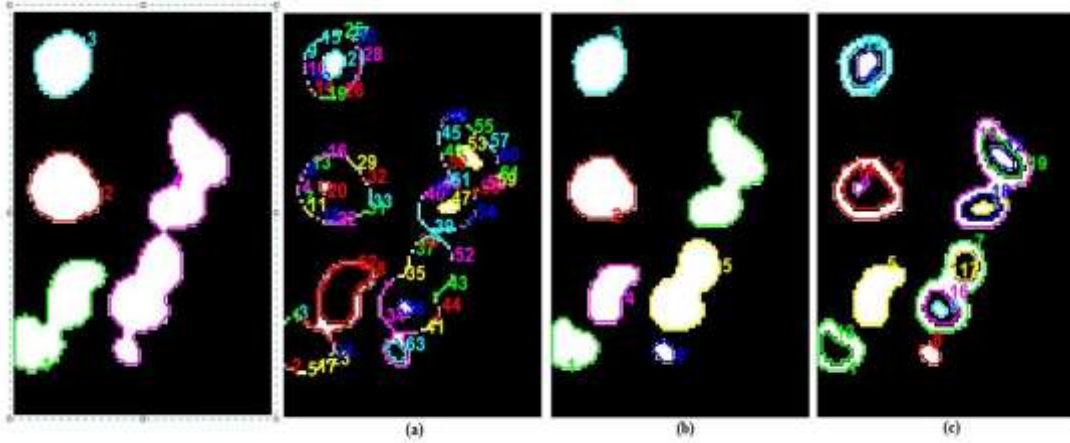
1.derece Türev İşlemi (First-order derivative-tek değişkenli)

$$\frac{df}{dx} = f'(x) = f(x + 1) - f(x) \quad (2.9)$$

2.derece türev İşlemi (Second-order derivative - tek değişkenli)

$$\frac{\partial^2 f}{\partial x^2} = f(x + 1) + f(x - 1) - 2f(x) \quad (2.10)$$

Belirtilen tüm işlemlerden sonra hücre sınırlarının en iyi olarak belli olduğu kombinasyon ile hücre çevresi ve orta noktası belirgin hale getirilecektir. Bu sayede hem hücrenin sınırı hem de filtrelemeden dolayı gerçekleştirilen tek maksimum noktanın teke indirilmesi sayesinde hücre orta noktası bulunarak sayım işlemi gerçekleştirilebilecektir.



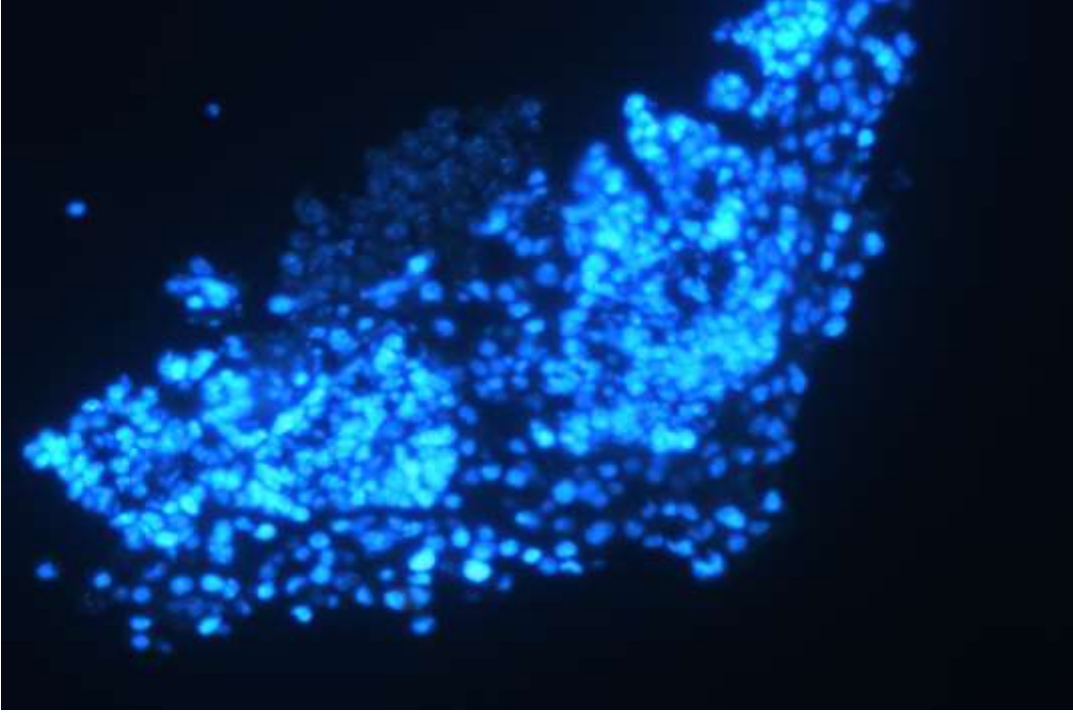
Şekil 2.19. Histogram analizi ile hücre maksimum noktası ve sınır belirlenmesi

Şekil 2.19 da görüldüğü üzere bit haritasında (a)'da olduğu gibi sınır olarak 0-63 arası harita belirlenir ise kopukluklardan dolayı bilgisayar algoritması sınır belirleyememektedir. Hücre görüntüsünden şekilde görüldüğü gibi (a) çıkarılır ise birbiri üzerine denk gelen hücrelerin bir kısmını algoritma yardımı ile ayırt edebildiğimiz görülebilmektedir. Daha sonra bit haritasında 64-128 ile 192-255 arasında değerler toplanarak tepe noktası belli olmayan hücrelerin maksimum noktaları belirlenerek, 0-63 grilik seviyesini çıkarmamıza rağmen birbirine bağlı olarak kalan hücrelerin maksimum noktalarının belirlenmesi sağlanmıştır.



### BÖLÜM 3. BENZETİM SONUÇLARI

Alınan embriyonik görüntüler 8 gün boyunca nöral farklılaşma prosesi içerisinde kültür ortamına bırakılmıştır. Embriyonik kısımlar uyarılarak inkübasyon ile nöral fenotip haline getirilmiştir. Son 4 gün içerisinde Retionik asit  $2\mu M$  final konsantrasyona ulaştırılmaktadır. Daha sonra %4 ölçüsünde parafomaldehit (PF) 30 dakika kadar bırakılarak sucros gradyanlı (10, 20 ve 30% , 30 dakika süreyle) çözeltide tutularak doku içerisine en iyi sıcaklığın oluşturduğu(OCT) proses içerisinde dokular daha sonra sıfırın altında saklanarak tutulmaktadır. Ayarlanmış parçalar kristot içerisinde ayrı ayrı embriyonik hücrelere uygulanmıştır. Labaratuar ekipmanları  $10\mu m$  kalınlıkta ayarlanmıştır, bunun nedeni nükleilerin ortalama büyüklüğüne uymasından dolayıdır. Diğer alınan parçalar 5 dakika boyunca inkübasyon işleminde bir çeşit ters nüklei işaretleme malzemesi olan 4-6 Diamidino-2-phenylindole(DAPI) içerisine bırakılmıştır. Kurulan sistem Nikon Eclipse TE300 değiştirilmiş epi-flüoresans mikroskobu ile MagnaFire Digital CCD kamera ve İmage Pro Express yazılımı kullanılmaktadır. Görüntü edinme prosesi yarı otomatik olarak uzmanlar tarafından büyütme, zamansal olarak kültürün görüntülenmesi ve fokus özellikleri kontrol edilerek yapılmaktadır. Görüntülerin yakalanma çözünürlükleri 1032x1040 piksel olarak 40x zoom özelliğine cevap verebilecek şekilde alınmıştır. Alınan görüntüler Tagged İmage File (.tif) formatında kayıpsız olarak LZW sıkıştırması ile kaydedilmiştir. Şekil 3.1'de alınan görüntü örneği gösterilmiştir [8].

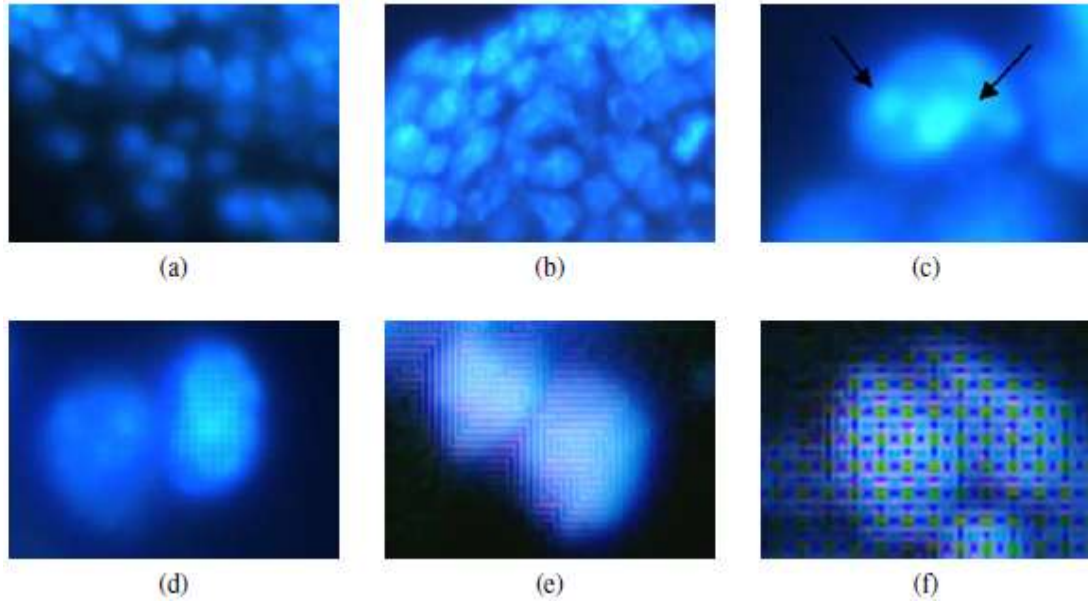


Şekil 3.1. Floresans görüntü örneği

Yanlış ayarlanmış görüntüler yanlış odaklanmış görüntüleri oluşturmaktadır(Şekil 3.2 (a)). Bu görüntülerde sınırlar belli olmadığından dolayı manuel sayımda problemler çıkmaktadır. Gerçekleşen bir diğer problem ise kısmi olarak tıkanmaların gerçekleşmesi durumudur ve bu durumda sayım işlemi zorlaşmaktadır. Alınan kesitlerin ortalama olarak nükleli boyutlarında olması durumunda dahi alınan hücre görüntülerin kısmen üst üste gelerek sayımı zorlaşabilmektedir. Tek bir alanda bir çok hücrenin bulunması sayım işlemi zorlaştırmaktadır. Bu durumlarda insan görüşünün bu hücreleri birbirinden ayırması çok zorlaşıp bazı durumlarda imkansız hale gelmektedir(Şekil 3.2(b)). DAPI prosesi hücrelere bağlanarak onları mavi/açık mavi hale getirerek mikroskop ile görüntülenebilmesini sağlamaktadır(Şekil 3.2(c)). Merkezde daha açık renk içeren ve sınırlara doğru renk parlaklığı azalan bir hale gelmektedirler. Fakat bazen DNA'nın nükleli içerisinde 2 kısımda konsantre halde durmasından dolayı iki yada daha fazla parlaklık belirlenebilmektedir.

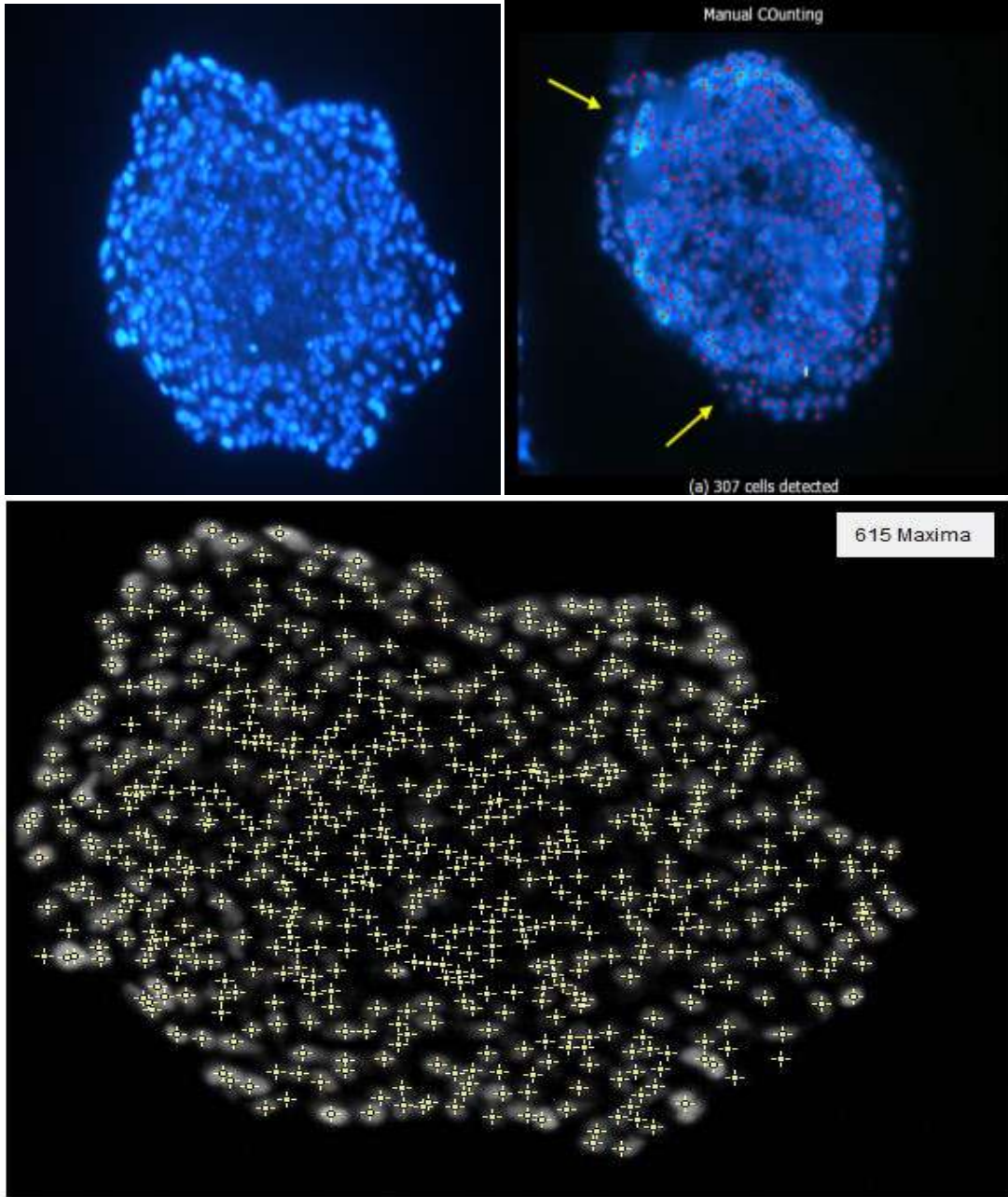
Alınan görüntülerde gürültünün olması doğal bir sonuçtur (Şekil3.2(d)). Fakat yanlış parametre seçimi farklı ve daha kuvvetli gürültülere sebep olabilmektedir(Şekil 3.2(e)). Gürültünün var olması Embriyonik hücre sayımında daha farklı sorunlara

sebepler olarak otomatik olarak sayım işlemini zorlaştırmaktadır. Bu tarz bir algoritmanın avantajlarından biri farklı olarak çıkan sonuçları azaltarak uzmanların önüne aynı sonuçların gitmesini sağlamaktır. Bu bölümde Embriyonik hücrelerin sayımı ve tespiti için yazılan program sonucunda ortaya çıkan benzetim sonuçları ele alınmıştır.



