

Mikroskop görüntüsünde otomatik embriyonik kök hücre tespiti ve sayımı

Gökçen Çetinel^{1*}, Ali Furkan Kamanlı²

06.07.2015 Geliş/Received, 28.08.2015 Kabul/Accepted

ÖZ

Mikroskop altında hücre sayımı, bir uzman tarafından mikroskop merceğine sürekli bakılarak veya otomatik hücre sayımı yöntemleri kullanılarak yapılabilmektedir. Sayım uzman tarafından yapıldığında oldukça yorucu, uzun süren ve düşük doğruluğa sahip bir işlem haline gelmektedir. Bunun dışında hücre sayımını zorlaştıran ve doğruluğu düşüren başka etkenler de mevcuttur. Bu nedenle, hücre sayımının otomatik bir şekilde yapılması ve sunulan sayım yöntemlerinin iyileştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, flüoresans mikroskop görüntüsünde otomatik hücre tespiti ve sayımı için bir yöntem sunulmuştur. Yöntemin tüm adımları açıklanmıştır. Sunulan yöntemin etkinliği birçok farklı durum için simülasyon programları vasıtasıyla test edilmiş, yöntemin başarıya ulaştığı ve gelecek vadeden bir çalışma olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: embriyonik kök hücre, otomatik kök hücre sayımı, histogram bölütleme, maksimum nokta analizi

An automatic embryonic stem cell counting method

ABSTRACT

The cell counting process can be performed by manual counting in which a specialist counts the cells with naked eye or the automatic counting that utilizes the computer-based techniques. The counting process becomes exhausting, long and incorrect when the counting performed by specialist. Therefore the cell counting process must be performed automatically. In this study, an automatic cell detecting and counting method under fluorescence microscopy is proposed. All steps of the method are given in details. Several computer simulations are performed to evaluate the effectiveness of the method and it is shown that the proposed method gives promising results.

Keywords: embriyonic stem cell, automatic stem cell counting, histogram partitioning, maximum point analysis

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1 Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü, Sakarya - gcetinel@sakarya.edu.tr

2 Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü, Sakarya - alifurkankamanli@gmail.com

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Otomatik hücre sayımı tıptan gıdaya birçok alanda insan sağlığı için temel teşkil eden önemli uygulamalarda yer bulmaktadır. Örneğin, gıda alanında süt, peynir vb. ürünler içerisindeki yararlı veya zararlı bakterilerin sayılarak ürün hakkında gerekli olan tüm bilgilerin toplanmasını sağlamak amacıyla, meyve ve sebze gelişiminin takibinde kullanılmaktadır. Tıp alanında özellikle teşhis ve tedavi aşamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre sayımı sağlıklı bireylerde kontrol amaçlı kullanıldığından önem taşımaktadır. Herhangi bir hastalığa erken teşhis konulabilmesine olanak sağlamaktadır. Hastalığın teşhisinin erken yapılabilmesi müdahale zamanının da kısalması anlamına gelmektedir ve hayati önem taşımaktadır. Tedavi sürecinde ise uygulanması gereken tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde, tedavide kullanılan yöntemlerin doz ve süresinin ayarlanması konusunda uzman kişilere bilgi sağlaması amacı ile hücre sayımı gerekmektedir.

Tıp alanındaki uygulamalara verilebilecek en önemli uygulama örneklerinden 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 parametreler de 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 metotlar 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 sayımlarının kolay yapılabilmesi için ise eritrosit sayısı fazla olduğundan eritrositleri parçalayan bir seyrelti kullanılması gerekmektedir. Seyreltilmenin derecesi de hücre tipine bağlıdır. Hücre sayımlarındaki hatalar örnek ölçümü, seyreltme veya hücre sayımı aşamalarındaki yanlışlıklardan kaynaklanır. Çok fazla sayıda örnek incelenemediğinde ölçüm sonuçlarının doğruluğu artar. Otomatik yöntemler çok fazla sayıda hücre ölçtüğünden ve istatistiksel hata oranının düşük olmasından dolayı uzman tarafından gerçekleştirilen yöntemlere göre çok daha üstündür. Hatalar genel olarak örneğin yapısından, uzmanın tecrübesinden ve hatalı donanımlardan kaynaklanabilir. Sayım hacmindeki hücre dağılımına bağlı hatalara saha hataları adı verilir ve sadece daha fazla hücrenin sayılmasıyla en aza indirilebilir.

Hücre sayımı klinik araştırmalarda birçok alanda yer almaktadır. Bunların başlıcaları patoloji, endoskopi, 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. Hücre sayımı kök hücre çalışmalarında da kullanılmaktadır. Kök hücre tedavisi ile bebeklerden, yetişkinlere kadar birçok organ yetmezliği ve doku hasarı sorunları çözebilmektedir. Bu çalışmada embriyonik kök hücre sayımının otomatik olarak gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle, öncelikle kök hücreler hakkında temel bilgiler verilmelidir.

1.1. Kök Hücreler (Stem Cells)

Kök hücreler, büyümelerinin erken dönemlerinde vücut içerisindeki birçok farklı hücre tipine dönüşebilme potansiyeline sahip önemli hücrelerdir. Ayrıca, birçok dokuda dâhili onarım sisteminin bir parçası olarak çalışırlar. Kök hücreler insan ya da hayvan canlı olduğu sürece sürekli bölünerek diğer hücrelerin yerini doldurabilme yeteneğine de sahiptirler. Bir kök hücre bölündüğünde oluşan her bir yeni hücre kök hücre olarak kalabilir ya da kas hücresi, kırmızı kan hücresi, beyin hücresi gibi daha özel bir fonksiyona sahip başka bir hücreye dönüşebilir [5-8].

Kök hücreler iki önemli karakteristikleri ile diğer hücrelerden ayrılırlar. İlki, kök hücrelerin hücre bölünmesi sayesinde kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip uzmanlaşmamış hücreler olmalarıdır. İkincisi ise, uygun fizyolojik ya da deneysel koşullar altında özel fonksiyonlara sahip doku ya da organ hücrelerine dönüşebilmeleridir. Bağırsak ve kemik iliği gibi bazı organlarda kök hücreler düzenli olarak bölünerek hasar görmüş dokuları yenileyebilirler. Ancak, pankreas ve kalp gibi organlarda kök hücreler sadece özel koşullar altında bölünebilmektedirler. Şimdiye kadar bilim adamları öncelikli olarak hayvanlarda ve insanlarda bulunan iki tür kök hücre üzerinde çalışma yapmıştır: embriyonik kök hücre ve embriyonik olmayan somatik veya yetişkin kök hücre.

Sağlıklı bir hücre, arka arkaya ve çok sayıda genetik mutasyon geçirmesi durumunda kanser hücresine dönüşür. Kanser hücresine dönüşüm nedenleri ve evreleri uzun yıllar boyunca merak edilen bir soru olmuştur [2,3]. Bu soru, 2000'li yılların başında ilk olarak akut myeloid lösemi hastalarında fark edilen bir hücre topluluğunun kanserleşme mekanizması incelenerek yanıt bulunmuştur. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip olmaları nedeni ile çok hızlı bir şekilde çoğaldığı fark edilen bu hücrelere kanser kök hücreleri (KKH) adı verilmiştir [1-3].

İnsan vücudunda en hızlı şekilde izlenebilen Hemotopoetik Kök Hücreler (HKH) hakkında bilgi sahibi olunması bir zorunluluk haline gelmiştir. Hemotopoetik sistem özel fonksiyonları olan birçok hücreden oluşmaktadır. 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. Bu hücrelerin en önemli özellikleri kendi kopyalarını üretip yine bir kök hücre olarak yollarına devam etme veya farklılaşarak bir progenitör hücre dizisine dönüşerek birçok matür hücre oluşturabilmeleridir. Ayrıca migrasyon yapabilmek ve programlı hücre ölümü (apoptozis) yoluna girebilmek özellikleri de vardır. Bu aktiviteleri arasındaki denge vücutta bulunan kök hücre sayısını belirlemektedir. Kök hücrelerin anlık olarak sayı bilgilerinin alınabilmesi çok önemlidir. HKH hakkında vitro ortamında (laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda) yapılan klinik çalışmalar ileriki zamanlarda kanser kök hücresi araştırmalarına da ışık tutacaktır. HKH’lerin otomatik olarak sayımının gerçekleştirilmesi hayati önem taşımaktadır.

1.2. Görüntü Analizinin Gereksesi (The Necessity of Image Analysis)

Kanser hastalarına yapılan tedavilerin başında Radyoterapi ve Fotodinamik terapi gelmektedir. Bu yöntemler kanser tedavilerinde etkili tedavi yöntemi olmalarının yanı sıra hafifletici yöntem olarak da kullanılmaktadırlar. 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 bu özellikler ışığında tedavi edilmesine olanak verip iyileşme oranını ileri derecede arttırmaktadır [4,5]. 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 üç 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 flüoresans boyama işlemi olması durumunda hata oranı yüksek oranlara erişmektedir. Bu sebeplerden dolayı göz ile gerçekleştirilen hücresel sayma işlemleri

kullanılabilirliğini kaybeder ve daha karmaşık işlemlere ihtiyaç duyulur.

