

Dijital Görüntü İşleme Teknikleri Kullanılarak Sperm Sayımında Yeni Bir Yaklaşım

İsmail BABAOĞLU^{a1}, Ferruh YILDIZ², Metin ÇAPAR³, Lütfiye ALP²

¹Selçuk Üniversitesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü,

²Selçuk Üniversitesi, Jeodezi ve Fotogrametri Mühendisliği Bölümü,

³Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, KONYA

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada sperm hücreleri için hücre sayımının genel problemlerinden bölütleme (segmentasyon) ve sayma problemine bir çözüm aradık. Çalışma bölütleme, eşik değer çıkartım (threshold extraction) ve nesne sayma (object count) tekniklerini temel almakta ve üreme hücrelerinin görüntüsünden el ile yapılan hücre sayımının çeşitli görüntü işleme teknikleri kullanılarak bilgisayar destekli olarak sayılmasını amaçlamaktadır. **Gereç ve Yöntem:** Çalışma görüntüleri Konya Selçuklu Hastanesinde ışık mikroskopun ile dijital fotoğraf makinesi kullanılarak elde edilmiştir. Kullanılan metod iki temel kısımda ele alınmaktadır. Birinci kısım mikroskop ve kamera yardımı ile alınan görüntülerin bölütlenmesi, ikinci kısım ise bölütlenmiş hücrelerin sayılmasıdır.

Bulgular: Çalışmaya özel değerlere sahip mean ve treshold filtreleri yardımı ile kullanılan görüntülerde sperm hücrelerinin baş kısımları sayılabilir hale getirilmiş ve geliştirilen algoritma ile sayılmıştır.

Sonuç: Sperm hücrelerinin sayılması için kullanılan bu metod parametreleri uygun hale getirildikten sonra nesne sayımı için de kullanılabilir. Çalışmada kullanılan görüntülerin tamamında tüm hücreler başarıyla sayılmıştır. ©2007, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Anahtar kelimeler: Sperm Sayımı, Hücre Sayımı, Nesne Sayımı, Dijital Görüntü İşleme

ABSTRACT

A New Approach in Sperm Count Using Digital Image Processing Techniques

Objective: In this study, we tried to find a solution for counting and segmentation problems which is one of the general problems of cell count for breeding cells. This study is based on segmentation and threshold extraction techniques and it is aimed to count breeding cells computer based by using various visual processing techniques of cell count conducted manually from the image of breeding cells.

Material and Method: The research images are obtained from Selçuklu Hospital in Konya using light microscope and digital camera. The method which is used can be divided into two parts. The first part is that the image is prepared for segmentation and the other is the segmentation and the counting of cells

Results: Head part of sperm cells had become countable from the images used with the help of mean and threshold filters which have special values for the study and those were counted with the developed algorithm.

Conclusion: As well as this method used for counting sperm cells also be used for object count after modifying the parameters. All cells were counted successfully in all images used in the study. ©2007, Fırat University, Medical Faculty

Key words: Sperm Count, Cell Count, Object Count, Digital Image Processing

Biyolojide temel problemlerden biri öznelilik çıkarma (feature extraction) ve sayma (counting) işlemleri için hücrelerin bölütlenmesidir. Bu konudaki elle yapılan çalışmalar bezdiricidir ve kesin olmayan ve öznel sonuçlar ortaya koymaktadır. Bilgisayar destekli değerlendirmeler bu konuda otomatik, nesnel ve hızlı ölçümler için güçlü bir araç olacağını ortaya koymuştur. Tipik bir biyolojik görüntü analiz sistemi bir sayısallaştırıcı (bir video kamera, tarayıcı, vb.) ile başlar ve görüntünün zenginleştirilmesi, hücrelerin bölütlenmesi ve sınıflandırma için öznelilik çıkartımı ile devam etmektedir (1).

Semen analizinin en önemli kısmını mikroskopik inceleme oluşturmaktadır. Laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmakta olan hemositometrelerin sperm sayım sonuçlarındaki doğruluğu bu aletlerdeki spermin konulduğu bölümün derinliğinin çok fazla olması nedeniyle tartışmalıdır .