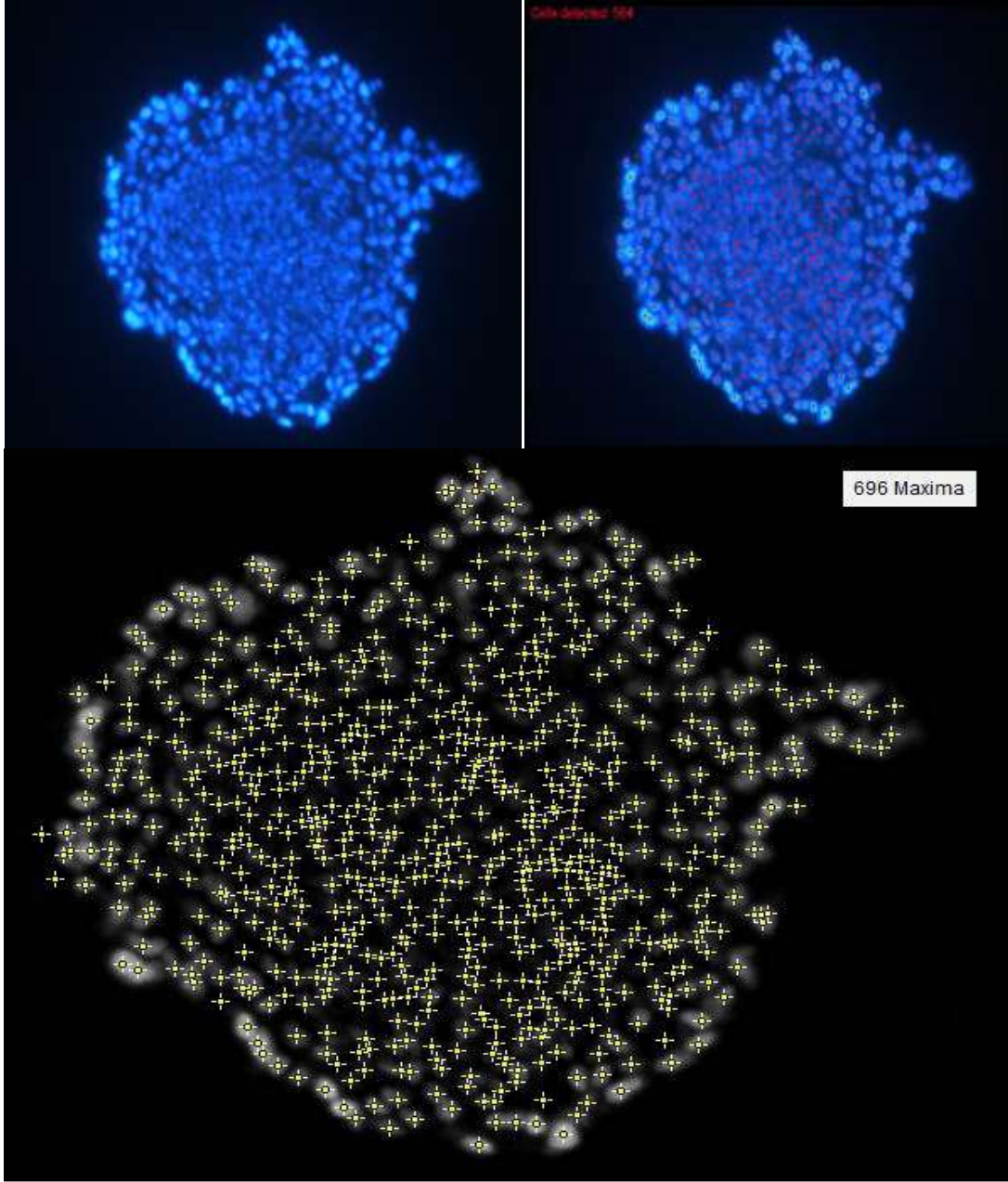
Şekil 3.2. Hatalı alınmış görüntü durumları

Görüntüde; (a) yanlış odaklanmış görüntü (b) üst üste gelerek sayım durumunun zorlaşması durumu (c) 2 DNA noktasının bulunma durumu (d) normal gürültü seviyesi (e) düşük gürültü seviyesi (f) yüksek gürültü seviyesi.



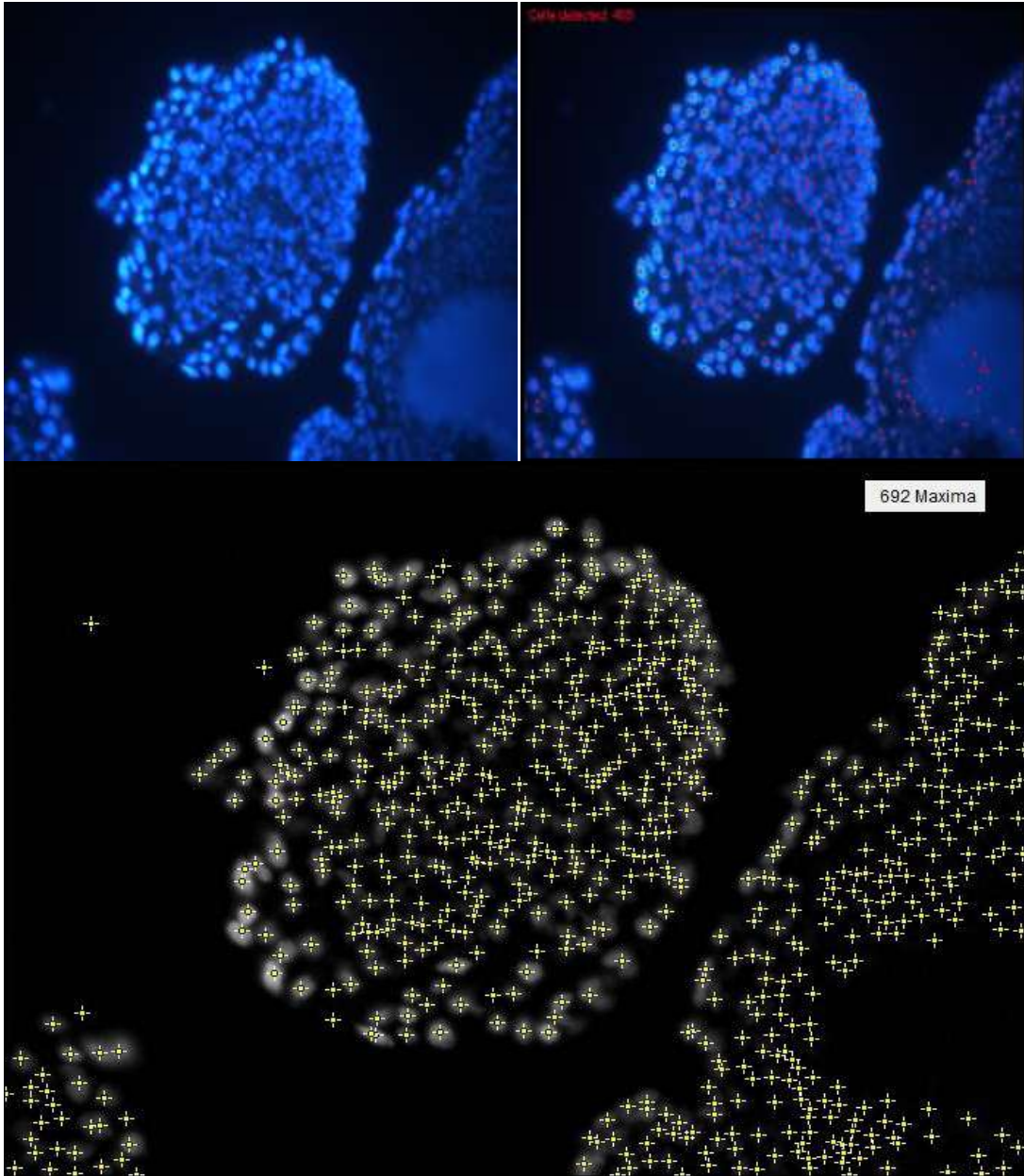
Şekil 3.3. Floresans görüntü örneği

Manuel olarak yapılan çalışmalara göre daha fazla hücre bulunarak yorumlama için uzman görüşüne sunulmuştur. Bazı görüntüler manuel olarak önceki çalışmalarda sayım için sunulmuştur. Fakat bu görüntülerin sayımı çok zor olduğundan sınırlı sayıda dırlar.



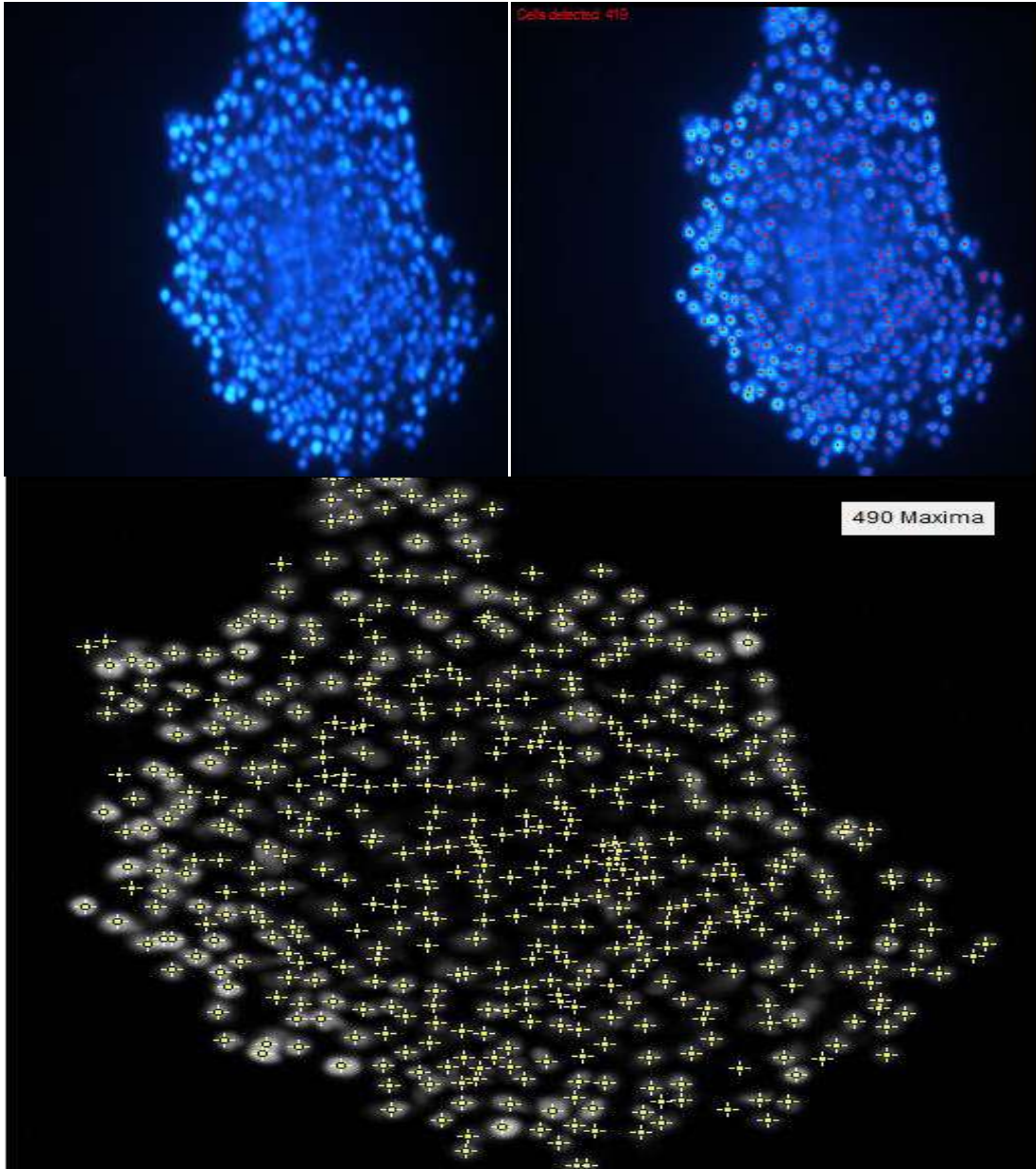
Şekil 3.4. Üst üste gelen hücrelerin bulunduğu Flüoresans görüntü örneği

Alınan Fluoresans görüntüde orta kısımda toplanan görüntülerin manuel olarak sayılabilmesi mümkün olmamıştır. Göz ile alınan sonuçlara göre %20 oranında artış sağlanmıştır. Belirli sayıdaki görüntüler için önceki yapılan çalışmalarda geçen otomatik sayım sonuçları da verilmiştir.



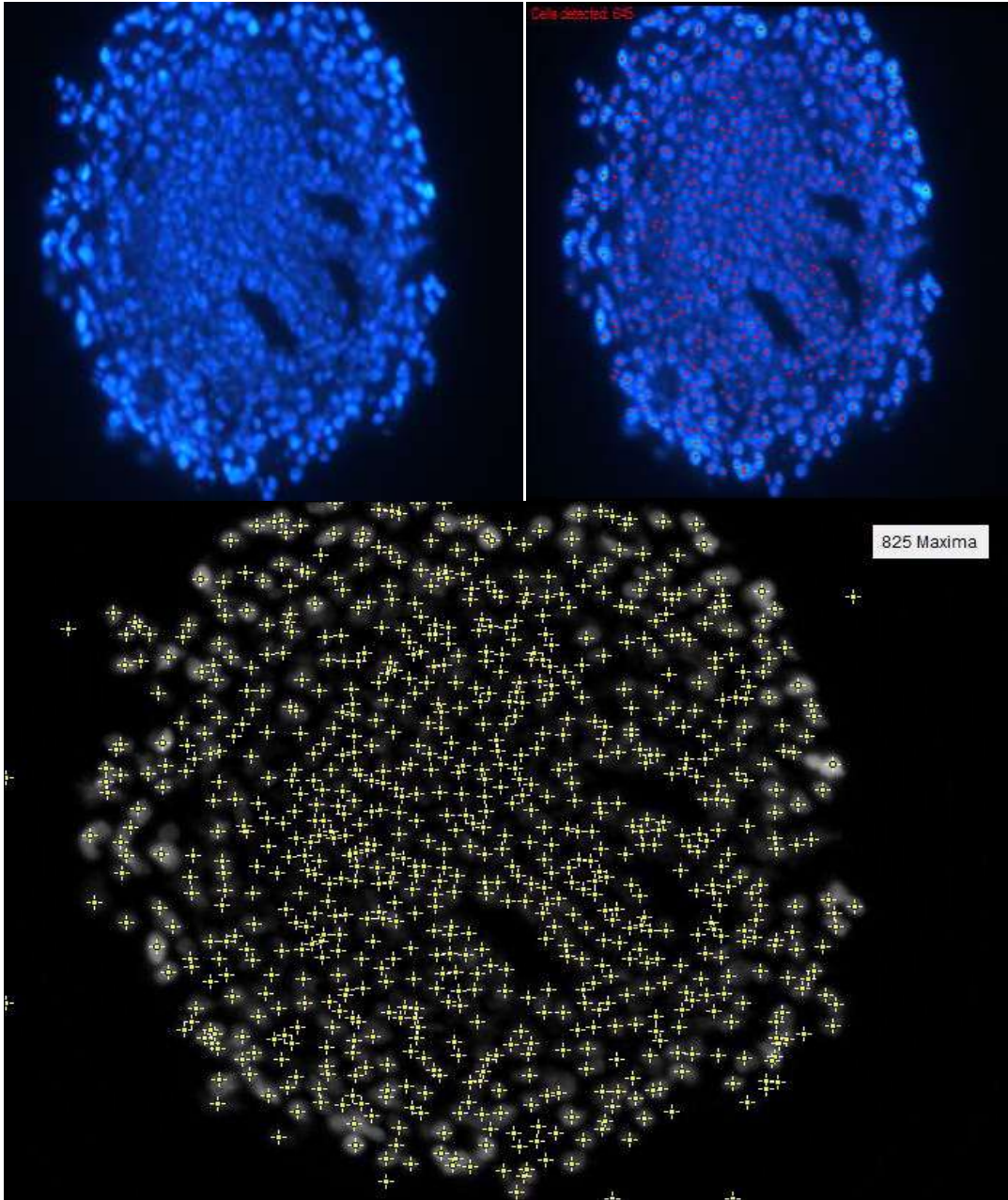
Şekil 3.5. Sayılamayan kümelenmiş hücre içeren Flüoresans görüntü örneği

Görüntüde tamamen üst üste gelen kısım otomatik sayım işleminde ayırt edilememiştir. Fakat sayım sonuçları göz ile sayıma göre daha fazla ve daha doğru olarak bulunmuştur.