Doku parçaları için otomatik görüntü analizi giderek artan bir önem kazanmaktadır. Sunulan yöntemler ile hücresel materyallerin miktarına dahi karar verebilmek özelliği sağlamaktadır. Görüntü analiz yöntemleri geçen 10 yıl içerisinde araştırmacılar ve doktorlar için teşhisi yüksek oranda kolaylaştırdığı için bir ihtiyaç olarak görülmeye başlanmıştır. İlk çalışmaların birçoğunda hücresel analiz yapmaya odaklanılmış ve özel olarak kan hücresi analizlerine yoğunlaşmış, sitolojik görüntüler alınmış ve otomatik hücre analizleri yapılmıştır. Sitolojinin aksine histolojik görüntülerden de anlamlı bilgilerin çıkarılması için yapılan araştırmalar yeterli seviyede yapılmamıştır [6-7]. Histolojik mikroskopik parçalar genellikle sitolojik kısımlara göre çok daha yoğun olmaktadır, bunun sebebi küçük bir kısmın bütün dokunun yapısını yansıtmasıdır. Fakat bu durumda 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 [8]. Şartlara bağlı olarak hücrelerin çekirdek sınırları bulanıklaşmakta ve çekirdek sınırları ile arka plan arasındaki belirsiz geçişler bölütleme sürecini daha da zorlaştırmaktadır. Hücreler arasındaki sınırlar görünmez 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 taşınması sağlanır. Özellikle kanser tedavisi için kanser hücresinin yapısı incelenen kısımdan çıkarıldığında görüntü de kullanılan büyütme özelliği ile belirli hücrelere odaklanılmaktadır. Sitolojide de büyütmenin yüksek derecede yapıldığı görüntüler kullanılmaktadır ve bu işlem doku dolaşımı zorlaştırdığından dolayı birden fazla görüntünün ne kadar karmaşık hale gelir ise bölütleme işleminin de aynı derecede karmaşık olması gerekmektedir [9,10].

1.3. Sunulan Yöntemler (Proposed Methods)

Geçen 10 yıl içerisinde yüksek teknoloji içeren görüntü analiz teknikleri ve yazılım uygulamaları genel olarak yapay zekâ alanında yapılan çalışmalar ile birlikte hızlanarak histolojik hücre analizini daha hızlı hale getirmiştir. Özel olarak bu alanda farklı eğitim ve alt yapıya sahip araştırmacılar yapılan ilk çalışmaları genişleterek sitolojik görüntü analizi alanında ilerleme kaydetmeyi hedeflemektedirler. Ek olarak ortaya çıkan bir diğer avantaj ise yüksek teknoloji içeren yüksek çözünürlüklü görüntü almayı sağlayan ve mikroskopik

görüntülerde karşılaşılan sorunları temelden çözebilen donanımlara 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 yapabilmeleri sağlanmıştır. Medikal görüntülerin analizi görüntü kazanımı, görüntü yeniden yapılandırması, görüntü türetilmesi, görüntü sıkıştırılması ve saklanması, görüntü analizi ve görüntü tabanlı tanıma özellikleri gibi birçok yöntemi kapsamaktadır. Bahsedilen tüm yöntemler hücre sayımı aşamalarında zorlayıcı olan işlemleri kolaylaştırmak için kullanılabilir. Hücre sayımı için kullanılan yöntemler ise, eşikleme, renk dönüşümü, bölgesel birleştirme, kenar bulma, şablon eşleme, doku analizi, sınıflandırma olarak sıralanabilir.

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 birçok çalışmada grilik seviyesine göre seçilen mantıklı 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, sayının artması için denemeler yapılabilmektedir [14]. Yarı otomatik sayma sistemleri pikselleri uzaysal düzlemde inceleyerek kullanıcı tarafından seçilen eşikleme aralığında sayıma imkan tanıyarak interaktif olarak işlem yapılmasını sağlamaktadır [15]. Referans [16]'da karaciğer hücrelerinin immunolojik olarak etiketlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bir başka çalışmada Ki-67 ile etiketlenen proteinlerin çoğalma sonucu değişimleri histolojik olarak incelenmiştir [17]. Global eşikleme uygulanarak aynı madde ile yapılan çalışmada sayım sonuçları daha doğru hale getirilmiş ve sayım hızlandırılmıştır [18].

Eşikleme teknikleri genellikle grilik seviyesine bağlı olarak histogram tepe noktalarını ortaya çıkarmaktadır ve gözlemci yargısını daha önemli kılmaktadır. Görüntü içerisinde ilgilenilen alan işaretleme elemanları ile boyandıktan sonra kırmızı, yeşil, mavi kanallar için (RGB görüntüsüne ait her kanal) eşikleme uygulanır [19]. Bu fikir ışığında birçok çalışma yapılmıştır. Referans [20,21]'de renk ayrımı ilgilenilen alanlara manuel olarak yapılmıştır. İşlem 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. Kohlberger ve arkadaşları tarafından yapılan bir

çalışmada RGB görüntü, renk tonu, doygunluk ve yoğunluk (HSI) uzay görüntüsüne dönüştürülerek kavramlar insan gözü ile incelenebilecek hale getirilmiştir. Yapılan çalışmalarda göğüs kanseri hücreleri için farklı bir bakış açısı sağlanmıştır [22,23]. Bir başka çalışmada, HSI renk modeli kemik iliği çalışmaları kullanılmıştır. Bu yöntem kemik iliği çalışmalarında büyük avantaj kazandırmıştır [24]. Doğunluğu ve yoğunluğu temel alan renk bileşenlerinden bağımsız HSI modeli ile leke miktarı [25]'te ölçülmüştür. RGB görüntüde leke tanıma algoritması içerisinde piksel tanıma sınıflandırmasının olması gerekmektedir. Üç boyutlu verilerle gerçekleştirilmesi zor olan algoritmalarından kurtulabilmek için hücre tanıma çalışmaları üç boyutlu renk değişimlerini (RGB, HSI vb.) bir çizgi veya alan üzerine taşımıştır. Ayrıca büyük alan içeren görüntülere Temel Bileşen Analizi (PCA) uygulanarak çekirdek sınırlarına belirlenmiştir [26]. Hücre sınırları kırmızı ile hücrenin çekirdeğinin sınırları ise sarı ile boyanmıştır. [27-32] arası referanslarda belirtilen farklı olarak boyanmış alanlarda doğrusal kombinasyonlar ile hücreler birbirinden ayrılarak hücre sınırları belirlenmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında görüntüleme sistemleri spektral özellikleri de göz önüne alarak araştırmaları bir ileri seviyeye taşımıştır.

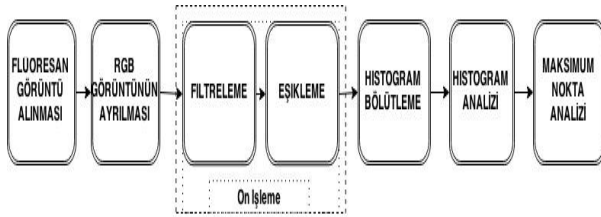
Bölge birleştirme işlemi histoloji alanında bölütleme alternatif olarak kullanılmaktadır. Grilik seviyesi eşiklemesi ve renk eşiklemesi sağlıklı bölütleme yapılmış bir görüntüyü garanti edememektedir. Karmaşık alt bölgeler içeren görüntülerde bu işlemlerin başarısı daha da azalmaktadır. Görüntü piksellerini bölütleme işlemi sırasında ele alabilmek için bölge birleştirme (region merging-RM) işlemi alternatif bir yaklaşımdır. Sitoloji ile karşılaştırıldığında histoloji içerisindeki görüntü karmaşıklığından dolayı RM yeteri kadar ön plana çıkamamıştır. [33]'te böbrekteki zar kısmının elektron mikroskobu altındaki görüntüsü üzerinde tipik bir RM tabanlı çok parçalı algoritma sunulmuştur. Lazer tarama özelliğine sahip bir mikroskop ile yapılan çalışmalar [34]'te verilmiştir. Bu çalışmada Watershed algoritması kullanılarak yüksek doğruluğa sahip sonuçlar elde edilmiştir. Gri-seviyeli görüntüye uygulanan Watershed algoritması ile kanser hücreleri [35]'te incelenmiştir.

Sonuç olarak, hücre sayımı çok uzun zamandır tıp alanının ayrılmaz bir parçası olmuştur. Fakat hücre sayımı çıplak göz ile yapıldığında çok uzun ve yorucu bir süreç olan hücre bölünme aşamalarının çok dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerektiğinden oldukça yorucudur ve subjektif sonuçlar vermektedir. Bu işlemin otomatik olarak gerçekleştirilmesi hata oranını azaltarak teşhis, tedavi ve kontrol aşamalarında doğru sonuçlara ulaşım olasılığını arttırmaktadır. Bu çalışmada 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 tümör dokularının yapısının anlaşılması ile paralel bir konu olduğundan yapılan çalışmalar bu alanda da büyük yarar sağlamaktadır. Çalışma şu şekilde düzenlenmiştir: Bölüm 2'de görüntünün elde edilmesi, ön işleme adımının uygulanması ve ön işlenmiş mikroskopik hücre görüntüsüne uygulanacak görüntü işleme teknikleri açıklanmıştır. Benzetim sonuçları ve yorumlar Bölüm 3'de sunulmuştur.