Bunu önlemek amacıyla 1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından sperm sayımı için özel olarak tasarlanmış Makler sperm sayım kamerası kullanılmaktadır. Bu kameranın lam ve lameli arasında 10 mikron metrelik sabit bir hacim bulunmaktadır. Yüzeyi ise 0.1mm X 0.1mm boyutlarında 100 kareden oluşan bir ağ içerir. 10 küçük kare içerisindeki hücre sayısı sayılarak 1 milyon ile çarpılır. Bu sayı 1 mililitredeki hücre sayısını verir.

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) (2), kriterlerine göre yapılan bir sperm değerlendirilmesine normal denilebilmesi için sperm sayımının mililitrede 20 milyondan fazla, hareketliliğin %50'nin üstünde ve en az %70'nin görünüm normal olması gerekmektedir.

Normal morfolojiye sahip spermin ilk kez ayrıntılı tanımı ve ölçüleri Menkveld tarafından yapılmıştır. Daha sonra

^a Yazışma Adresi: Dr. İsmail BABAOĞLU, Selçuk Üniversitesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü Anabilim Dalı, Konya
Tel: +90 332 2233720 e-mail: ibabaoglu@selcuk.edu.tr

Kruger kesin kriterler getirerek spermin her bölümünü ayrı ayrı tanımlamıştır (3).

Hücre bölütlenmesi, etiketlenip sayılması üzerinde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Hans Netten ve arkadaşları 500 hücre için ortalama 20 dakika içerisinde her hücre çekirdeği içerisindeki nokta olarak gözükten etiketlenmiş kromozomların sayısını saymak amacıyla bir otomatik floresan mikroskop sistemi geliştirmişlerdir (4). Gerçekleştirdikleri bu çalışmada çekirdek içerisindeki noktaları sayma algoritmaları kısaca dört adımdan oluşmaktaydı; 1) Çekirdeğin olduğu bölgenin bulunması, 2) Bölgedeki çekirdeğin bulunması, 3) Çekirdekteki beneklerin bulunması, 4) Beneklerin sayılması ve tüm mikroskop slaytı için bir histogram yapılmasıdır.

Kenong Wu ve arkadaşları gerçek zamanlı hücre bölütlenmesi için ilk adımı hücre ve hücre yakınındaki yaklaşık arka plan parçasının çıkartılması ve ikinci adımı ise bu bölgedeki hücrenin arka plan kullanılarak bölütlenmesi olan iki aşamalı bir bölütleme stratejisi belirlemişlerdir (5).

Hai-Shan Wu ve arkadaşları sitoloji numunelerinden elde edilen göğüs ve rahim boynuna ait hücre görüntülerinin bölütlenmesi için uygun bir parametrik algoritma geliştirmişlerdir. Çalışmalarında hücreler için parametrik eliptik bir model tanıtılmaktadır ve hücre şekillerine uygunluk için bir bedel fonksiyonunu minimize eden parametreler ayarlanmıştır (6).

He W. Wilder ve arkadaşları kan hücrelerinin sayımı için otomatik bir hematoloji analiz sistemi geliştirmişlerdir. Bölümlendirilmiş çekirdek görüntülerine bağlı çekirdek şekli tanıma, hücre tipinin farklılıklarının anlaşılmasında ve olgunlaşmamış hücre sınıflandırmasında temel bir rol oynamaktadır. Geliştirdikleri algoritma dış hat yarıçapına ve eğrilik özniteliklerine bakarak hücreleri sınıflandırmaktadır (7).

Caetano ve arkadaşları kornea üzerindeki yaşayan endotel hücrelerin değerlendirilmesi ve sayılması üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bir kornea üzerinde mm² de 2500 ile 3000 arası hücre bulunduğundan bir cihaz yardımı olmadan bu hücreleri saymanın mümkün olmadığı için bu hücreleri özgün bir uygulama ile saymaktadırlar (8).

Fernandez ve arkadaşları hücrelerin morfolojik analizlerine ve eğiklik bilgisine dayanarak yeni bir bitki hücresi bölümlendirme algoritması geliştirmişlerdir (1).