Şekil 3.6. Flüoresans görüntü örneği

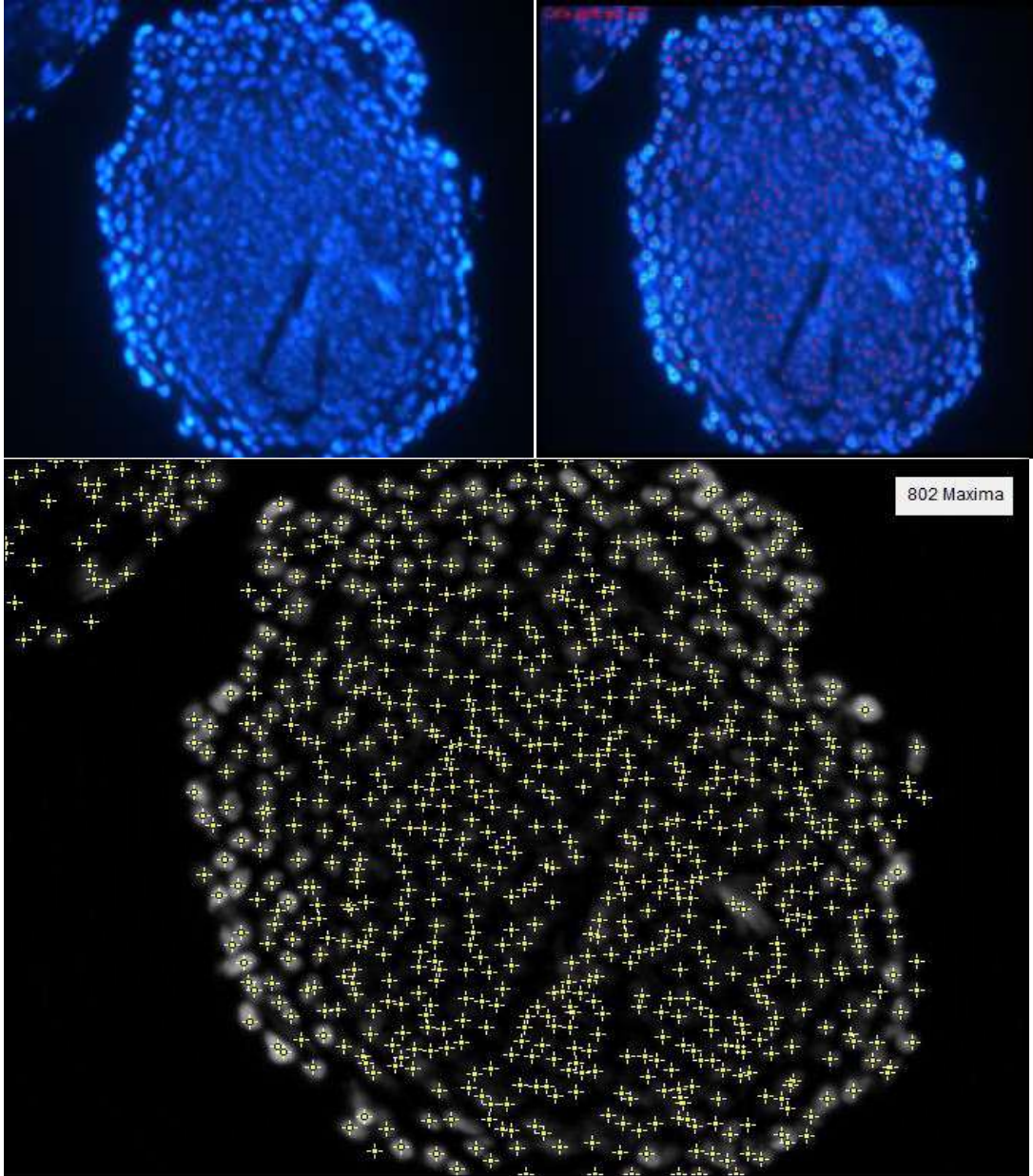
Görüntü de çıplak gözle sayılması mümkün olmayan kısımlar Flüoresans olarak görüntü sayesinde sayılabilir hale getirilerek doğruluğu artırılmıştır.



Şekil. 3.7. Çok sayıda hücre içeren Flüoresans görüntü örneği

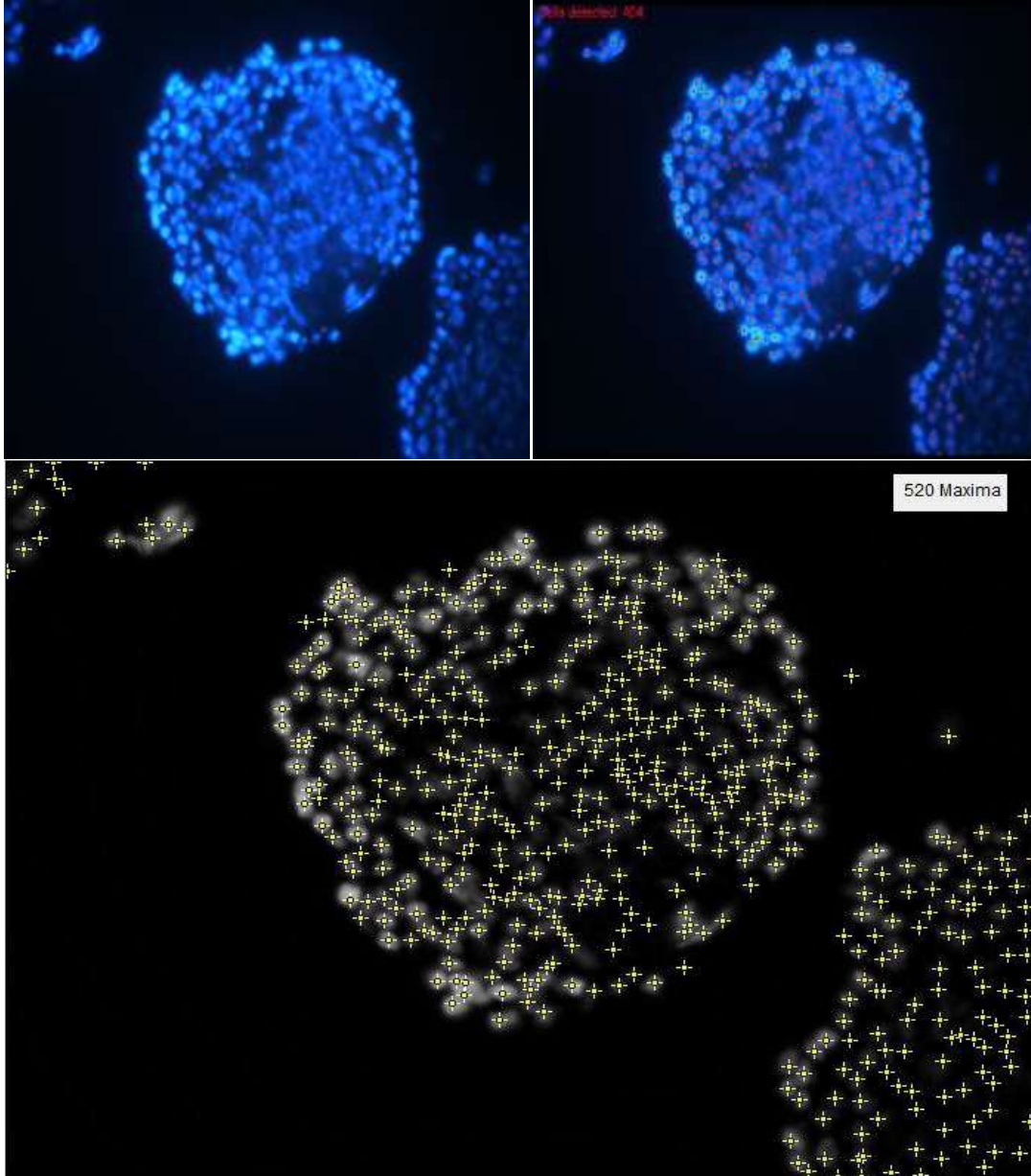
Bu görüntüde üst üste gelen görüntüler algoritma ile birbirinden ayrılarak sağlıklı bir sayım işlemi gerçekleştirilmiştir.





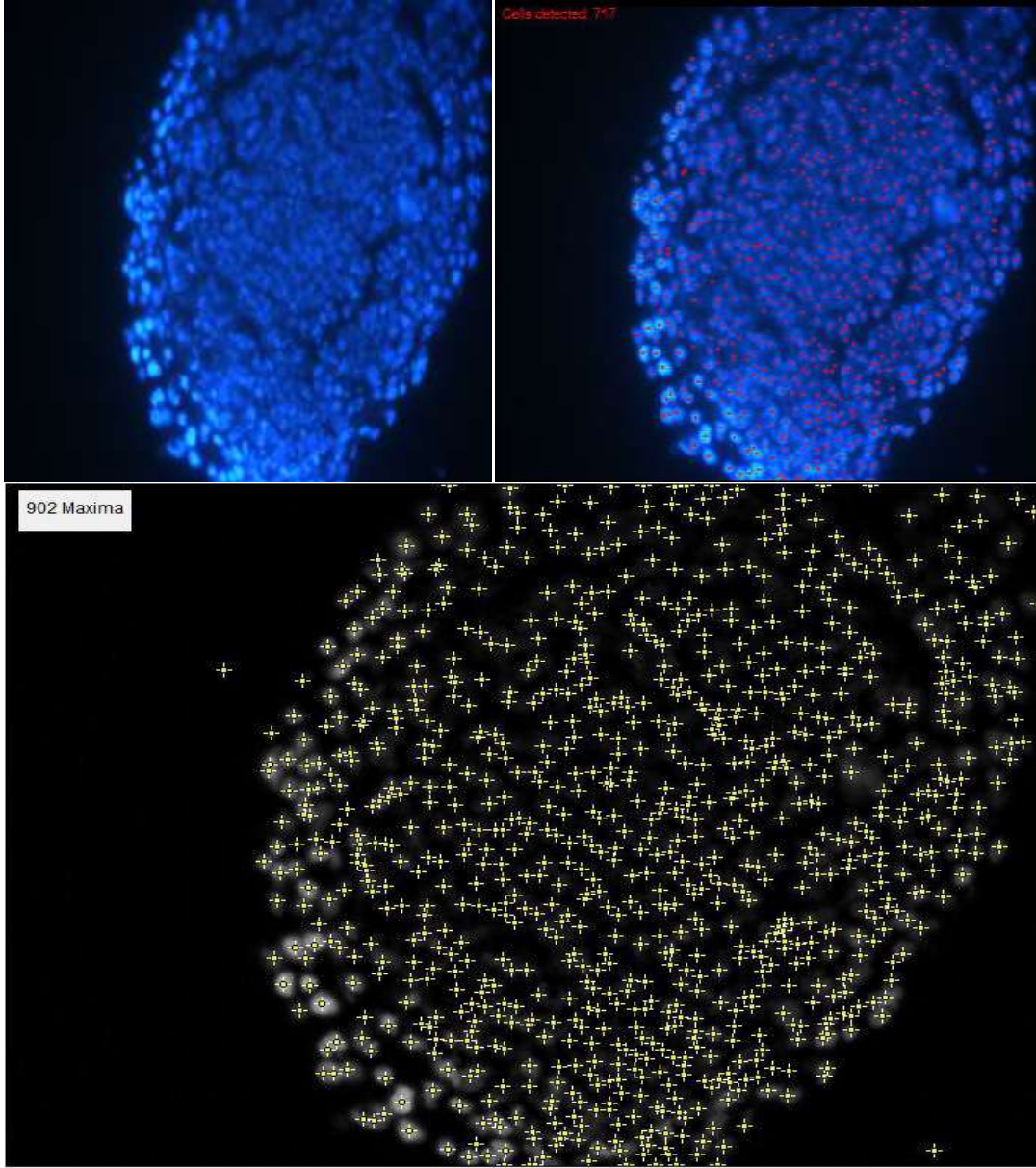
Şekil 3.8. Hücre sınırları üst üste gelen Flüoresans görüntü örneği

Üstü üste gelen ve sayılması manuel olarak mümkün olmayan bölünme aşamasındaki hücreler sayılabilmektedir.



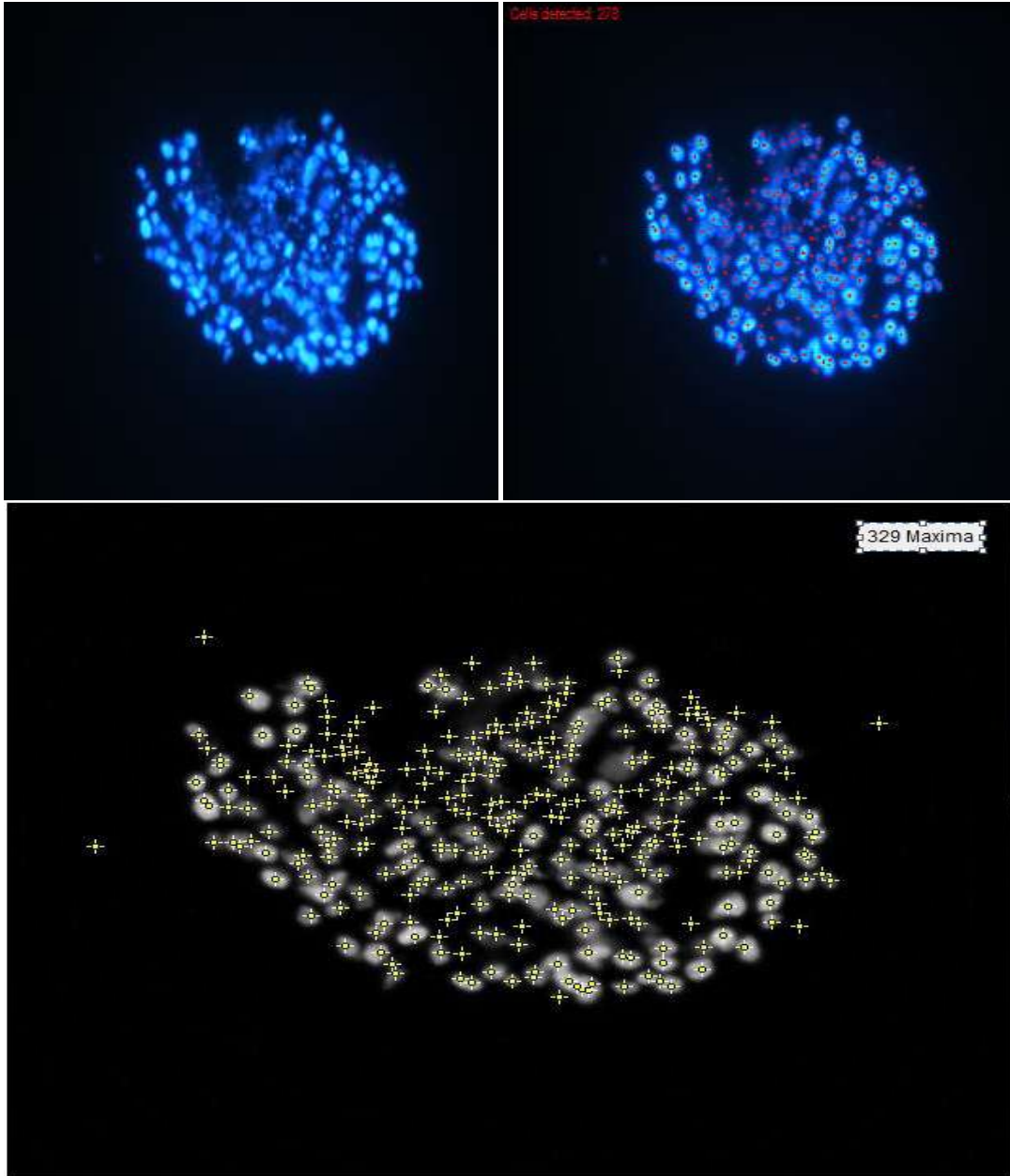
Şekil 3.9. Flüoresans görüntü örneği

Görüntüde parlaklığı çok azalmış olan sağ alt köşede bulunan hücrelerin sayımı otomatik hücre sayımı ile eksiksiz gerçekleşmiştir.



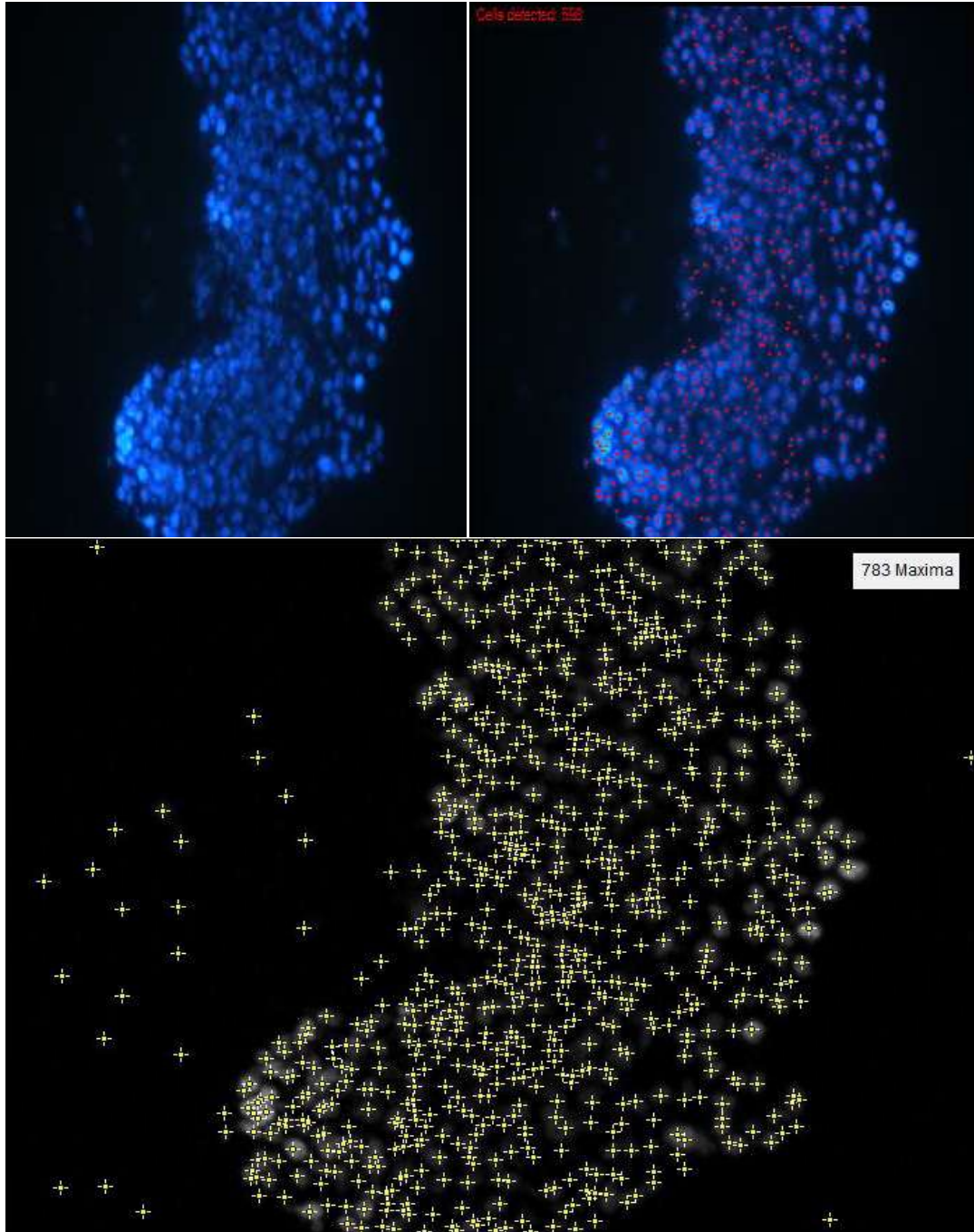
Şekil 3.10. Çok sayıda hücre içeren Flüoresans görüntü örneği

Hücre sayısı fazlalığından dolayı manuel sayıma göre %40 oranında daha iyi sayım gerçekleştirilmiştir.