2. ÖN İŞLEME (PRE-PROCESSING)

Bu bölümde sunulan yöntemin ilk aşaması olarak mikroskopik görüntülerin nasıl elde edildiğinden ve yöntemin doğruluğunu arttırmak için görüntüye uygulanacak ön işleme adımından bahsedilmiştir. Sunulan yöntemin temel adımları Şekil 2.1'de blok diyagramlar şeklinde gösterilmiştir.

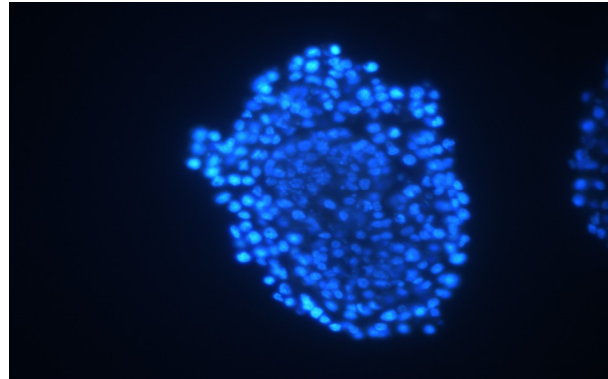


Şekil 2.1. Sunulan yöntemin blok diyagram gösterimi (Block diagram of the proposed method)

Bu çalışmada kullanılan embriyonik hücre görüntüleri "Institute of Biomedical Sciences" adlı Brezilya (UFRJ)'da bulunan özel bir merkezden alınmıştır. Hücre görüntüleri bu merkez tarafından şu şekilde elde edilmiştir: Alınan embriyonik görüntüler 8 gün boyunca nöral farklılaşma süreci içerisinde kültür ortamına bırakılmıştır. Embriyonik kısımlar uyarılarak inkübasyon ile nöral fenotip haline getirilmiştir. Son 4 gün içerisinde Retionik asit 2µM final konsantrasyona ulaştırılmaktadır. Daha sonra %4 ölçüsünde paraformaldehit (PF) 30 dakika kadar bırakılarak sucros gradyanlı (10, 20 ve 30% , 30 dakika süreyle) çözeltide tutularak doku içerisine en iyi sıcaklığın oluşturduğu işlemle sıfırın altında saklanarak tutulmaktadır. Ayarlanmış parçalar kristot içerisinde ayrı ayrı embriyonik hücrelere uygulanmıştır. Laboratuvar donanımları 10µM kalınlıkta ayarlanmıştır, bunun nedeni çekirdeklerin ortalama büyüklüğüne uymasından dolayıdır. Diğer alınan parçalar 5 dakika boyunca inkübasyon işleminde bir çeşit ters nükleli 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 Image Pro Express yazılımı kullanılmaktadır. Görüntü

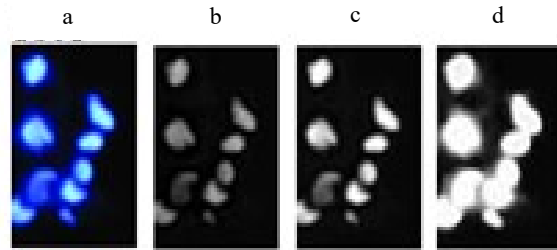
edinme işlemi yarı otomatik olarak uzmanlar tarafından büyütme, zamansal olarak kültürün görüntülenmesi ve odak özellikleri kontrol edilerek yapılmaktadır. Görüntülerin yakalanma çözünürlükleri 1032x1040 piksel olarak (40x zoom) özelliğine cevap verebilecek şekilde alınmıştır. Alınan görüntüler Tagged Image File (.tif) formatında kayıpsız olarak LZW sıkıştırması ile kaydedilmiştir [36].

Alınan flüoresans görüntü ilk olarak kırmızı, yeşil ve mavi kanallara ayrıştırılmıştır. Bu çalışmada yöntem tüm kanallar üzerinde test edilmiş ve yeşil kanal daha iyi sonuçlar verdiği için işlemler yeşil kanal üzerinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.2'de flüoresans mikroskobu ile elde edilmiş kök hücre görüntüsü verilmektedir.



Şekil 2.2. Kök hücre Flüoresans görüntüsü (Stem cell Fluorescence image)

Kanallarına ayrıştırılmış bir mikroskop görüntüsü kesiti ve her bir kanalı ise Şekil 2.3'de verilmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi yöntemin en iyi sonuç vereceği kanal yeşil kanaldır.



Şekil 2.3 Flüoresans mikroskop görüntüsü a)kırmızı, b)mavi ve c)yeşil kanal görüntüsü. (Fluorescence microscope image for a)red, b)blue, and c)green channel)

2.1. Filtreleme (Filtering)

Bu kısımda kanallarına ayrılmış mikroskop görüntüsüne uygulanan ön işleme işleminin ilk adımı olan filtreleme adımı açıklanmaktadır. Filtreleme görüntü üzerinde daha rahat işlem yapmamızı sağlayacak bir adım olarak görülmektedir. Bir görüntüdeki ayrıtlar ve diğer keskin geçişler görüntünün Fourier dönüşümünün yüksek frekans bileşenlerini önemli ölçüde etkiler. Bu yüzden,

frekans bölgesindeki yumuşatma yani yüksek frekanslardaki zayıflama alçak geçiren filtreler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu çalışma için birçok filtre türü denenmiş ve görüntü yapısına en uygun filtrenin Gauss filtresi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Gauss alçak geçiren filtrenin iki boyutlu ifadesi

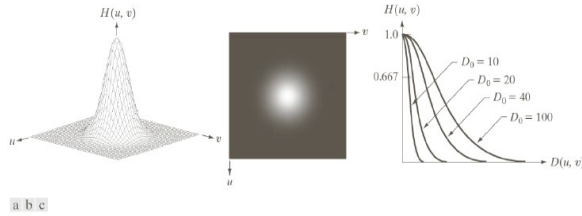
$$H(u, v) = e^{-D^2(u, v)/2\sigma^2}$$

$$D(u, v) = \left[\left(u - \frac{p}{2} \right)^2 + \left(v - \frac{q}{2} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2.1)$$

şeklinde verilir. Burada $D(u, v)$ frekans çerçevesinin merkezinden kenarlarına olan uzaklıktır. σ , standart sapma olarak adlandırılır ve dağılımın merkezden yayılımını gösteren bir ölçüttür. D_0 filtrenin kesim frekansı olmak üzere, $\sigma = D_0$ olarak seçilirse Eşitlik (2.1) şu şekilde düzenlenebilir,

$$H(u, v) = e^{-D^2(u, v)/2D_0^2} \quad (2.2)$$

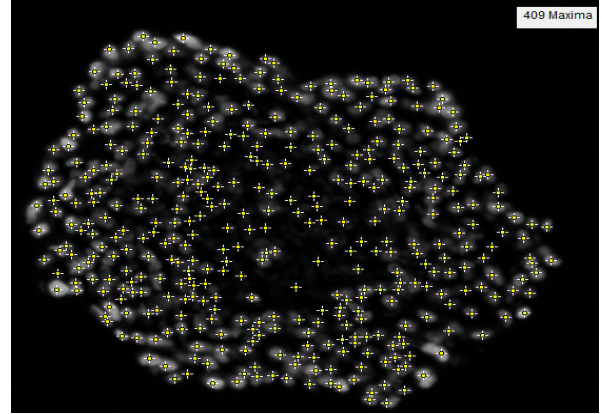
$D(u, v) = D_0$ olduğunda, Gauss alçak geçiren filtre (GAGF), ortalama değerinin 0,607 altındadır. GAGF'nin ters Fourier dönüşümü de Gauss'tur. Bu durum, Eşitlik 2.1 veya 2.2'nin ters ayrık Fourier dönüşümü (IDFT) hesaplanarak elde edilen uzamsal Gauss süzgecinin salınıminin olmayacağı anlamına gelir. Şekil 2.4'te perspektif çizimi, görüntü gösterimi ve GLPF fonksiyonunun yarıçap en kesiti verilmiştir.