Mussio ve arkadaşları histolojik karaciğer doku bölümlerindeki çeşitli hücrelerin ve biyolojik yapıların sayılması ve tanınması için yapıların ortaya çıkmasını sağlamak amacıyla birçok görüntü işleme operatörünü kullanan bir metod tanıtmışlardır (9).

Rubeto ve arkadaşları çalışmalarında Giemsa boyama şekli ile boyanmış kan lamalarının görüntülerindeki parazitleri değerlendirmek amacıyla bir sıtma görüntü işleme sisteminin bir kısmını açıklamaktadırlar. Hücre görüntülerinin bölümlendirilmesinde klasik "Watershed" tabanlı algoritması yerine çok daha doğru bir yaklaşım olan morfolojik yaklaşımı tanıtmışlardır (10).

Chen ve arkadaşlarının ışığın bitkilerin hareketi ile olan ilgisini (Photodynamic Therapy-PDT) araştırdıkları çalışmalarında görüntü işleme teknikleri yardımı ile geliştirdikleri görüntü bölümlenme tabanlı otomatik hücre sayma tekniği tanıtılmış ve insan sayma sonuçları ile karşılaştırılmıştır (11).

Yapılan bu çalışma el ile yapılan hücre sayımının çeşitli görüntü işleme teknikleri kullanılarak bilgisayar destekli olarak sayılmasını amaçlamaktadır. Metod olarak bir üreme hücreleri görüntüsünden elle yapılan hücre sayımlarının çeşitli görüntü işleme teknikleri kullanarak bilgisayar destekli olarak sayılmasına yönelik yeni bir teknik kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Üreme hücrelerinin bulunduğu görüntü işleme gerçekleştirilecek görüntüler Konya Selçuklu Hastanesindeki Olympus CX41RF ışık mikroskopundan HP 945 dijital kamera yardımıyla alınan görüntülerdir.

Örnekler, bir yıl boyunca düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen çocuk sahibi olamayan infertilite nedeni ile müracaat eden hastalardan seçilmiş ve ejakulat mastürbasyonla toplanmıştır. Toplanan bu örneklerde hastalar, sperm toplanmasından en az 48 saat en fazla 7 gün cinsel perhizde bulunmuşlardır.

Görüntüler uygulamanın süresini kısaltmak amacıyla normal boyutunun 1/5'i oranında küçültülerek 400x300 piksel boyutlarında 24 bit 96 dpi RGB formatında kullanılmıştır.

Çalışmada gri seviye görüntü işleme algoritmaları kullanıldığı için görüntülerin gri tona çevrilmesi gerekmektedir. Elde edilen görüntülerin 8 bit gri tona çevrilmesi için ITU standart gri ton hesaplama formülü (13) kullanılmıştır. Bu formüle göre pikselin gri değeri;

$$\text{Gri Değer} = (213 \times R) + 715 \times G + 72 \times B) / 1000$$

şeklinde hesaplanmaktadır.

Görüntünün kamera hataları, elektron mikroskobu ile kamera bağlantısından oluşabilecek hatalar ve ışık hataları gibi hatalardan arınması ve uygulama tarafından işlenebilir hale gelmesi için 3x3 çekirdek boyutlu Median Noise Reduction (13,14) filtresi 2 kez ard arda uygulanmıştır. Filtrenin ardına kullanılması daha iyi yumuşatma için elverişli bir yöntemdir.

Median filtresi uygulanmış görüntüye üreme hücrelerinin baş kısımlarının ayrık olarak görüntülenebilmesi ve bölütlenmesi için Eşik Değer (Threshold) (15) filtresi uygulanmıştır. Görüntüye uygulanan eşik değeri filtresinde eşik değeri 128 olarak alınmıştır. Bu durumda ortaya çıkan yeni görüntü binary (siyah-beyaz) bir görünüm şeklindedir.