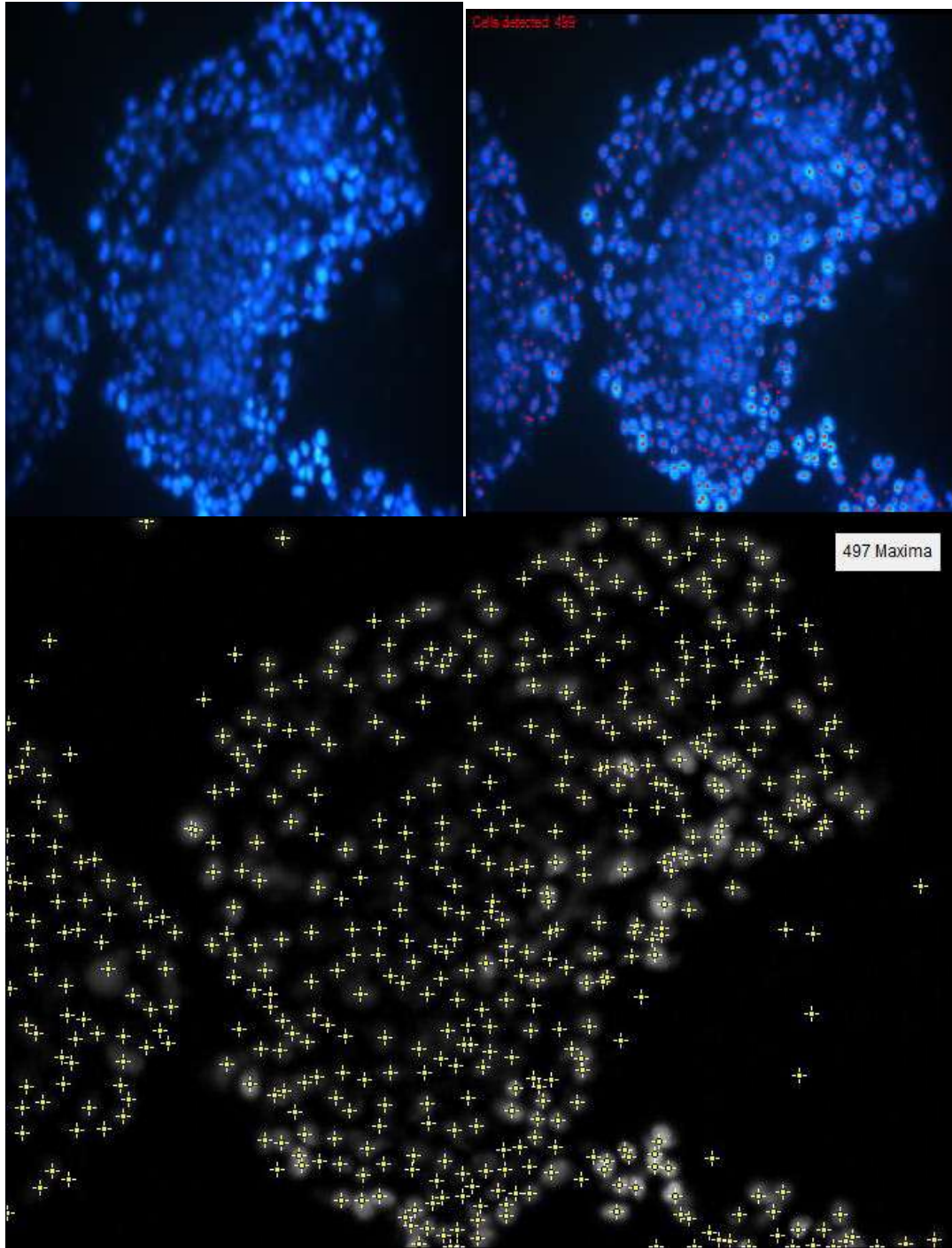
Şekil 3.11. Düşük gürültü içeren Flüoresans görüntü örneği

Fluoresans görüntülemenin hücreleri en iyi şekilde ortaya çıkarması durumuna örnektir. Düşük gürültü içermektedir.



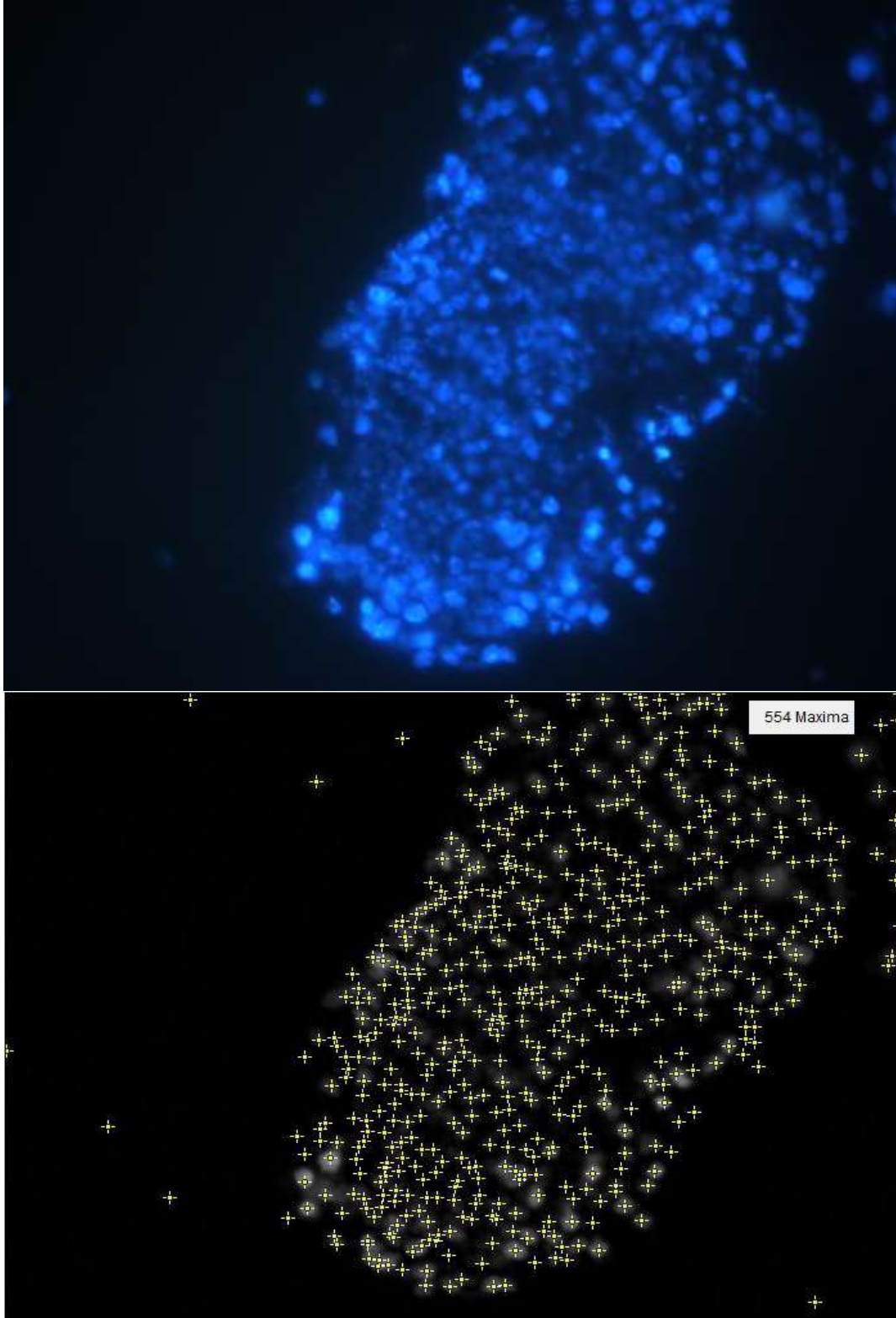
Şekil 3.12. Az parlaklık içeren Flüoresans hücre görüntüsü

Gözle görülmesi mümkün olmayan vitro ortamında dağılmış hücreler sayılabilmektedir.



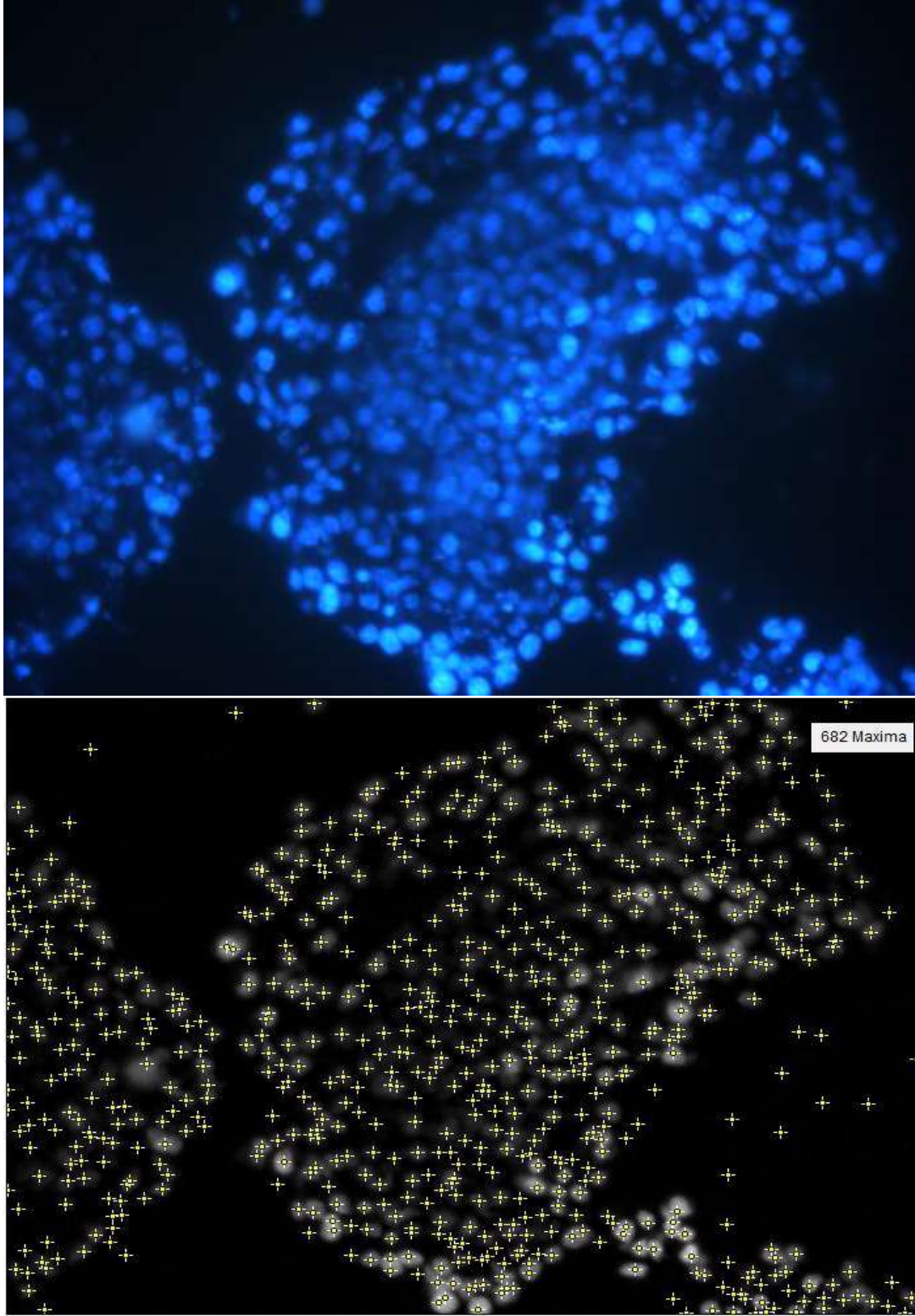
Şekil 3.13. Yüksek ve düşük parlaklık içeren Flüoresans görüntü örneği

Hücre çekirdek parlaklığı manuel sayma için yeterli olmayan hücreler algoritma yardımı ile sayılmıştır.



Şekil 3.14. Flüoresans görüntü örneği

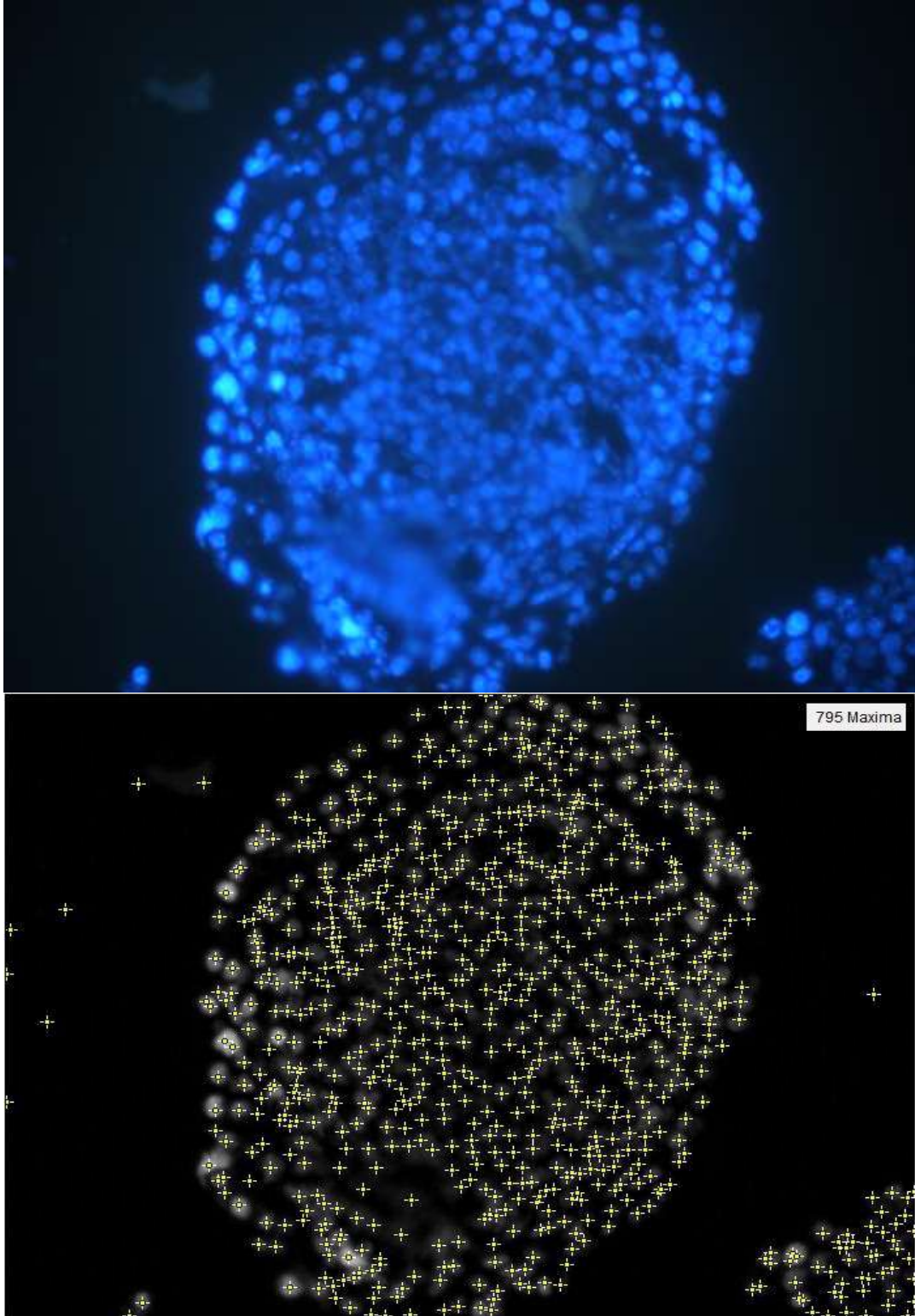
Sınırları birbiri üzerine denk gelen hücre toplanmaları arasındaki sınırlar kaldırılarak sayma işlemi gerçekleştirilmiş ve doğru sonuçlara ulaşılmıştır.