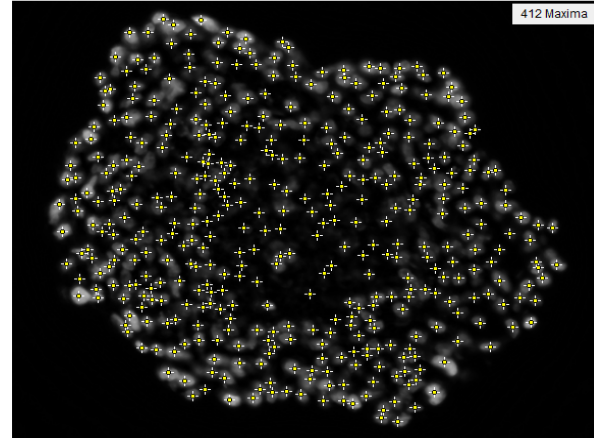
Şekil 2.4. GAGF transfer fonksiyonunun perspektif çizimi (The perspective of GLPF)

Daha önce de bahsedildiği gibi sunulan yöntemde Gauss filtresinin daha uygun olduğunu göstermek amacı ile Şekil 2.5'te deneme yapılan bazı filtre türleri ile Gauss filtresinin sonuçları verilmiştir. Ortalama alıcı filtrede görüntüdeki her bir pikselin n adet (n: filtre uzunluğu) komşusu ile ortalaması alınarak pikselin değeri yeniden hesaplanır. Bunun sonucu olarak keskin geçişler azalır ve kenarlar bulanıklaşır. Medyan filtreleme yönteminde orijinal piksel değeri n adet (n: filtre uzunluğu) komşusunun sıralama sonucu bulunan ortanca değeri ile değiştirilir. Uzamsal çözünürlüğü bozmadan bağımsız nokta veya çizgileri görüntüden temizlemek için kullanılır. Gauss filtresinde ise, filtreleme önce yatay sonra dikey eksene uygulanır. Görüntüde bilgi kaybına neden olmadan yumuşama sağlar. Böylece görüntüdeki maksimum noktalar öne çıkar. Sunulan yöntemde Gauss filtresi yeşil kanala uygulanmıştır. Şekil 2.6'da

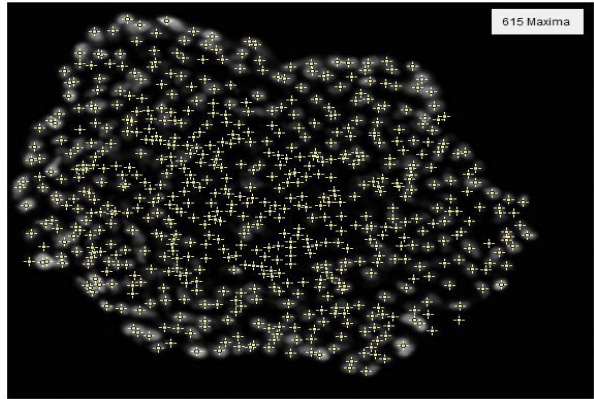
görüntüye Gauss filtresi uygulanmadan ve uygulandıktan sonra elde edilen üç boyutlu noktasal gösterim verilmektedir. Gauss filtresi tepelikleri yumuşatarak sunulan yöntemin sonraki adımlarından olan maksimum nokta analizinin doğruluğunu artırmaktadır. Şekil 2.7'de ise her kanala Gauss filtresi uygulandığında elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Filtreleme işleminden sonra ön işlemenin diğer adımı olan eşikleme işlemi gerçekleştirilecektir.



(a)

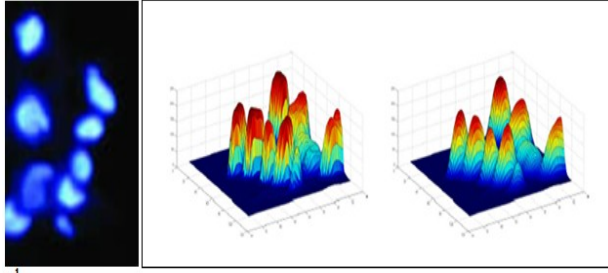


(b)

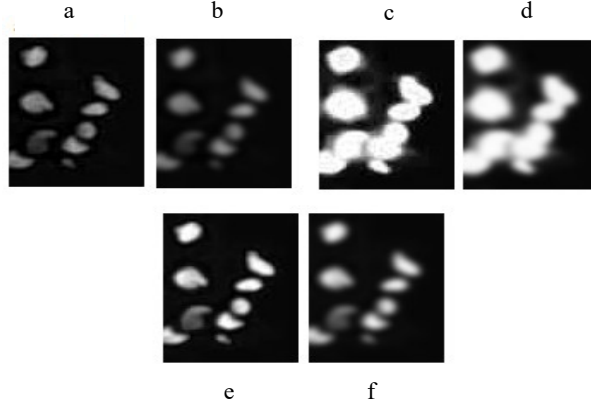


(c)

Şekil 2.5. Filtreleme sonuçları a)ortalama alıcı filtre, b)medyan filtre ve c)Gauss filtresi (Filtering result for a)average filter, b)median filter and c)Gaussian filter)



Şekil 2.6. a)Orijinal mikroskop görüntüsü, b)Filtrenmemiş ve c)Filtrenilmiş üç boyutlu gösterilim. (a) Original microscope image, b)3-d representation of image before filtering and c)After filtering)



Şekil 2.7. Gauss filtresi kombinasyonları a-b)Mavi kanal Gauss filtresi öncesi ve sonrası, c-d)Kırmızı kanal Gauss filtresi öncesi ve sonrası, e-f)Yeşil kanal Gauss filtresi öncesi ve sonrası (Gauss filter combinations a-b)Images for blue channel, c-d)Images for red channel and e-f)Images for green channel before and after filtering)

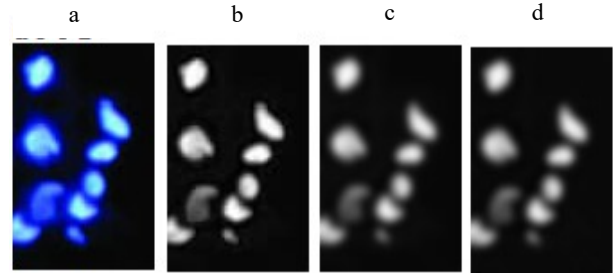
2.2. Eşikleme (Thresholding)

Görüntü bölütleme yöntemlerinin bir kısmı bir görüntünün parlaklığının veya renk bileşenlerinin eşiklenmesine dayalıdır. İki seviyeli parlaklık eşikleme yöntemi bunlardan biridir. Birçok görüntü farklı parlaklıklara sahip bir arka planda yer alan oldukça düzgün dağılımlı parlaklığa sahip nesnelere oluşur. El yazısı veya daktilo yazısı metinler, gökyüzünde çekilmiş uçak resimleri ve mikroskobik biyomedikal görüntü örnekleri için iki seviyeli eşikleme yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür görüntüler için parlaklık nesneyi arka plandan ayırmak için kullanılan ayırt edici bir özelliktir. Eğer ilgilenilen nesne siyah arka planda beyaz bir nesne (ya da tam tersi olabilir) ise, nesneyi arka plandan ayırmak için en çok yapılan işlem ortalama grilik seviyesinde bir eşik seçmektir.

Gözlemlenen nesne görüntüye maruz kaldığında ve hem nesne hem de arka plan çok geniş bir grilik seviyesi ölçeğine sahip olduğunda bazı problemler oluşmaktadır. Sıklıkla karşılaşılan başka bir problem ise arka planın düzensiz olmasıdır. Bir görüntüde eşik değeri küçük seçilirse nesne kayıplar oluşur. Tam tersine eşik değeri büyük seçilirse nesne hatalı bir şekilde algılanır.

Literatürde eşikleme işlemi için birçok yöntem sunulmuştur [2-12]. Bunlardan bazıları eşik değerini, grilik seviyesi için önsel bir olasılık dağılımı varsayımına uyacak şekilde bir seviyeye ayarlayarak eşikleme işlemini gerçekleştirmektedir. Bazıları ise, eşik değerini histogram tepelikleri arasındaki minimum mesafe olarak ayarlamaktadırlar.

Uygulanan yöntem içerisinde flüoresans görüntülemeye dolaylı olarak tek parça olmayan arka plana eşikleme yöntemi uygulanmıştır. Eşikleme değeri $t = \mu + x\delta$ formülü ile elde edilmiştir. Burada, μ ortalama değer, δ görüntünün standart sapması, x ise deneysel olarak belirlenmiş sabit bir sayıdır. Görüntüde, t eşik değerinden daha küçük olan piksel yoğunlukları sıfıra eşitlenerek hücre görüntülerinin daha ön plana çıkması sağlanmıştır.



Şekil 2.8. a)Orijinal görüntü, b)Yeşil kanal, c)Filtrenilmiş ve d)Eşiklenmiş görüntü (a)Original image, b)Green channel, c)Filtered green channel image and d)Thresholded image)

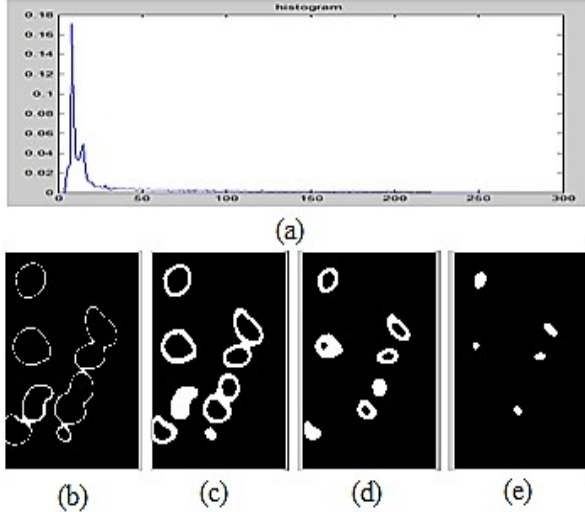
Şekil 2.8'de sırasıyla orijinal flüoresans görüntü, yeşil kanala ayrıştırılmış görüntü, Gauss filtresinden geçirilmiş yeşil kanal görüntüsü ve son olarak eşikleme işlemi uygulanmış görüntü verilmektedir. Eşikleme işlemi ile flüoresans parlaklığı olmayan pikseller 0 değerine getirildiğinden dolayı hücreler ön plana çıkarılmıştır. Bu sayede sayım işlemi için, ister bu işlemden sonra manuel olarak ister otomatik olarak devam edilecek olsun, sayımda büyük kolaylık sağlanmaktadır.