Eşik değeri filtresi uygulanan görüntü için bölütlenmiş hücrelerin seçilmesi ve etiketlenmesi aşamasında geliştirdiğimiz yeni algoritma kullanılmıştır. Bu algoritmaya göre; görüntü üzerinde 3x3 boyutunda bir tarama operatör çalışmaktadır. Tarama operatörü görüntüyü tararken operatörün üzerinde çalıştığı 3x3'lük toplam 9 pikselden beyaz piksel sayısı yarıdan fazla ($>3 \times 3 / 2 = 4.5$) ya da başka bir deyişle 5 ve daha üstü beyaz piksele sahip olan bir konuma ulaştığında olası hücre varlığı araştırması için bulunduğu konumdan itibaren 2x2 boyutunda yeni bir operatör çalışmaktadır. Bu 2x2'lik operatör ise etiketleme operatörüdür. Çalışan etiketleme operatörü üreme hücresini baş kısmını temsil eden beyaz alanı taramakta ve mevcut beyaz alanları etiketlemektedir. Etiketleme operatörü çalıştığı konumdan itibaren görüntüyü tararken 2x2'lik toplam 4 pikselden beyaz piksel sayısı yarıya eşit ya da daha fazla ($\geq 2 \times 2 / 2 = 2$) başka bir deyişle 2 ve daha üstü beyaz piksele sahip bir konumda ise bu beyaz pikseller etiketlenmektedir.

Etiketleme işleminde ise iki durum bulunmaktadır. Eğer bu operatörün üzerinde bulunduğu etiketlenecek olan beyaz piksellerden daha önce etiketlenmiş olanı varsa etiketlenmemiş pikseller de daha önceden etiketlenen bu komşularının devamı olarak aynı numara ile etiketlenmektedirler. Eğer beyaz piksellerden daha önce etiketlenmiş olanı yoksa yeni bir etiket numarası ile etiketlenmektedirler.

2x2'lik etiketleme operatörünün beyaz pikselleri etiketlediği her durumda operatör 2 ya da daha fazla sayıda beyaz piksel bulduğu sürece bir piksel yukarıda, bir piksel aşağıda, bir piksel solda ve bir piksel sağda olmak üzere tekrar çalışmaktadır. Bu yeni çalıştığı her 4 konumda da aynı şart sağlandığı sürece etiketleme sürekli olarak devam etmektedir.

Özetlemek gerekirse; tarama operatörü görüntüyü enine ve boyuna tararken, olası hücre varlığını araştırmakta, mevcut bir durum için etiketleme operatörünü çalıştırmaktadır. Etiketleme operatörü ise geçerli şartlara sahip pikselleri etiketleyerek hücre piksel dizisini oluşturmaktadır.

Bu operatörler Şekil 1'de bir örnek üzerinde gösterilmiştir. Hücreleri oluşturan piksellerin konumları hücre piksel dizisinde bulunmaktadır. Bu hücre-piksel dizisi kullanılarak hücrelerin yoğunlukları ve merkezleri belirlenmiştir. Hücrenin yoğunluğu için toplam piksel sayısı, merkezi için ise toplam değerlerin ortalaması kullanılmıştır. Kullanılan algoritmanın akış diyagramı Şekil 2'de gösterildiği gibidir. Her temel adım sonucu oluşan görüntüler ise Şekil 3'de gösterilmiştir.

Kruger'in tanımladığı kriterlere göre normal sperm morfolojisinde baş kısmın avoid ve 2-3 μ eninde ve 4-5 μ boyunda olduğu görülmektedir. Burada ortalama olarak elips alan formülüne göre baş boyutları alanı yaklaşık 6.28 μ^2 ile 11.78 μ^2 arasındadır.

Elektron mikroskobu sperm hücre görüntülerini 1x100 ölçekle büyütmüş, kamera ise 8 kez analog 7 kez dijital toplam 56 kez büyütülmüştür. Ancak uygulama analiz süresinin kısalmaması açısından elde edilen görüntüler 400x300 piksel boyutlarına getirilmek için 5 kez küçültülmüştür. Buna göre görüntülenilen hücrelerin normal morfolojiye sahip olmaları için Kruger'in kriterlerine göre büyüklükleri yaklaşık 7.88 mm^2 ve 14.77 mm^2 arasında olmalıdır.

Analizde kullanılan görüntülerin 72 dpi yoğunlukta çekildiği göz önüne alınınca 1 pikselin sahip olduğu alan yaklaşık olarak 0.1244 mm^2 olarak hesaplanır.