Şekil 3.15. Çok sayıda hücre içeren Flüoresans görüntü örneği

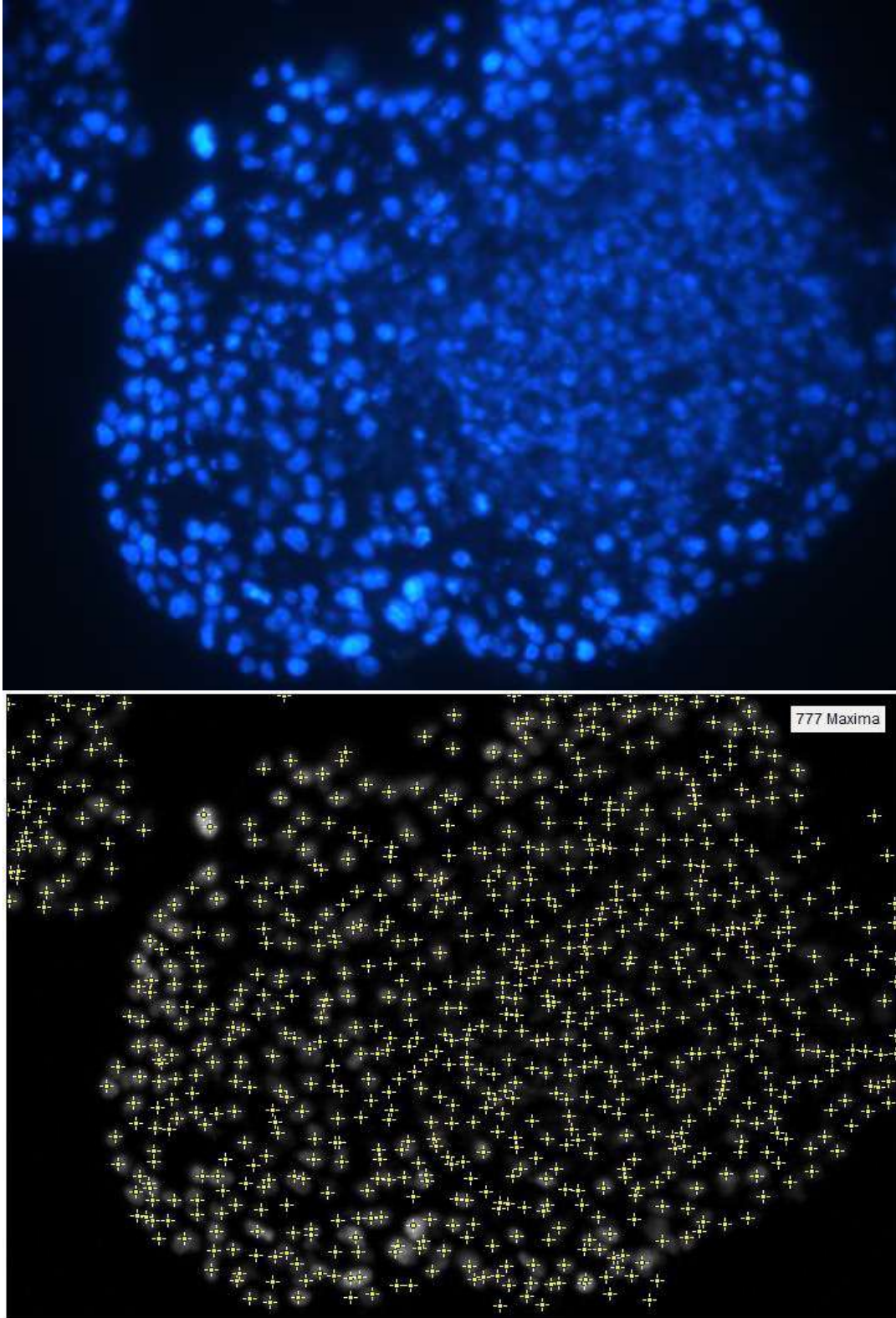
Çekirdek boyama işleminde yeterli parlaklığa ulaşamayan hücreler otomatik sayım ile sayılabilmiş ve üst üste gelen hücreler birbirinden ayrılabilmiştir.





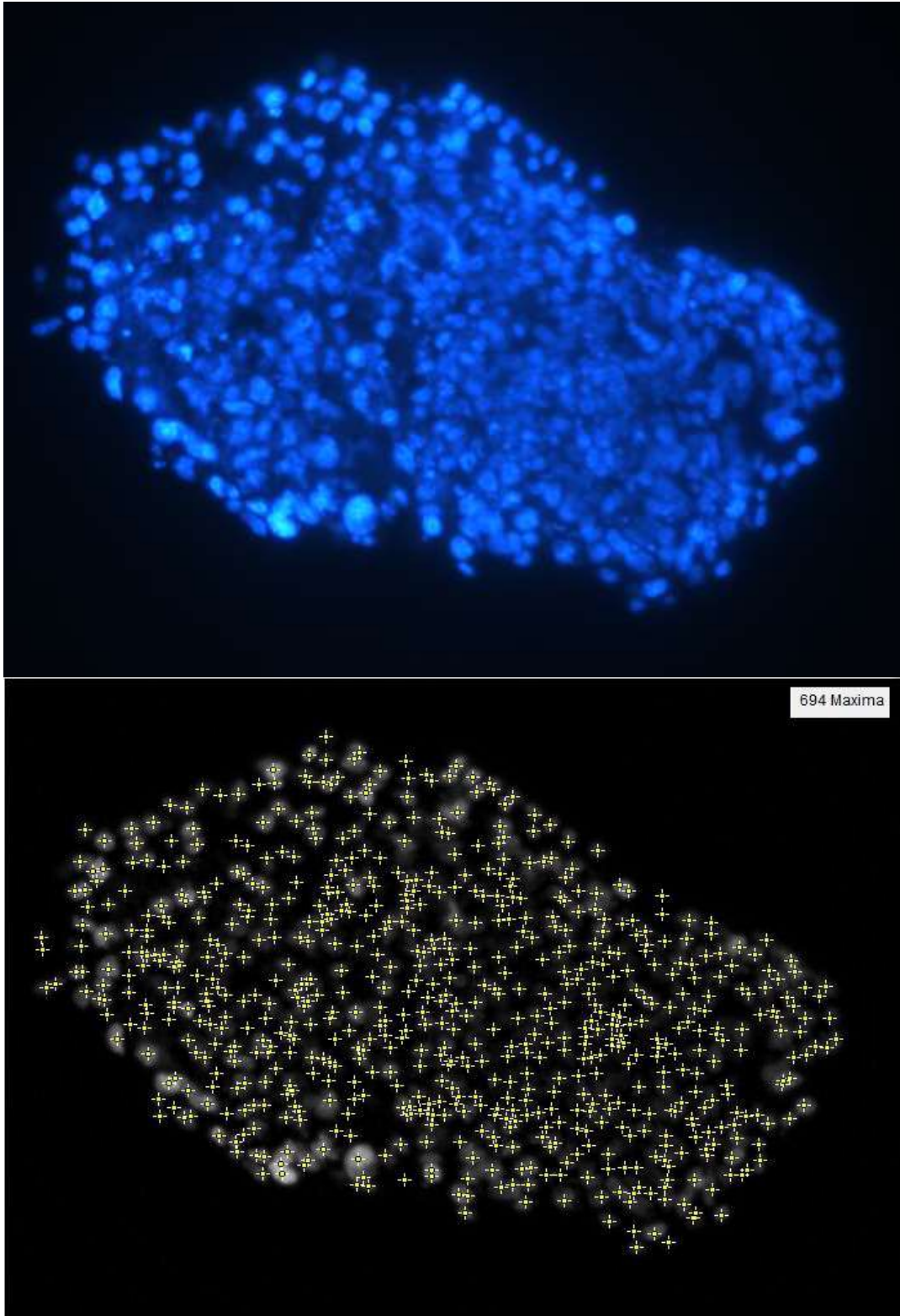
Şekil 3.16. Hücre yığını içeren Flüoresans görüntü örneği

Manuel sayımda sayılması mümkün olmayan hücre yığını içerisinde tam olarak verimli sağlanamasa dahi yüksek yüzde ile sayım yapılabilmektedir.



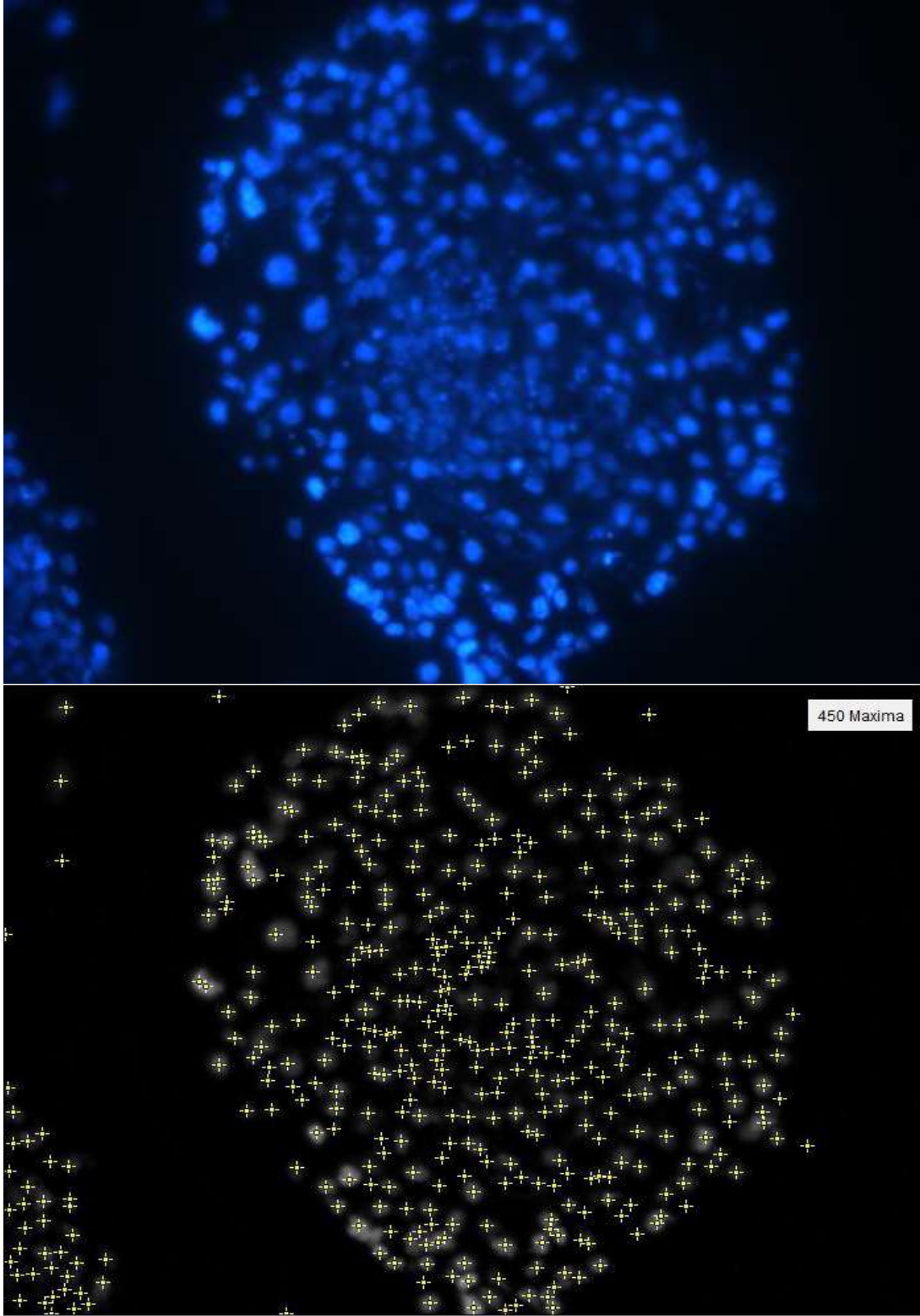
Şekil 3.17. Çok sayıda hücre içeren görüntü örneği

Normale göre küçük boyutta görülebilen hücreler ve birbiri üzerine denk gelen hücreler algoritma yardımı ile sayılabilmektedir.



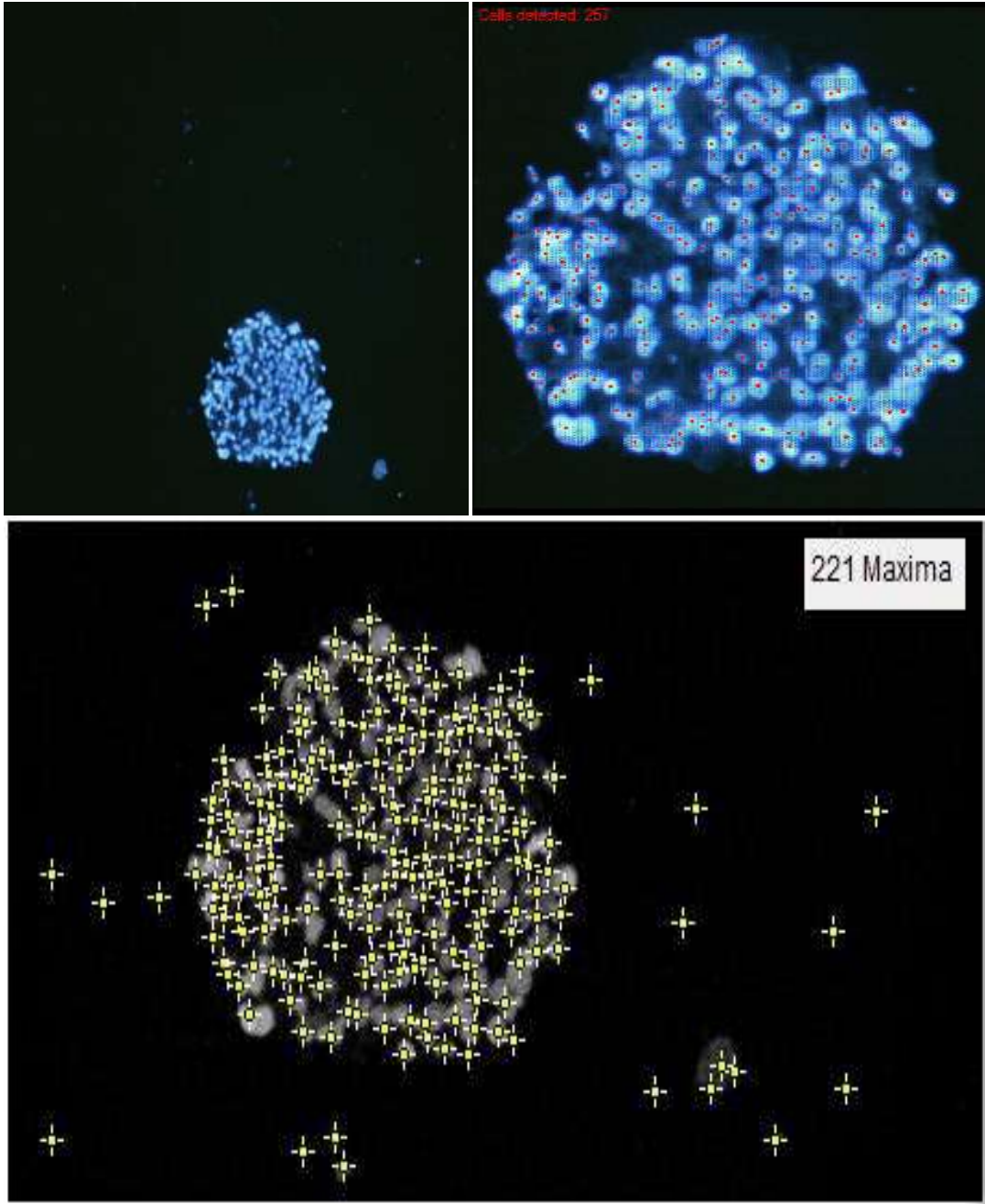
Şekil 3.18. Flüoresans görüntü örneği

Manuel olarak göz ile ayırt edilmesi mümkün olmayan hücreler ve hücre yığınları algoritma ile ayrılarak sayılabilmektedir.