2.3 Histogram Bölütleme (Histogram Partitioning)

Bir boyutlu histogram, parlaklık seviyelerinin olasılık değerlerinin kestirilmesi ile hesaplanır. Bunu yapmanın yolu görüntüdeki parlaklık seviyelerinin frekansını yani meydana geliş sıklığını bulmaktır. Görüntü kaynağı ergodik ise, her bir parlaklığa ait histogram değeri görüntüde o parlaklığa sahip piksel sayısının tüm piksel sayısına oranı ile hesaplanır. Bilindiği gibi siyah beyaz bir görüntüde 256 grilik seviyesi mevcuttur. Sunulan yöntemde öncelikle ön işleme adımı uygulanmış hücre görüntüsüne ait histogram eğrisi elde edilir. Daha sonra 0-255 arası değişen parlaklık seviyesi değerleri dört eşit parçaya ayrıştırılır. Buradaki amaç, her bir hücreyi dış kısmı koyu ortası açık olacak şekilde görüntüleyebilmek ve üst üste gelmiş olsa hadi mümkün olduğunca hücreleri

birbirinden ayrıştırılabilmektedir. Şekil 2.9 a'da Şekil 2.3 a'daki hücre görüntüsünün histogramı ve b, c, d ve e'de ise sırasıyla histogram parçaları verilmektedir.

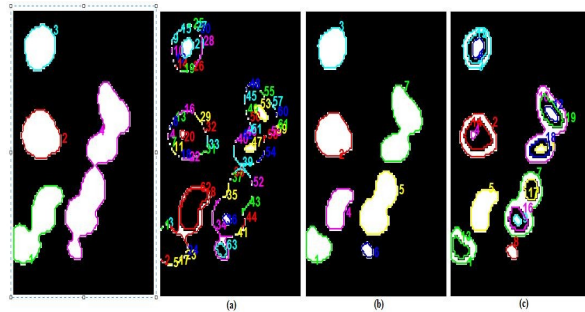
Bu analiz ile görüntüde grilik seviyesinin toplandığı yerler ve kesikli olan kısımlar tespit edilerek hücrelerin görüntü üzerinde kaybolmadan birbirinden ayrıştırılabilmesi histogram bölütleme sonucunda ortaya çıkan parçaların kombinasyonları ile sağlanacaktır.



Şekil 2.9. Histogram bölütleme: a)Şekil 2.3 a'nın histogramı, b)[0, 63], c)[64,127] d)[128,191], ve e)[192,255] histogram parçaları (Histogram partitoning a)Histogram for Figure 2.3.(a)image, b)[0, 63], c)[64,127] d)[128,191], and e)[192,255] histogram parts)

2.5 Maksimum Nokta Analizi (Maximum Point Analysis)

Histogram bölütleme işlemi sonucunda dört histogram parçası için mümkün on bir kombinasyon vardır. Belirtilen tüm işlemlerden sonra hücre sınırlarının en iyi olarak belli olduğu kombinasyon ile hücre çevresi ve orta noktası belirgin hale getirilecektir. Böylece her bir hücre dışı koyu içi parlak olacak şekilde tek bir tepe noktaya sahip olacaktır. Sayma işleminde yapılan, bu maksimum noktaların sayısını tespit etmektir.



Şekil 2.10. Histogram analizi ile hücre maksimum noktası ve sınır belirlenmesi (Maximum point detection and boundary determination by histogram analysis)

Şekil 2.10'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. Bu yüzden bütün kombinasyonlar denenerek 2 ve 4 no'lu histogramlar birleştirilmiştir ve simulasyonlar ona göre gerçekleştirilmiştir.

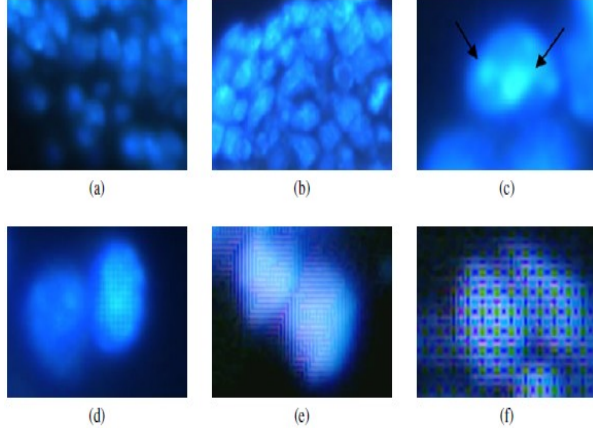
3. BENZETİM SONUÇLARI (SIMULATION RESULTS)

Bu kısımda, MATLAB programı kullanılarak sunulan yöntem ile elde edilen otomatik hücre sayım sonuçları verilmiştir. Hücre görüntüleri Bölüm 2'de belirtildiği gibi elde edilmiştir. Kullanılan hücre görüntüsü veri tabanı iki gruba bölünmüş 92 görüntüden oluşmaktadır. Grup 1'de kabul edilebilir bir seviyede gürültüye maruz kalmış 69 görüntü ve Grup 2'de yüksek seviyede gürültüye maruz kalmış 23 görüntü bulunmaktadır.

Yanlış ayarlanmış görüntüler yanlış odaklanmış görüntüleri oluşturmaktadır (Şekil 3.1 (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 çekirdek boyutlarında olması durumunda dahi alınan hücre görüntülerin kısmen üst üste gelerek sayımı zorlaşabilmektedir. Tek bir alanda birçok hücrenin bulunması sayım işlemi zorlaştırmaktadır. Bu durumlarda insan görüşünün bu hücreleri birbirinden ayırması çok zorlaşıp bazı durumlarda imkansız hale gelmektedir(Şekil 3.1(b)). DAPI prosesi hücrelere bağlanarak onları mavi/açık mavi hale getirerek mikroskop ile görüntülenebilmesini sağlamaktadır(Şekil 3.1(c)). Merkezde daha açık renk içeren ve sınırlara doğru renk parlaklığı azalan bir hale gelmektedirler. Fakat bazen DNA'nın çekirdek içerisinde iki kısımda konsantre halde durmasından dolayı iki yada daha fazla parlaklık belirlenebilmektedir.

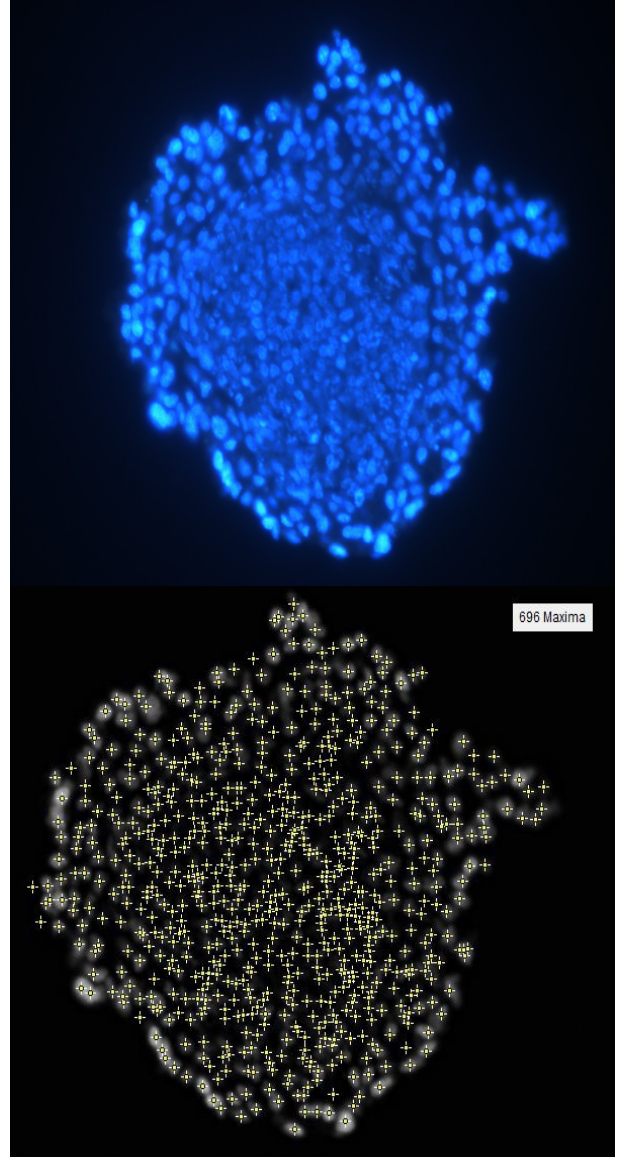
Alınan görüntülerde gürültünün olması doğal bir sonuçtur (Şekil 3.1(d)). Fakat yanlış parametre seçimi farklı ve daha kuvvetli gürültülere sebep olabilmektedir (Şekil 3.1(e)). Gürültünün var olması embriyonik hücre sayımında daha farklı sorunlara sebep olarak otomatik olarak sayım işlemi zorlaştırmaktadır (Şekil 3.1(f)). 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 sunulan yöntemin etkinliği benzetim sonuçları verilerek tartışılmaktadır.