Böylece görüntü içerisinde bulunan çeşitli piksel büyüklüklerine sahip hücrelerin Kruger'in kriterlerine göre normal morfolojiye sahip olmaları için toplam yoğunlukları yaklaşık olarak 63 (7.88/0.1244) piksel ve 119 (14.77/0.1244) piksel arasında olmalıdır.

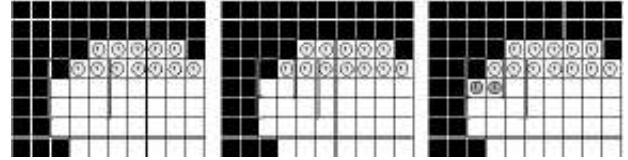
Buna göre çalışmamızda 63 piksel ile 119 piksel değer aralığı dışındaki piksel yoğunluğuna sahip olan hücreleri, Kruger'in tanımladığı kriterlere göre normal morfolojiye sahip olmaları gereken aralığın dışında oldukları için anomali olarak kabul ederek ihmal ettik.

BULGULAR

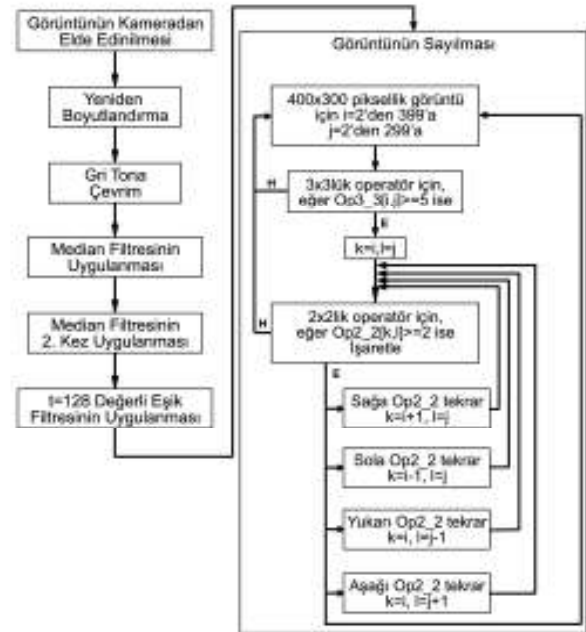
Çalışmaya özel değerlere sahip mean ve treshold filtreleri yardımı ile kullanılan görüntülerde sperm hücrelerinin baş kısımları sayılabilir hale getirilmiş ve bu görüntülerin tamamında tüm hücreler geliştirilen algoritma ile başarılı olarak sayılmıştır. Sayım işleminde yoğunluğu Kruger'in

tanımladığı kriterlere göre normal morfolojiye sahip olmaları gereken aralığın dışında olan hücreler anomali olarak kabul edilerek ihmal edilmiştir.

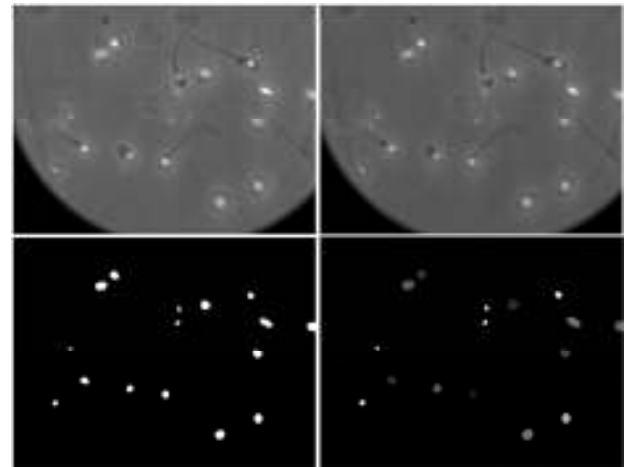
İnsan üreme hücrelerinin sayılması için uygulanan bu yöntem zemin rengi sabit görüntülerde nesne sayımı için de kullanılabilir, ancak nesnelerin ve görüntülerin özelliklerine göre uygulama parametreleri yeniden düzenlenmelidir.