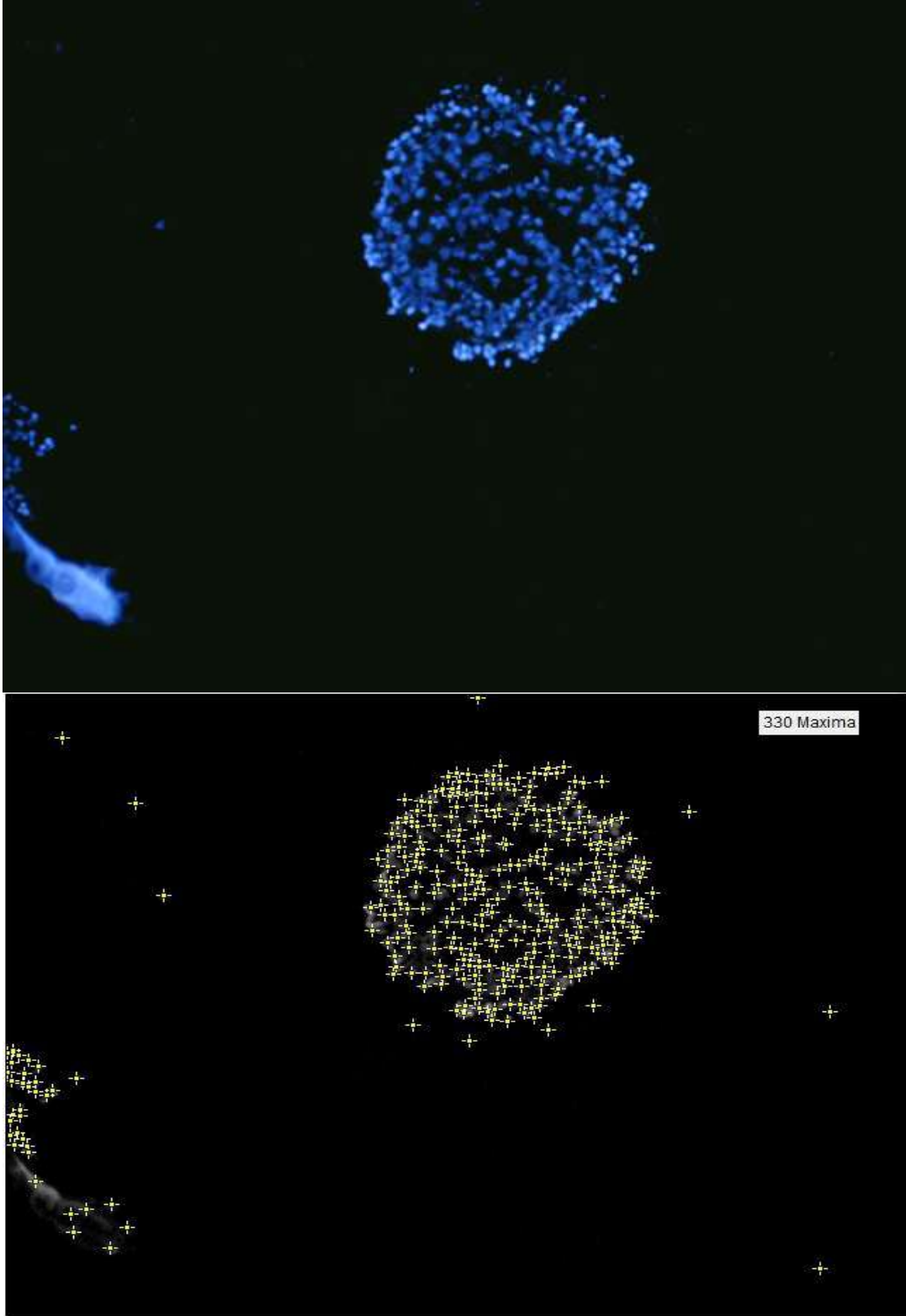
Şekil 3.19. Ayrılma aşaması içeren Flüoresans görüntü örneği

Ayrılma aşamasında olan bazı hücreler sayılamamıştır fakat uygun durumda olan hücreler yüksek doğruluk ile sayılabilmektedir.



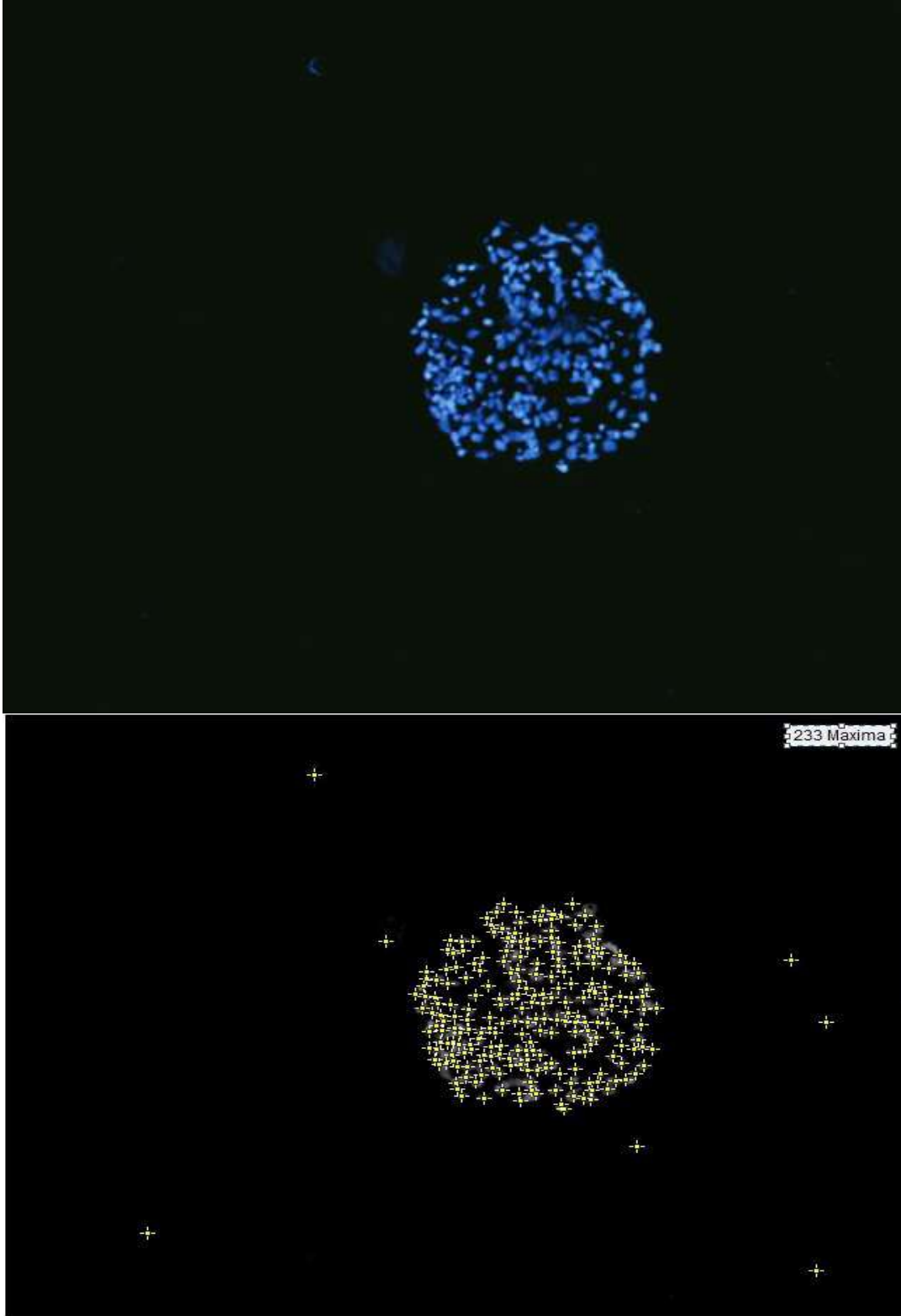
Şekil 3.20. Yüksek gürültü içeren Flüoresans görüntü örneği

Yüksek gürültü içeren bu görüntüde manuel olarak fark edilemeyen hücreler sayılabılmıştır.



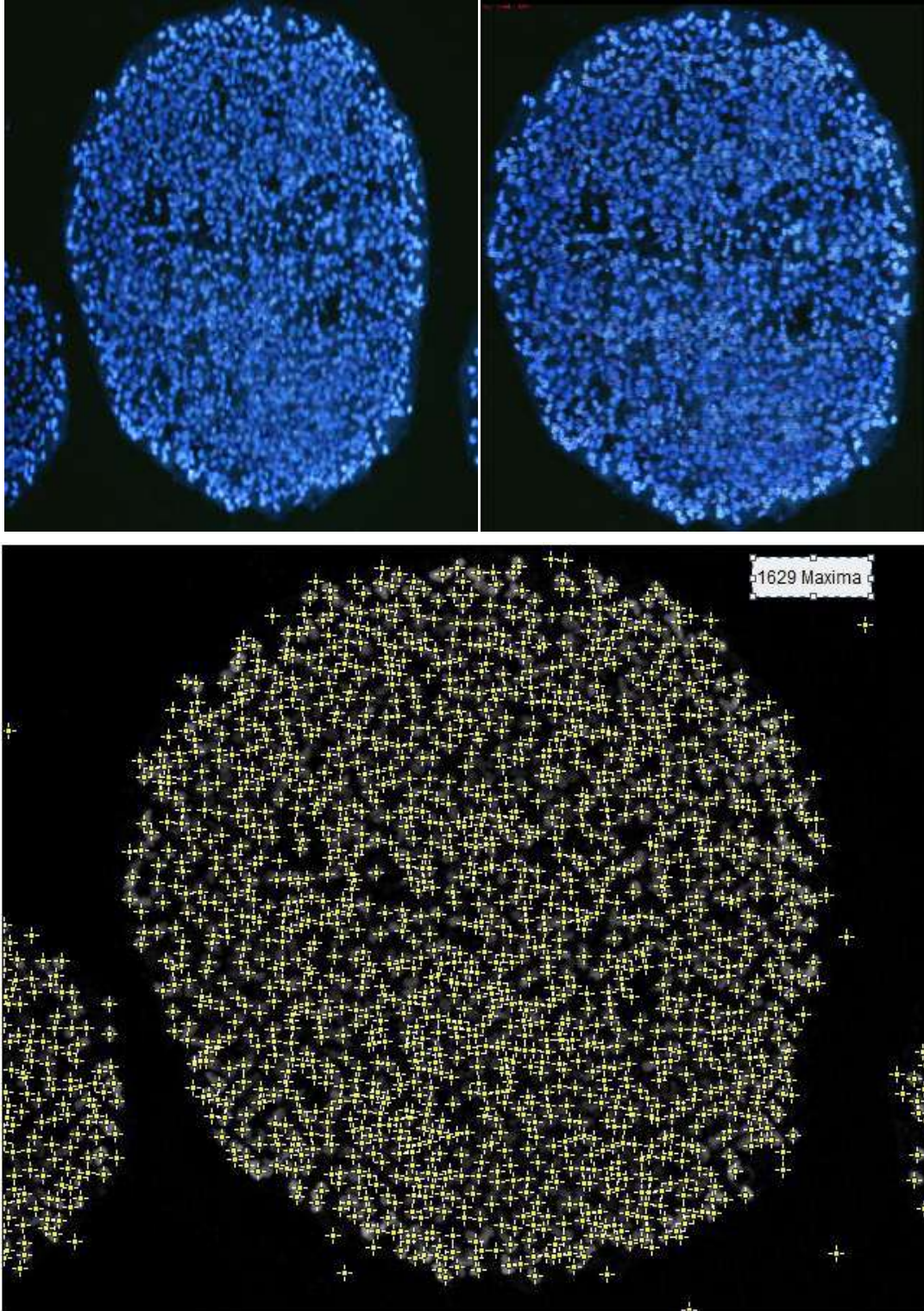
Şekil 3.21. Uzak mesafeden çekilmiş Flüoresans görüntü örneği

Yüksek gürültü içeren ve manuel olarak sayılması mümkün olmayan hücreler sayılabilmektedir.



Şekil 3.22. Yüksek gürültü içeren Flüoresans görüntü örneği

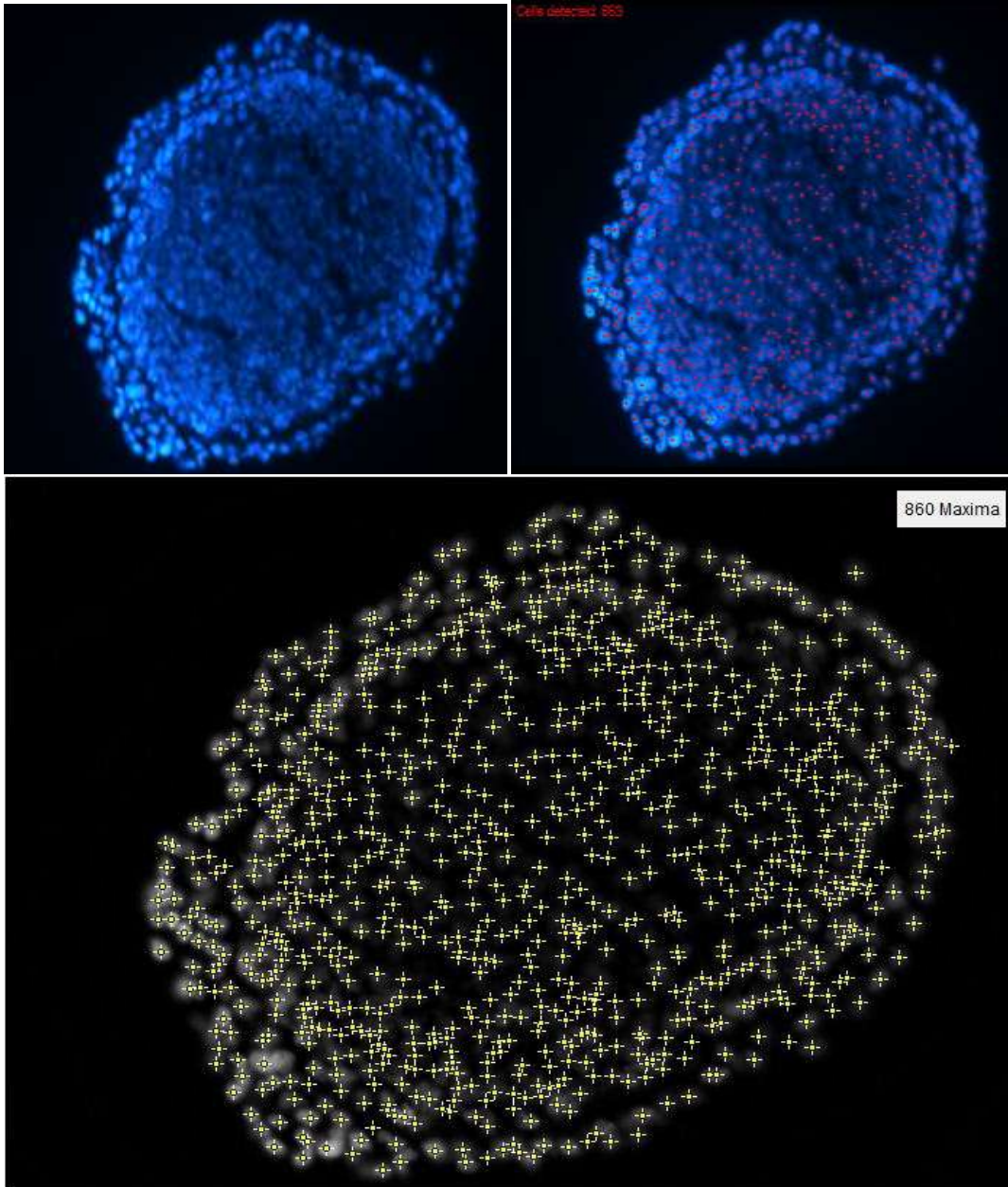
Manuel olarak sayılması çok zor olan bu görüntü algoritma yardımı ile manuele göre %25 daha yüksek doğruluk ile sayılabilmektedir.