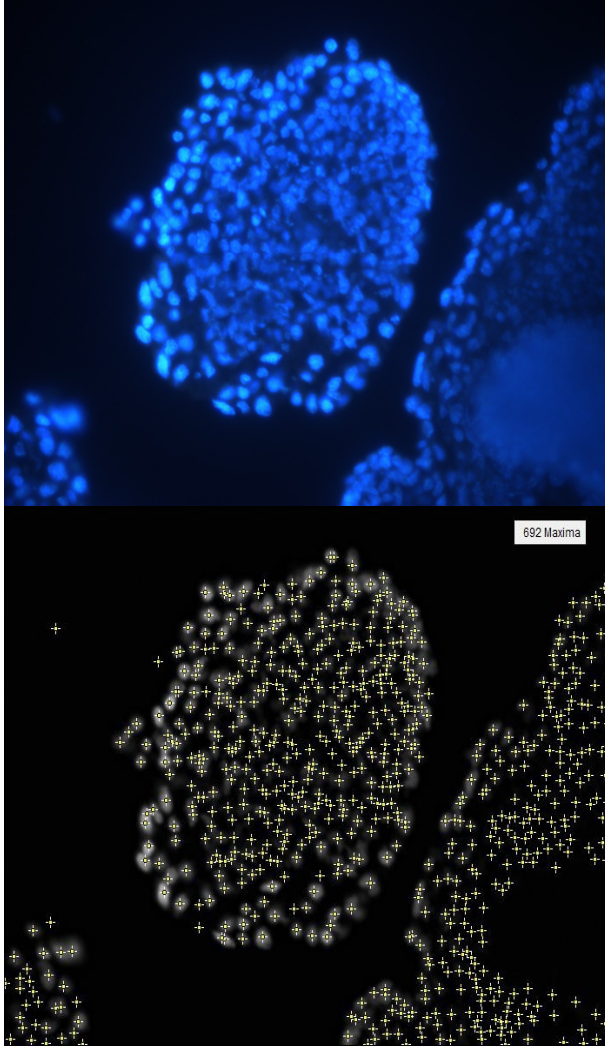


Şekil 3.1. Hatalı alınmış görüntü durumları a)Yanlış odaklanmış görüntü b)Hücrelerin üst üste gelme durumu c)İki DNA noktasının bulunma durumu d)Normal gürültü seviyesi e)Düşük gürültü seviyesi f)Yüksek gürültü seviyesi. (Images under different distortions a)Wrong focusing, b)Cell overlap, c)Two DNA point, d)Acceptable noise level, e)Low noise level and f)High noise level)

Aşağıdaki şekillerde (Şekil 3.2-3.7) farklı durumlar için manuel ve sunulan yöntem ile elde edilen sayım sonuçları gösterilmektedir. Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te üst üste gelen fazlaca hücrenin bulunduğu görüntülerde elde edilen hücre sayıları verilmiştir. Alınan flüoresans görüntüde orta kısımda toplanan görüntülerin manuel olarak sayılabilmesi mümkün olmamıştır. Bu durumda manuel sonuçlara göre %23 oranında artış sağlanmıştır. 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 3.2. Üst üste gelen hücrelerin bulunduğu flüoresans görüntü örneği (Overlapped florescence cell images)

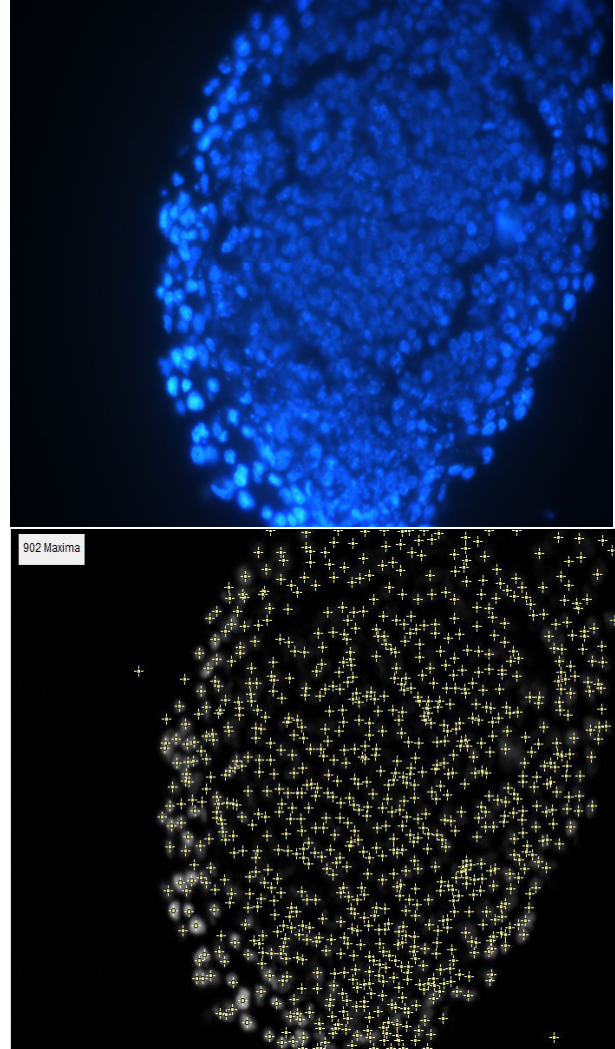


Şekil 3.3. Sayılamayan kümelenmiş hücre içeren flüoresans görüntü örneği (Uncountable clustered florescence cell image)

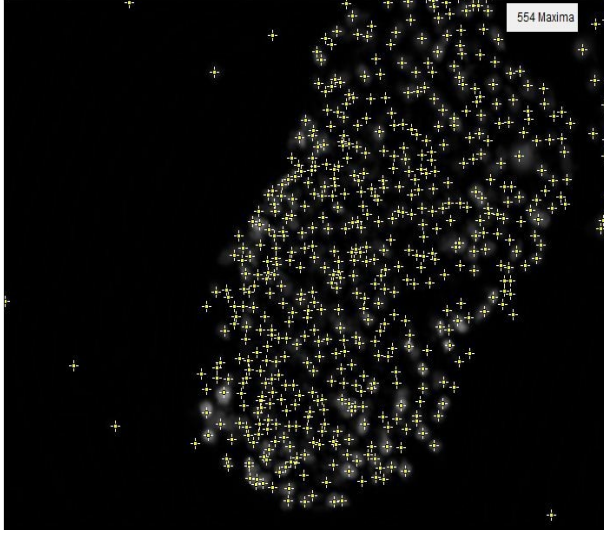
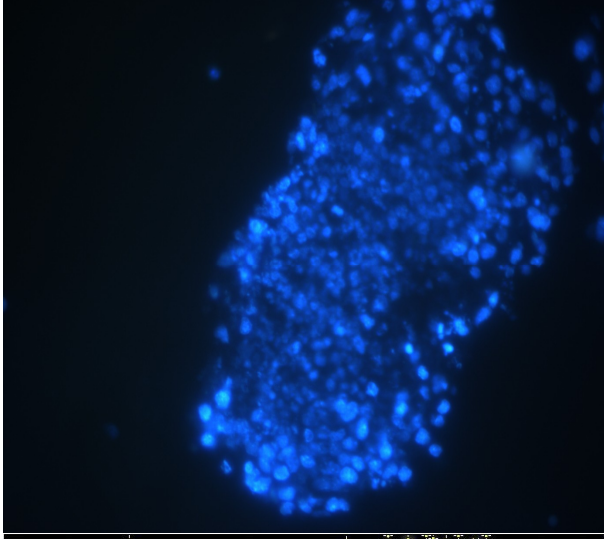
Şekil 3.4'te aynı görüntüde çok fazla hücre olduğunda elde edilen sayım sonuçları verilmektedir. Bu durumda manuel sayıma göre %40 oranında daha doğru sayım sonuçları elde edilmiştir. Şekil 3.5'te ise hücre sınırlarının üst üste gelmesinden dolayı ortaya çıkan bir sayım problemi gösterilmektedir. Sınırları birbiri üzerine denk gelen hücre toplanmaları arasındaki sınırlar kaldırılarak sayma işlemi gerçekleştirilmiş ve daha doğru sonuçlara ulaşılmıştır.