Şekil 3.23. Göz ile sayılması mümkün olmayan Flüoresans görüntü örneği

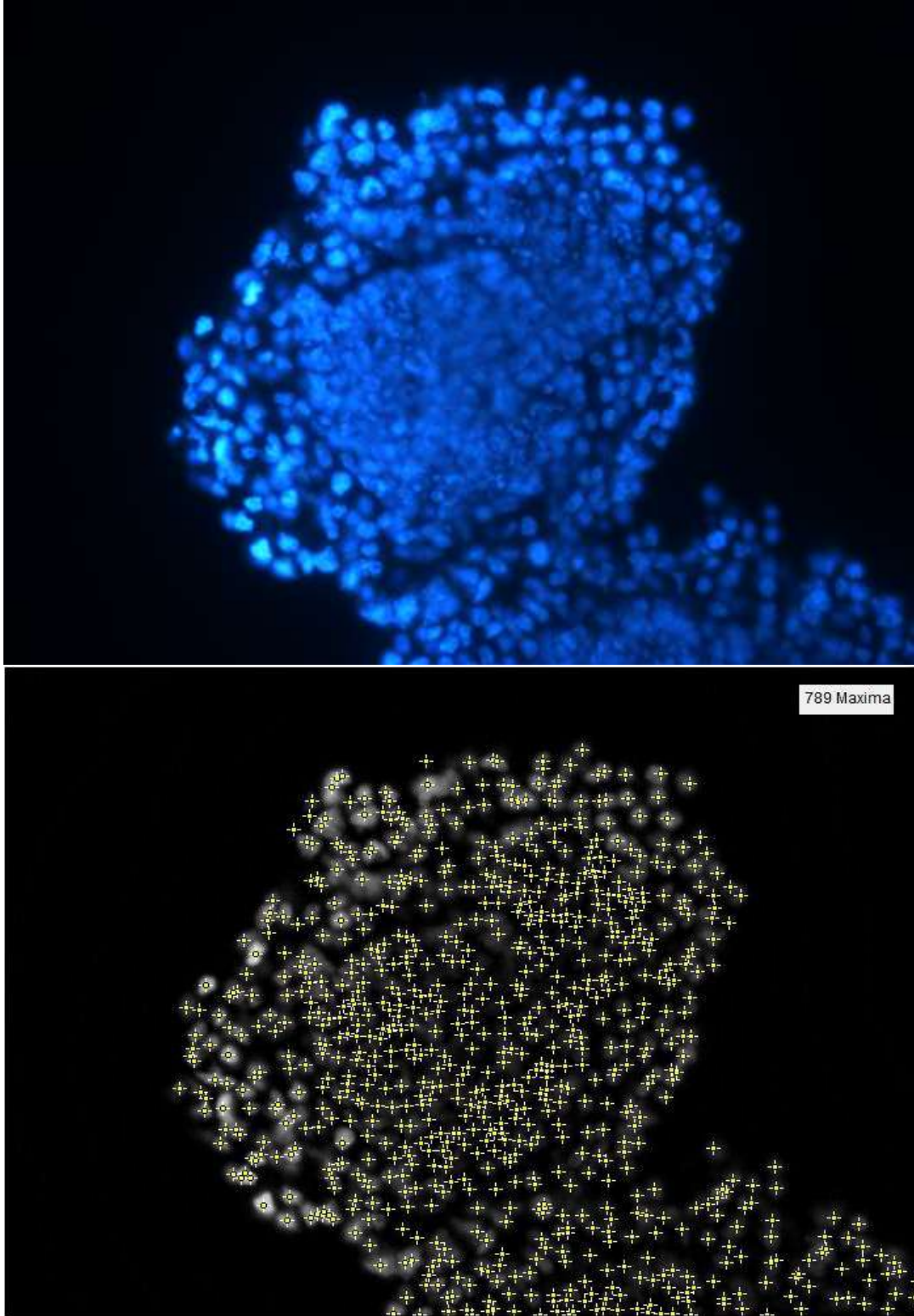
Hücre sayısı çokluğundan dolayı manuel olarak çok fazla zaman gerektiren hücre görüntüsü kısa sürede sayılabildiği. Mikroskop altında görülemeyen kısımlar dahi sayılabildiği.





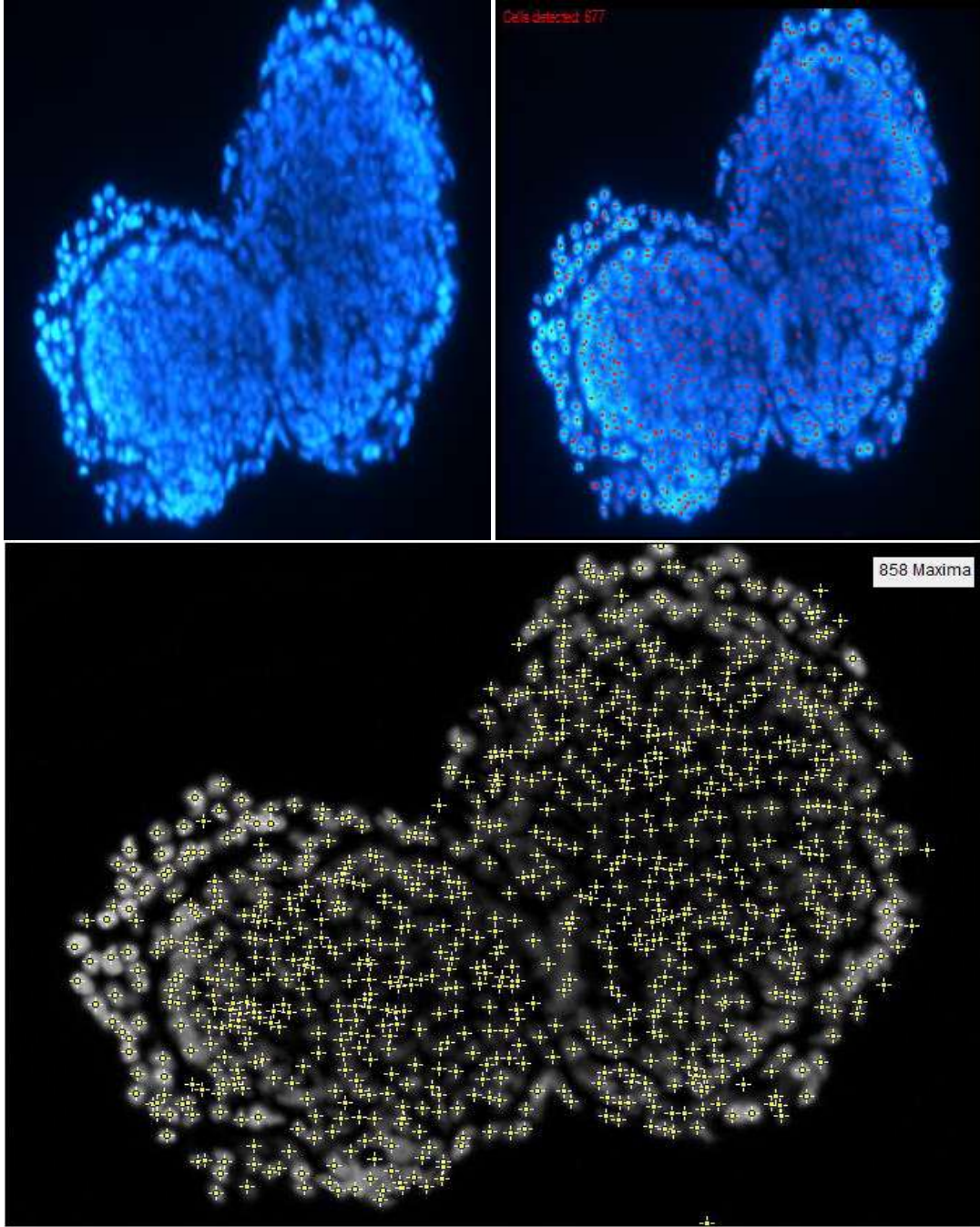
Şekil 3.24. Hücre çekirdek parlaklığı az olan Flüoresans görüntü örneği

Nüklei parlaklığı manuel sayım için yeterli seviyede olmayan görüntü otomatik olarak hızlı bir şekilde sayılabilmektedir.



Şekil 3.25. Hücre yığını içeren Flüoresans görüntü örneği

Hücre yığını yüzünden sayılması mümkün olmayan kısımlar algoritma ile birbirinden ayrılarak sayılmıştır.



Şekil 3.26. Flüoresans görüntü örneği

Fluoresans görüntünün parlaklığının fazlalığı yüzünden insan gözü için sayım işlemi zorlaşmış fakat otomatik hücre sayımı ile hızlı bir şekilde sayılabilmektedir. Sayılan hücreler genel olarak düşük görüntü içeriyor ise %20-40 arasında doğruluk artırılmıştır. Yüksek gürültülü görüntülerde ise %5-10 arasında doğruluk artırılmıştır.

Benzetim sonuçlarından çıkarılan bilgilerin yorumlanabilmesi için bazı ek bilgilere gerek duyulmaktadır. Bunlar bir sonraki paragraftan başlanarak açıklanmıştır.

Kök hücrelerin durumlarının incelenmesi ve kullanabilmesi için bazı yöntemler ve durumlar vardır. Bu durumların yakından takip edilmesi gerekmektedir. Bu durumlar şu şekilde açıklanabilir: Normalde kanda çok az sayıda kök hücre bulunur. Ancak nakil için hücre toplanmadan önce vericilere büyüme faktörleri denen ve hormona benzeyen maddeler verilerek kök hücrelerinin daha hızlı büyümesi ve kemik iliğinden kana geçmesi sağlanır.

Vücudumuzda çok sayıda bulunan farklılaşmış hücreler ciddi hasar görmüş ya da hastalanmış ise doğal yollarla yenilenemezler. Kök hücreler bu hastalanmış ya da hasar görmüş hücrelerin yerine sağlıklı ve işlevsel hücreler oluşturmak için kullanılırlar. "Hücre tedavisi" olarak adlandırılan hastalıklı hücrenin sağlıklı hücre ile yer değiştirmesi işlemi organ nakline benzer, tek fark bir organ yerine hücrenin nakledilmesidir.

Hematopoetik (kan sistemi) kök hücreler, kemik iliğinde bulunan ve tüm kan hücrelerinin öncüsü olan, günümüzde tedavide en çok kullanılan kök hücre tipidir. Doktorlar 40 yıldan daha uzun bir zamandan beri tedavi amaçlı hematopoetik kök hücre nakletmişlerdir. Hematopoetik kök hücre toplama ya da saklama için kullanılan ilerlemiş teknoloji şimdi lösemi, lenfoma ve çok sayıda kan hastalığının tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır.

Periferik kan kök hücre nakli için, kök hücreler kandan alınır. Çok ince bir esnek plastik boru (kateter denir) vericinin toplardamarlarından birine yerleştirilerek diğer ucuyla özel bir makineye bağlanır. Vericinin kanı bu makinede dolaştırılarak kök hücreler ayrıştırılır ve sadece bu hücreler alıkonur. Kanın kalan kısmı vericiye geri döner. Bu işlem saatler sürer ve yeteri kadar kök hücre elde edebilmek için birkaç gün tekrarlanması gerekebilir. Kök hücreler filtre edilerek torbalara konur ve hasta hazır olana dek dondurulur.

Hasta kemoterapi ve/veya radyasyon tedavisi gördükten sonra, kök hücreler kan naklinde olduğu gibi damardan yavaşça (infüzyonla) verilir. Kök hücreler kemik iliğine doğru giderek oraya yerleşir ve daha sonra büyüyerek yeni, normal kan hücreleri yapmaya başlarlar. Yeni hücreler, kemik iliği hücrelerinin kullanıldığı nakle göre hastanın kanında genellikle birkaç gün daha geç görülmeye başlarlar, bu da 10-20 gün içinde gerçekleşir.

Kordon kanı, kök hücreler açısından oldukça zengindir ve halen pek çok ciddi hastalıkta değerli bir tedavi seçeneğidir. Bu nedenle saklanması yalnızca sizin için değil, toplum sağlığı için de önemli yararlar sağlayabilecektir.

Kordon kanı, bebeğin doğumundan sonra plasenta tarafında kalan kandır. Kordon kanı, bebek doğar doğmaz, kordon kesildikten sonra ilk 10 dakika içinden kordondan alınır. Bu kan, toplanmadığı zaman plasenta ile birlikte atılmaktadır. Kordon ve kordon kanının alınması normal doğum prosedürü ya da bebeği herhangi bir şekilde etkilememektedir. Kordon ve kordon kanı toplama işlemi, doğumu yaptıran hekim tarafından gerçekleştirilir. Hem normal yolla hem de sezaryen doğumlarda kordon kanının toplanması mümkündür.

Alınan kordon ve kordon kanı 26 saat içerisinde laboratuvara gönderilir ve özel yöntemlerle işlenir, uygun şartlarda dondurulur ve Kordon Kanı Bankası'nda buharlı azot tankı içerisinde saklanır. Dondurulmuş olan bu değerli kök hücreler, gerektiğinde çözülerek tedavide kullanılabilir. Bu çözüm işleminden sonra kök hücrelerin sayısının belirlenmesi hem hızlı olmalı hem de yüksek doğruluk içermelidir.

Birçok hastalık için kullanılan tedavi yöntemlerinde hücre sayımı temel yapıtaşlarından birini oluşturmaktadır. Temel olarak alınan hücre çalışmaları ile tedavilerde doz analizi ve tedavi süresi hayati önem taşımaktadır. Ayrıca kanser kök hücrelerinin takibi içinde çok önemli hale gelmiştir. Açıklanan bu durumlardan dolayı, kök hücrelerin durumunun kontrol edilebilmesi hayati önem taşımaktadır.

## **BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Bu çalışmada mikroskop görüntüsü altında otomatik bir hücre sayım yöntemi sunulmuştur. İlerleyen bölümlerde de ayrıntılı bir şekilde açıklandığı gibi hücre sayımı, uzman bir kişi tarafından mikroskop merceğine sürekli bakılarak veya otomatik hücre sayımı yöntemleri kullanılarak yapılabilmektedir.. Sayım uzman bir kişi tarafından yapıldığında oldukça yorucu uzun süren ve düşük doğruluklu bir işlem haline gelmektedir. Ayrıca farklı uzmanlar tarafından aynı hücre görüntüsünden farklı sayım sonuçları elde edilebilmektedir. Doğru sayım sonuçları elde etmek için mikroskop odağı da oldukça önemlidir. Mikroskop parametreleri doğru bir şekilde ayarlanmadıysa hücre sayımında önem taşıyan hücre kenarları bulanıklaşıp gölgelenebilir ve hücre sayımı oldukça zorlaşır. Bir görüntüde çok sayıda hücre olmasından kaynaklanan örtüşme problemi de sayımı zorlaştıran bir diğer problemdir. Hücrelerin gözle seçilebilir hale gelmesi için kullanılan bazı boyama teknikleri vardır. Boyama sonucu hücre merkezi açık, kenarları ise koyu renk olmaktadır. Ancak konsantrasyon fazla olduğunda iki veya daha fazla parlak kısım örtüşebilir ve bunun sonucu sayım zorlaşır ve doğruluğunu kaybeder. Yukarıda bahsedilen tüm problemler hücre sayımının otomatik bir şekilde yapılmasını ve sunulan sayım yöntemlerinin iyileştirilmesini gerektirir.