Son olarak Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de manuel sayımın yapılamadığı görüntü örnekleri verilmiştir. Bu durumda sunulan yöntem ile elde edilen sonuçlar şekillerde gösterilmektedir. Hücre sayısı çokluğundan dolayı manuel olarak çok fazla zaman gerektiren hücre görüntüsü kısa sürede sayılabilmıştır. Yüksek gürültü içeren bu görüntülerde çıplak göz ile fark edilemeyen hücreler sayılabilmıştır. Ayrıca, Tablo 1'de Şekil 3.8'de verilen iki farklı görüntü için uzman sayım sonuçları,

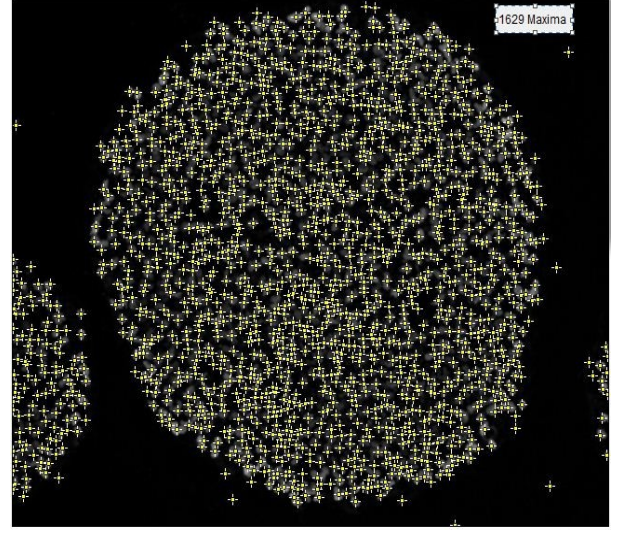
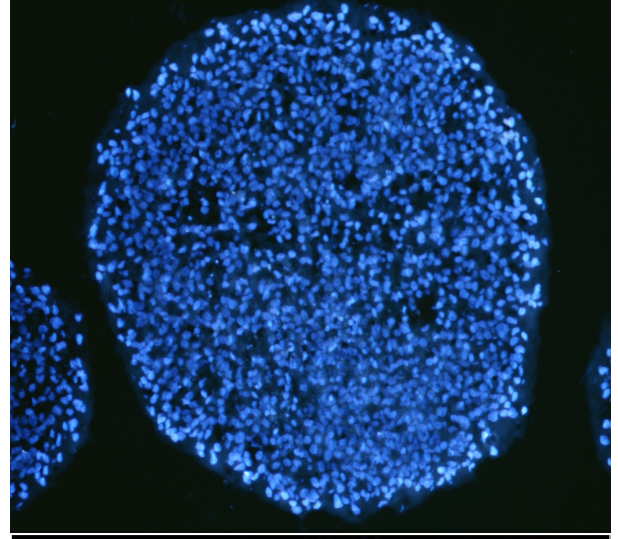
[36] nolu referanstaki yöntem ve sunulan yöntem ile elde edilen sayım sonuçları verilmektedir. Tablo 2'de ise, beş farklı hücre görüntüsü için [36] nolu referanstaki yöntem ve sunulan yöntem ile elde edilen sayım sonuçları gösterilmiştir. Hücre görüntüleri incelendiğinde sunulan yöntemin gözden kaçırılan çok sayıda hücreyi de yakalayıp sayıma dahil ettiği açıkça görülmektedir.



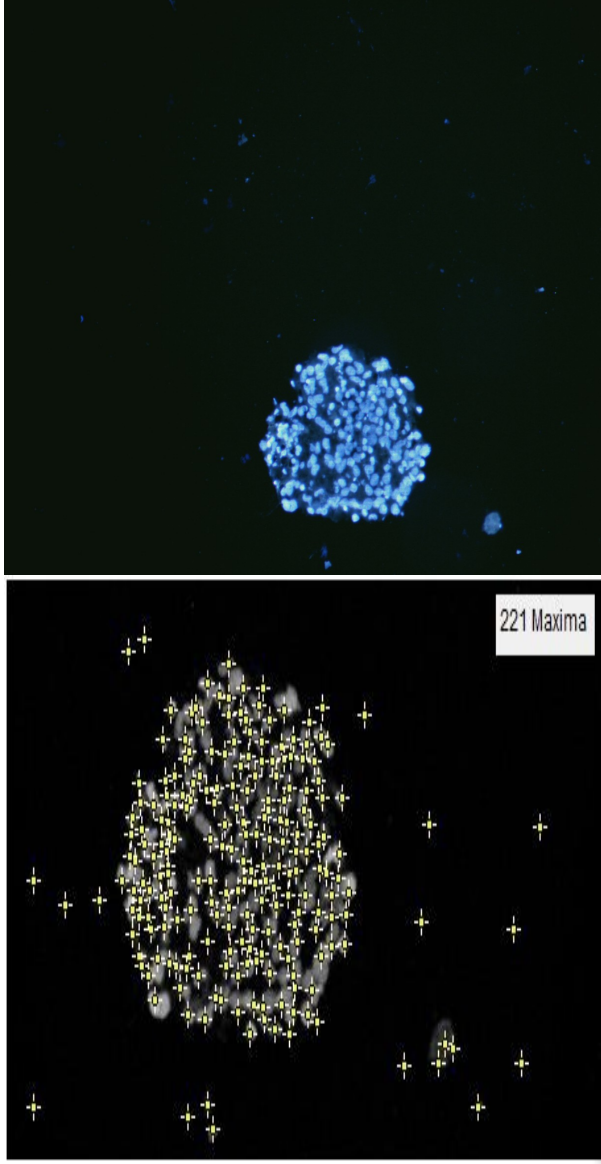
Şekil 3.4. Çok sayıda hücre içeren flüoresans görüntü örneği. (Florescence cell image including so much cells.)



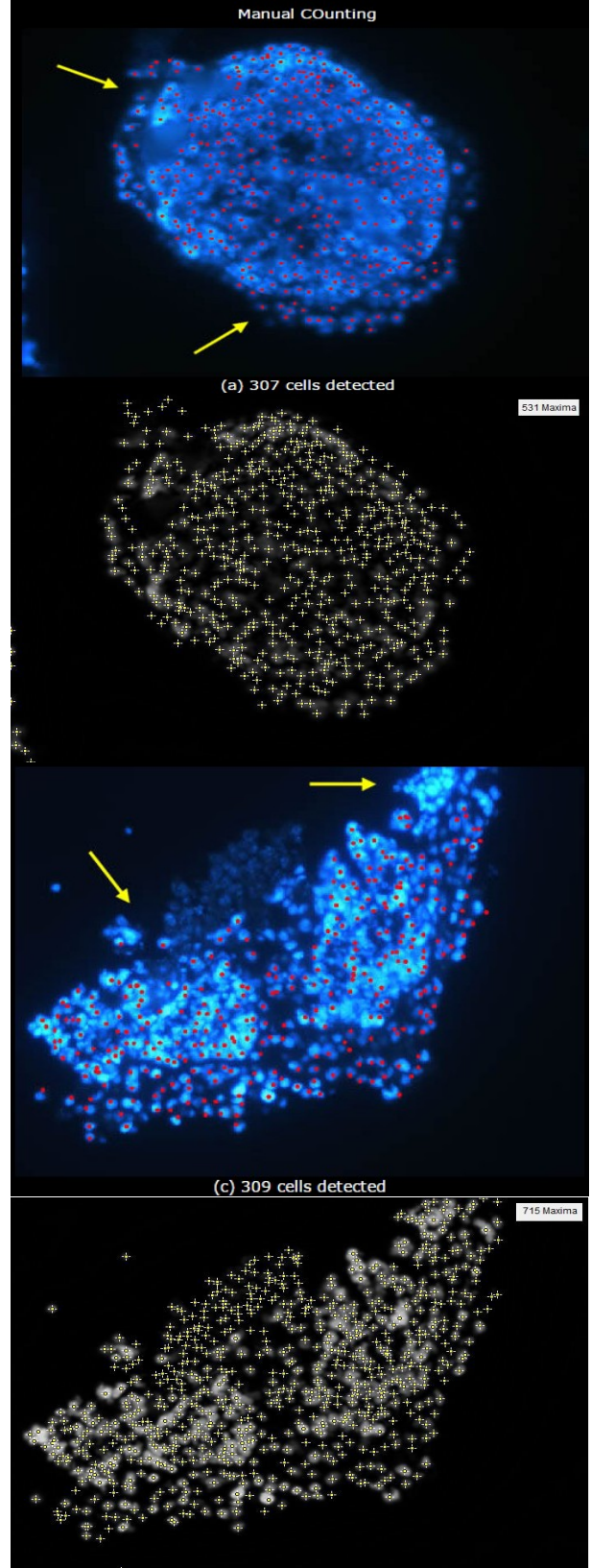
Şekil 3.5. Hücre sınırlarının üst üste gelmesi durumunda flüoresans görüntü örneği (Florescence image in the presence of overlapped cell boundaries)



Şekil 3.6. Yüksek gürültü içeren flüoresans görüntü örneği (Florescence cell image under high noise level)



Şekil 3.7. Yüksek gürültü içeren bir başka flüoresans görüntü örneği (Floescence cell image under high noise level)



Şekil 3.8. Performas değerlendirme için kullanılan iki farklı hücre görüntüsü (Cell images used for performance comaparision)

Tablo 1. İki farklı görüntü için elde edilen sayım sonuçları

| Görüntüler: | Uzman sayım sonucu | [36] ile sayım sonucu | Sunulan yöntem ile sayım sonucu |
|-------------|--------------------|-----------------------|---------------------------------|
| 1 | 307 | 395 | 531 |
| 2 | 309 | 524 | 715 |

Tablo 2. [36] nolu referansa kıyasla sunulan yöntem ile elde edilen sayım sonuçları.

| Görüntüler: | [36] ile sayım sonucu | Sunulan yöntem ile sayım sonucu |
|-------------|-----------------------|---------------------------------|
| 1 | 509 | 615 |
| 2 | 284 | 396 |
| 3 | 564 | 696 |
| 4 | 388 | 500 |
| 5 | 330 | 388 |

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Bu çalışmada, 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 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 merkezinden alınan görüntüler üzerinde algoritma uygulanarak hücre sayımı yapılmıştır. Bu sayede ulaşılması zor olan sonuçlar bilgisayar tabanlı algoritma ile hızlı bir şekilde yüksek doğruluk ile elde edilmiştir. Bu çalışma ileride yapılacak çalışmalara bir yapıtaşı olacaktır. Sonraki çalışmalarda olasılıksal sistemler mevcut yönteme eklenerek hibrid modeller oluşturulacak ve bu alanda hem akademik hem de uygulama olarak öncü olamaya aday çalışmalar yapılacaktır. Ayrıca günümüzde oldukça büyük bir sorun haline gelen kanser hastalığının teşhis ve tedavisine de yardımcı olmak amacı ile 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.