Bu tezde, flüoresans mikroskop görüntüsü altında aşama aşama otomatik hücre sayımının nasıl yapıldığı açıklanmaktadır. Hücre görüntüsünde gürültü gibi istenmeyen bileşenleri kaldırmak için bir ön işleme adımı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sırasıyla histogram bölütleme, histogram analizi ve maksimum nokta analizi gibi görüntü işleme teknikleri uygulanarak otomatik hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sunulan yöntemin etkinliğinin test edilmesi için simülasyon programları vasıtasıyla birçok sayım yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, sunulan yöntemin başarıya ulaştığını ve gelecek vadeden bir çalışma olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında mikroskop görüntüsünde otomatik hücre sayımı kavramının temelleri üzerinde durulmuş ve uygulaması yapılmıştır. Bütün dünyada da önemi her zaman var olan hücre çalışmalarının teknoloji ile birleştirilmesi kaçınılmaz hale gelmiştir. Doktorları ve uzmanları zorlayan bu çalışmalar bilgisayar tabanlı sistemler ile daha kolay hale getirilmektedir. Otomatik hücre sayımı henüz gelişmekte olmasına rağmen, talep edilen bir uygulama haline gelmiştir. Brezilyada'ki bir merkez üzerinden alınan görüntüler üzerinde algoritma uygulanarak hücre sayımı yapılmıştır. Bu sayede ulaşılması zor olan sonuçlara bilgisayar tabanlı algoritma ile hızlı bir şekilde yüksek doğruluk ile ulaşılmıştır. İleride yapılacak çalışmalara bir yapıtaşı olacaktır. Yapılacak çalışmalarda olasılıksal sistemler eklenerek hibrid modeller ile bu alanda hem akademik hem de uygulama olarak öncü olacak çalışmalar yapılacaktır. Ayrıca günümüzde oldukça büyük bir sorun haline gelen kanser hastalığının teşhis ve tedavisine de yardımcı olabilecek şekilde kanser kök hücreleri incelenerek kanser hücrelerinin yayılımı, tedavinin başarısı, kanser dokusunun boyutu ve kanser tipi hakkında doktor ve uzmanlara hızlı ve doğru bilgi sağlanması amaçlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Seçil Erden, Stem cells and clinical applications, Journal of New Results in Engineering and Natural Science, No: 3, pp.1-8, 2014.
- [2] Akar AR, Arat M, Beksaç M, Can A, Çamurdanoğlu BZ, Çetinkaya DU, Elçin YM, Kansu E, Kırık D, Özçelik T, Özden İ, Şahin G Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, 20, Ankara, 113s, 2009.
- [3] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal Stem Cells: Clinical applications and biological characterization. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36: 568-584, 2004.
- [4] Deliloğlu Gürhan Sİ, Özen MÖ, Sözer P, Lüleci İ. Kök hücreler ve doku mühendisliği, Sağlıkta Birikim, 1[5]: 143-168, 2009.
- [5] Ghiaur G, Gerber J, Jones RJ Concise review: Cancer stem cells and minimal residual disease. Stem Cells, 30: 89 – 93, 2012.
- [6] J.R. Weaner, J.L.S. Au, Comparative scoring by visual and image analysis of cells in human solid tumors labeled for proliferation makers, Cytometry 27 189-199, 1997.
- [7] J.R. Weaner, J.L.S. Au, Application of automatic thresholding in image analysis scoring of cells in human solid tumours labeled for proliferation markers, Cytometry 29 128-135, (1997).
- [8] Geisa Martins Faustino et. al., Automatic embryonic stem cells detection and counting in fluorescence microscopy images, Monografias em Ciência da Computação, No. 04/09 ISSN: 0103-9741, 2009.
- [9] C.G. Loukas, G.D. Wilson, B. Vojnovic, A. Linney, Automated segmentation of cancer cell nuclei in complex tissue sections, SPIE 4158 188—198, 2000.
- [10] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weismann IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. Nature, 414: 105 – 111, 2001.
- [11] M. Colley, F. Kommoss, M. Bibbo, H.E. Dytch, W.A. Frnklin, J.A. Holt, G.L. Wied, Assessment of hormone receptors in breast carcinoma by immunocytochemistry and image analysis, Anal. Quant. Cytol. Histol. 11 307-314, 1989.



- [12] J.M.D. Lamaziere, J. Lavallee, C. Zunino, J. Larrue, Semiquantitative study of the distribution of 2 cellular antigens by computer-directed color analysis, *Lab. Invest.* 68 248—252, 1993.
- [13] E.J. Goldlust, R.P. Paczynski, Y.Y. He, C.Y. Hsu, M.P. Goldberg, Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains, *Stroke* 27 1657-1662, 1996.
- [14] S. Tseleni, N. Kavantzias, D. Yova, E. Alexandrou, V.Karydakias, J. Gogas, P. Davaris, Findings of computerised nuclear morphometry of papillary thyroid carcinoma in correlation with known prognostic factors, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 16 401—407, 1997.
- [15] J. Uitto, J.L. Paul, K. Brockley, R.H. Pearce, J.G. Clark, Elastic fibers in human skin: quantitation of elastic fibers by computerized digital analysis and determination of elastin by radioimmunoassay of desmosine, *Lab. Invest.* 49 499—505, 1983.
- [16] K. Beier, H.D. Fahimi, Application of automated image analysis for quantitative morphological studies of peroxisomes in rat liver in conjunction with cytochemical staining with 3,3'-diaminobenzidine and immunocytochemistry, *Microsc. Res. Tech.* 21 271—282, 1992.
- [17] W.A. Franklin, M. Biddo, M.I. Doria, H.E. Dytch, J. Toth, E. DeSombre, G.L. Wied, Quantitation of estrogen receptor content in breast carcinoma by the MicroTICAS image analysis system, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 9 279—286, 1987.
- [18] H.A. Lehr, K.D. Hansen, M.D. Coltera, J.C. Russ, A.M. Gown, Photoshop-based image analysis for the semiautomated assessment of Ki-67-defined proliferative activity in the routine diagnosis of breast, *Appl. Immunohistochem.* 4 117—127, 1996.
- [19] I.M. Francis, M.O. Adeyanju, S.S. George, T.A. Junaid, U.K. Luthra, Manual versus image analysis estimation of PCNA in breast carcinoma, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 22 11—16, 2000.
- [20] Aasen T, Belmonte, JCI. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 5[2]: 3171-382, 2010.
- [21] J.M. Geusebroek et al., Segmentation of cell clusters by nearest neighbor graphs, *Proceedings of the third annual conference of the Advanced School for Computing and Imaging*, pp. 248—252, 1997.
- [22] V. Meas-Yedid et al. Quantitative microscopic image analysis by active contours, in *Vision Interface Annual Conference 2001 – Medical Applications*, 2001.

- [23] J. Kittler and J. Illingworth, "Minimum error thresholding," *Pattern Recognition*, vol. 19, no. 1, pp. 41–47, 1986.
- [24] N. Otsu, A threshold selection method from gray-level histograms, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. 9, no. 1, pp. 62–66, 1979.
- [25] K. Wu, D. Gauthier, and M. Levine, Live cell image segmentation, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 42, no. 1, pp. 1–12, 1995.
- [26] T. Markiewicz et al. Myelogenous leukemia cell image preprocessing for feature generation, in *5th International Workshop on Computational Methods in Electrical Engineering*, pp. 70–73, 2003.
- [27] E. Sharipo, V. Hartanto, H. Lepor, Quantifying the smoothmuscle content of the prostate using double-immunoenzymatic staining and color assisted image analysis, *J. Urol.* 147 1167-1170, 1990.
- [28] H.A. Lehr, D.A. Mankoff, D. Corwin, G. Santeusanio, A.M. Gown, Application of photoshop-based analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer, *J. Histochem. Cytochem.* 45 1559-1565, 1997.
- [29] H.A. Lehr, C.M. Van der Loos, P. Teeling, A.M. Gown, Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using photoshop-based image analysis, *J. Histochem Cytochem.* 47 199-225, 1999.
- [30] M.H. Deverell, J.R.SalisburyW.F. Whimster, Comparisons of stains for image segmentation and measurement of nuclear parameters by computerised image analysis using IBAS 2000, *Pathol. Res. Pract.* 185 555-557, 1989.
- [31] P.D. Kohlberger, A. Obermair, G. Sliutz, H. Heinzl, H.Koelbl, G. Breitenacker, G. Gitsch, G. Kainz, Quantitative immunohistochemistry of factor VIII-related antigen in breast carcinoma, *Am. J. Clin. Pathol.* 105 705-710, 1996.
- [32] R.C.A. Gonzalez, R.E. Woods, *Digital Image Processing*, Addison-Wesley Reading, MA, USA, 1992.
- [33] C. Garbay, G. Brugal, C. Choquet, Application of colored image analysis to bone marrow cell recognition, *Anal. Quant. Cytol.* 4 272-280, 1986.
- [34] J.A.W. van der Laak, M.M.M. Pahlplatz, A.G.J.M. Hanselaar, P.C.M. de Wilde, Hue-saturation-density (HSD) model for stain recognition in digital images from transmitted light microscopy, *Cytometry* 39 275-284, 2000.

- [35] C. MacAulay, H. Tezcan, B. Palcic, Adaptive color basis transformation. An aid in image segmentation, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 11 53-58, 1989.
- [36] M. Goto, Y. Nagatomo, K. Hasui, H. Amanaka, S. Murashima, E. Sato, Chromaticity analysis of immunostained tumor specimens, *Pathol. Res. Pract.* 188 433-437, 1992.
- [37] A.C. Ruifrok, Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 19 107—113, 1997.
- [38] J. Smolle, Optimization of linear image combination for segmentation in red green and blue images, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 18 323-329, 1996.
- [39] R. Zhou, D.L. Parker, E.H. Hammond, Quantitative Peroxidase-antiperoxidase complex-substrate mass determination in tissue sections by a dual wavelength method, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 14 73-80, 1992.
- [40] R. Zhou, E.H. Hammond, D.L. Parker, A multiple wavelength algorithm in color image analysis and its applications in stain decomposition in microscopy images, *Med. Phys.* 23 1977-1986, 1996.
- [41] S.H. Ong, S.T. Giam, R. Sinniah, Adaptive window-based tracking for the detection of membrane structures in kidney electron micrographs, *Mach. Vision Appl.* 6 215-223, 1993.
- [42] T.K. ten Kate, J.A.M. Belien, A.W.M. Smeulders, J.P.A. Baak, Method for counting mitoses by image processing in Feulgen stained breast cancer sections, *Cytometry* 14 241-250, 1993.
- [43] P.S. Umesh Adiga, B.B. Chaudhri, Region based techniques for segmentation of volumetric histo-pathological images, *Comput. Methods Programs Biomed.* 61 23-47, 2000.
- [44] A.K.W. Law, K.Y. Lam, F.K. Lam, T.K.W. Wong, J.L.S.Poon, F.H.Y. Chan, Image analysis system for assessment of immunohistochemically stained proliferative marker (MIB-1) in oesophageal squamous cell carcinoma, *Comput. Methods Programs Biomed.* 70 37—45, 2003.
- [45] L. O’Gorman, A.C. Sanderson, The wedge filter technique for convex boundary estimation, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 7 326-332, 1985.
- [46] L. O’Gorman, A.C. Sanderson, K. Preston, A system for automated liver tissue image analysis: methods and results, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 32 696-706, 1985.

- [47] J.K. Jain, S.P. Smith, E. Backer, Segmentation of muscle cell pictures: a preliminary study, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 2 232-242, 1980.
- [48] G. Zinser, D. Komitowski, Segmentation of cell nuclei in tissue section analysis, *J. Histochem. Cytochem.* 31 94—100, 1983.
- [49] P.S.U. Adiga, B.B. Chaudhuri K. Rodenacker, Semi-automatic segmentation of tissue cells from confocal microscope images, *Proceedings of 13th International Conference on Pattern Recognition, Vienna, Austria, , pp. 494—497, 1996.*
- [50] T. Mouroutis, A.J. Roberts, A.A. Bharath, Robust cell nuclei segmentation using statistical modelling, *Bioimaging* 6 79—91, 1998.
- [51] M. Kass, A. Witkin D. Terzopoulos, Snakes: active contour models, *Proceedings of 1st International Conference on Computer Vision, London, UK, pp. 259-268 , 1987.*
- [52] Y.-L. Fok, J.C.K. Chan, R.T. Chin, Automated analysis of nerve-cell images using active contour models, *IEEE Trans. Med. Imaging* 15 353-368, 1996.
- [53] P. Zhou, D. Pycock, Robust statistical models for cell image interpretation, *Image Vision Comput.* 15 307—316, 1997.
- [54] J.R. Parker, *Algorithms for Image Processing and Computer Vision*, Wiley, New York, 1997.
- [55] P.W. Hamilton, P.H. Bartels, D. Thompson, N.H. Anderson, R. Montironi, J.M. Sloan, Automated location of dysplastic fields in colorectal histology using image texture analysis, *J. Pathol.* 182 68—75, 1997.
- [56] A.N. Esgiar, R.N.G. Naguib, B.S. Sharif, M.K. Bennett, A. Murray, Microscopic image analysis for quantitative measurement and feature identification of normal and cancerous colonic mucosa, *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed.* 2 197—203, 1998.
- [57] F. Gilles, A. Gentile, V. Le Doussal, F. Bertrand, E. Kahn, Grading of cystosarcoma phyllodes by texture analysis of tissue architecture, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 16 95-100, 1994.
- [58] F. Gilles, A. Gentile, V. Le Doussal, E. Kahn, Use of texture parameters in the classification of soft tissue tumours, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 16 315—320, 1994.
- [59] S.-I. Murata, P. Herman, J.R. Lakowicz, Texture analysis of fluorescence lifetime images of nuclear DNA with effect of fluorescence resonance energy transfer, *Cytometry* 43 94—100, 2001.

- [60] D. Gibson, P.A. Gaydecki, Definition and application of a Fourier domain texture measure: applications to histological image analysis, *Comput. Biol. Med.* 25 551-557, 1995.
- [61] R.M. Haralick, K. Shanmugan, J. Dinstein, Textural features for image classification, *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* 3 610—621, 1973.
- [62] S.S. Cross, Fractals in pathology, *J. Pathol.* 182 1-8, 1997.
- [63] S.S. Cross, J.P. Bury, P.B. Silcocks, T.J. Stephenson, D.W.K. Cotton, Fractal geometric analysis of colorectal polyps, *J. Pathol.* 172 248-262, 1994.
- [64] S.S. Cross, A.J. Howat, T.J. Stephenson, D.W.K. Cotton, J.C.E. Underwood, Fractal geometric analysis of material from molar and non-molar pregnancies, *J. Pathol.* 173 115-118, 1994.
- [65] T. Irinopoulou, J.P. Rigaut, M.C. Benson, Toward objective prognostic grading of prostatic carcinoma using image analysis, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 15 341-344, 1993.
- [66] S.H. Ong, X.C. Jin, Jayasooriah, R. Sinniah, Image analysis of tissue sections, *Comput. Med. Biol.* 26 269-279, 1996.
- [67] R.O. Duda, P.E. Hart, *Pattern Classification and Scene Analysis*, Wiley, New York, USA, 1973.
- [68] L.M. Firestone, Automated microscopy for lymph node cancer diagnosis, *SPIE* 1894 15—20, 1993.
- [69] L.S. Hibbard, D.W. McKeel, Multiscale detection and analysis of the senile plaques of Alzheimer's disease, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 42 1218-1225, 1995
- [70] A.B. Hittelet, P. Yeaton, C. Decaestecker, M. Remmelink, N. Nagy, M. Cremer, I. Salmon, R. Kiss, N. Bourgeois, Discrimination between dysplastic and malignant epithelium of the ampulla of vater based on quantitative image cytometric data, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 22 98-106, 2000.
- [71] P. Hufnagl, H. Guski, G. Wolf, K. Wenzelides, H. Martin, K. Roth, The PARTICLE expert system for tumour grading by automated image analysis, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 11 440-446, 1989.
- [72] A.E. Dawson, R.E. Austin, D.S. Weinberg, Nuclear grading of breast carcinoma by image analysis, *Am. J. Clin. Pathol.* 95 (Suppl. 1) S29-S37, 1991.

- [73] P.H. Bartels, T. Gahm, D. Thompson, Automated Microscopy in diagnostic histopathology from image processing to automated reasoning, *Int. J. Imaging Syst. Technol.* 8 214-223, 1997.
- [74] D. Thompson, P.H. Bartels, H.G. Bartels, P.W. Hamilton, J.M. Sloan, Knowledge-guided segmentation of colorectal histopathologic imagery, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 4 236-246, 1993.
- [75] D. Thompson, P.H. Bartels, H.G. Bartel, R. Montironi, Image segmentation of cribriform gland tissue, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 17 314-322, 1995.
- [76] P.H. Bartels, D. Thompson, J.E. Weber, Expert system in histopathology. IV. The management of uncertainty, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 14 1-13, 1992.
- [77] C.G. Looney, *Pattern Recognition Using Neural Networks*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- [78] H.E. Dytch, G.L. Wied, Artificial neural networks and their use in quantitative pathology, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 12 379-393, 1990.
- [79] M. Klencki, D. Slowinska-Klencka, A. Lewinski, Multifarious system for quantitative analysis of histologic compartments, *Comput. Biomed. Res.* 30 165-169, 1997.
- [80] A.N. Refenes, N. Jain, M.M. Alsulaiman, An integrated neural network system for histological image understanding, *SPIE* 1386 62-74, 1990.
- [81] P. Karakitsos, A comparative study of three variations of the learning vector quantizer in the discrimination of benign from malignant gastric cells, *Cytopathology* 9 114-125, 1998.
- [82] P.J. Sjostrom, B.R. Frydel, L.U. Wahlberg, Artificial neural network-aided image analysis system for cell counting, *Cytometry* 36 18-26, 1999.
- [83] C. Gonzalez & R. E. Woods. Gonzalez. *Digital Image processing* 3rd edition 2008.

## ÖZGEÇMİŞ

Ali Furkan KAMANLI, 06.08.1990'da Kayseri de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Elazığ'da tamamladı. 2008 yılında Elazığ Kaya Karakaya Fen Lisesi, Sayısal Bölümü'nden mezun oldu. 2008 yılında Sakarya Üniversitesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü'ne girdi ve 2013 yılında mezun oldu. 2013 – 2014 yılları arasında Yazaki Otomotiv ve Yan Sanayi Tic. Ltd. Şti'nde mühendis olarak çalıştı. Bu süre içerisinde şirketin Ford projesinde Ürün Mühendisliği yaptı ve yeni proje ve tasarım değişiklikleri yönetiminde aktif rol oynadı. 2014-2015 yılları arasında Biyomedikal Bilimsel Araştırma ve Geliştirme merkezi kurulumu ve Tubitak projelerinde görev almaya başladı ve görevine hali hazırda devam etmektedir.