KAYNAKÇA (REFERENCES)

- [1] G. Ghiaur, J. Gerber ve R.J. Jones, "Concise review: Cancer stem cells and minimal residual disease", *Stem Cells*, cilt 30, pp. 89-93, 2012.
- [2] J.M.D. Lamaziere, J. Lavallee, C. Zunino ve J. Larrue, "Semiquantitative study of the distribution of 2 cellular antigens by computer-directed color analysis", *Lab. Invest*, cilt 68, pp. 248-252, 1993.
- [3] S. Tseleni, N. Kavantzias, D. Yova, E. Alexandrou, V. Karydakias, J. Gogas ve P. Davaris, "Findings of computerised nuclear morphometry of papillary thyroid carcinoma in correlation with known prognostic factors", *J. Exp. Clin. Cancer Res.* cilt 16, pp. 401-407, 1997.
- [4] T. Aasen ve J.C.I. Belmonte, "Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells", *Nature Protocols*, cilt 5, no. 2, pp. 3171-382, 2010.
- [5] S. Erden, "Stem cells and clinical applications", *Journal of New Results in Engineering and Natural Science*, cilt 3, pp.1-8, 2014.
- [6] A.R. Akar, M. Arat, M. Beksac, A. Can, B.Z. Çamurdanoğlu, D.U. Çetinkaya, Y.M. Elçin, E. Kansu, D. Kırık, T. Özçelik, İ. Özden ve G. Şahin, *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, 20, Ankara, p. 113, 2009.
- [7] F.P. Barry ve M. Murphy, "Mesenchymal Stem Cells: Clinical applications and biological characterization", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, cilt 36, pp. 568-584, 2004.
- [8] S.İ. Delioğlu, M. Özen, P. Sözer, İ. Lüleci, "Kök hücreler ve doku mühendisliği", *Sağlıkta Birlik*, cilt 1, no. 5, pp. 143-168, 2009.
- [9] J.M. Geusebroek, "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.
- [10] V. Meas-Yedid, "Quantitative microscopic image analysis by active contours", in *Vision*

- Interface Annual Conference 2001 – Medical Applications, 2001.
- [11] J. Kittler ve J. Illingworth, “Minimum error thresholding,” *Pattern Recognition*, cilt 19, no. 1, pp. 41–47, 1986.
- [12] N. Otsu, “A threshold selection method from gray-level histograms,” *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, cilt 9, no. 1, pp. 62–66, 1979.
- [13] K. Wu, D. Gauthier ve M. Levine, “Live cell image segmentation,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, cilt 42, no. 1, pp. 1–12, 1995.
- [14] T. Markiewicz, “Myelogenous leukemia cell image preprocessing for feature generation”, in *5th International Workshop on Computational Methods in Electrical Engineering*, pp. 70–73, 2003.
- [15] M. Colley, F. Kommos, M. Bibbo, H.E. Dytch, W.A. Frnklin, J.A. Holt ve G.L. Wied, “Assessment of hormone receptors in breast carcinoma by immunocytochemistry and image analysis”, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* cilt 11, pp. 307-314, 1989.
- [16] J.M.D. Lamaziere, J. Lavallee, C. Zunino, J. Larrue, “Semi-quantitative study of the distribution of 2 cellular antigens by computer-directed color analysis”, *Lab. Invest.* cilt 68, pp. 248-252, 1993.
- [17] E.J. Goldlust, R.P. Paczynski, Y.Y. He, C.Y. Hsu ve M.P. Goldberg, “Automated measurement of infract size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains”, *Stroke* cilt 27, pp. 1657-1662, 1996.
- [18] S. Tseleni, N. Kavantzias, D. Yova, E. Alexandrou, V.Karydakias, J. Gogas ve P. Davaris, “Findings of computerised nuclear morphometry of papillary thyroid carcinoma in correlation with known prognostic factors”, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* cilt 16, pp. 401-407, 1997.
- [19] 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.* cilt 49, pp. 499-505, 1983.
- [20] 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.* Cilt 21, pp.271-282, 1992.
- [21] W.A. Franklin, M. Biddo, M.I. Doria, H.E. Dytch, J. Toth, E. DeSombre ve G.L. Wied, “Quantitation of estrogen receptor content in breast carcinoma by the MicroTICAS image analysis system”, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* cilt 9, pp. 279-286, 1987.
- [22] H.A. Lehr, K.D. Hansen, M.D. Coltera, J.C. Russ ve A.M. Gown, “Photoshop-based image analysis for the semiautomated assessment of Ki-67-defined proliferative activity in the routine diagnosis of bre”, *Appl. Immunohistochem.* cilt 4, pp. 117-127, 1996.
- [23] E. Sharipo, V. Hartanto ve H. Lepor, “Quantifying the smoothmuscle content of the prostate using double-immunoenzymatic staining and color assisted image analysis”, *J. Urol.* cilt 147, pp. 1167-1170, 1990.
- [24] H.A. Lehr, D.A. Mankoff, D. Corwin, G. Santeusano ve A.M. Gown, “Application of photoshop-based analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer”, *J. Histochem. Cytochem.* cilt 45, pp. 1559-1565, 1997.
- [25] H.A. Lehr, C.M. Van der Loos, P. Teeling ve A.M. Gown, “Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using photoshop-based image analysis”, *J. Histochem Cytochem.* cilt 47, pp. 199-225, 1999.
- [26] M.H. Deverell, J.R.Salisbury ve W.F. Whimster, “Comparisons of stains for image segmentation and measurement of nuclear parameters by computerised image analysis using IBAS 2000”, *Pathol. Res. Pract.* cilt 185, pp. 555-557, 1989.
- [27] P.D. Kohlberger, A. Obermair, G. Sliutz, H. Heinzl, H.Koelbl, G. Breiteneker, G. Gitsch ve G. Kainz, “Quantitative immunohistochemistry of factor VIII-related antigen in breast carcinoma”, *Am. J. Clin. Pathol.* cilt 105, pp. 705-710, 1996.
- [28] R.C.A. Gonzalez ve R.E. Woods, “Digital Image Processing, Addison-Wesley Reading”, MA, USA, 1992.
- [29] C. Garbay, G. Brugal ve C. Choquet, “Application of colored image analysis to bone

- marrow cell recognition”, *Anal. Quant. Cytol. cilt 4*, pp. 272-280, 1986.
- [30] J.A.W. van der Laak, M.M.M. Pahlplatz, A.G.J.M. Hanselaar ve P.C.M. de Wilde, “Hue-saturation-density (HSD) model for stain recognition in digital images from transmitted light microscopy”, *Cytometry, cilt 39*, pp. 275-284, 2000.
- [31] C.G. Loukas, G.D. Wilson, B. Vojnovic ve A. Linney, “Automated segmentation of cancer cell nuclei in complex tissue sections”, *SPIE, cilt 4158*, pp. 188-198, 2000.
- [32] T. Markiewicz, “Myelogenous leukemia cell image preprocessing for feature generation”, in *5th International Workshop on Computational Methods in Electrical Engineering*, pp. 70–73, 2003.
- [33] M. Goto, Y. Nagatomo, K. Hasui, H. Amanaka, S. Murashima ve E. Sato, “Chromaticity analysis of immunostained tumor specimens”, *Pathol. Res. Pract. cilt 188*, pp. 433-437, 1992.
- [34] A.C. Ruifrok, “Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding”, *Anal. Quant. Cytol. Histol. cilt 19*, pp. 107-113, 1997.
- [35] J. Smolle, “Optimization of linear image combination for segmentation in red green and blue images”, *Anal. Quant. Cytol. Histol. cilt 18*, pp. 323-329, 1996.
- [36] Geisa Martins Faustino et. al., “Automatic embryonic stem cells detection and counting in fluorescence microscopy images”, *Monografias em Ciência da Computação, cilt 04, no. 09, ISSN: 0103-9741*, 2009.