Şekil 1. a) 3x3 boyutundaki hücre tarama operatörü, b) 2x2 boyutundaki hücre etiketleme operatörü, c) yeni piksellerin hücreye dahil edilmesi



Şekil 2. Akış Diyagramı



Şekil 3. a) Görüntünün elektron mikroskobundan alınan orijinal hali (sol-üst) b) görüntünün grileştirilmiş hali (sağ-üst), c) gri seviye görüntüye eşik değeri uygulanması sonucu oluşan siyah-beyaz görüntü, d) hücre sayımı ve bölütlemenin ardından sonra oluşan görüntü.

TARTIŞMA

Rutin olarak kullanılmakta olan kameraların lam ve lameli arasında 10 mikron'luk sabit bir hacim bulunmaktadır (10 mikrometre derinlikte). Yüzeyinde ise 0.1mm X 0.1mm boyutlarında 100 kareden oluşan bir ağ içerir. 10 küçük kare içerisindeki hücre sayısı sayılarak 1 milyon ile çarpılır. Bu sayı 1 mililitredeki hücre sayısını verir.

Mikroskopta görüntülenen semen örneğinde spermilerin sağlığından söz edebilmek için belirli sürelerde belirli miktarda hareket gözlenmesi de gerekmektedir. Ayrıca hareket kriterlerine uyan spermilerin sayısının %50'nin üstünde olması gerekmektedir. Çalışmamız hareketli görüntüler üzerinde değil sabit görüntüler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sperm sağlığı için gerekli olan hareketlilik ölçümü yapılamamıştır.

Hareketlilik ölçümü açısından spermilerin incelenmesi için sürekli görüntü analiz teknikleri kullanılabilir (realtime motion detection) ya da belirli zamanlarda belirli sıralarla alınan görüntülerin ayrı ayrı incelenmesi ve her bir sperm için etiketlenmesi sonucu oluşan farklı görüntülerdeki değişken analizlerin yapay sinir ağları/fuzzy/fuzzy-neuro gibi bir yapay zeka sistemi kullanılarak sağlıklı sperm hücrelerinin belirlenmesine çalışılabilir.

Çalışmamızda sperm hücrelerinin sayılması için belirgin olan baş bölgelerini kullandık. Bu nedenle orta ve kuyruk bölgeleri net olarak incelenememiştir. Sperm morfolojik yapısından kaynaklanan kuyruk, orta bölge vb. anomalilerin incelenmesi için kenar belirleme teknikleri, öznelik çıkartım algoritmaları (feature extraction) ve karma yapay zeka sistemleri kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Fernandez G, Kunt M, Zryd J-P. Multi- Spectral Based Cell Segmentation and Analysis. Physics-Based Modeling in Computer Vision, 1995; 166-172.
2. World Health Organisation, <http://www.who.int/en/> 15.05.2004
3. Şahintürk V. Subfertil Erkeklerin Sperm Morfolojilerinin Işık Mikroskopik Ve Floresan Yöntemlerle İncelenmesi. Doktora Tezi, Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2000.
4. Netten H, Young IT, Prins M, et al. Automation of Fluorescent Dot Counting in Cell Nuclei. Pattern Recognition, 1994;1:84-87
5. Wu K, Gauthier D, Levine MD. Live Cell Image Segmentation. IEEE Biomedical Engineering, 1995; 42: 1-12.
6. Wu H, Barba J, Gil J. A Parametric Fitting Algorithm for Segmentation of Cell Images. IEEE Biomedical Engineering 1998; 45; 400-407.
7. Wei He, Wilder J. Nucleus Shape Recognition for an Automated Hematology Analyzing System. EMBS/BMES Conference, 2002; 2: 1043-1044.
8. Caetano CAC, Ventura L, Sousa SJF, Lotufo RDA. Identification and Segmentation of Cell In Images of Donated Corneas Using Mathematical Morphology. Computer Graphics and Image Processing 2000; 344.
9. Mussio P, Pietrogrande M, Bottoni P, et al. Automatic Cell Count in Digital Images of Liver Tissue Sections. IEEE Computer-Based Medical Systems 1991; 153-160.
10. Di Rubeto C, Dempster A, Khan S, Jarra B. Segmentation of Blood Images Using Morphological Operators. Pattern Recognition 2000; 3: 397-400.
11. Chen Y, Biddell K, Sun A, Relue P, Johnson J. An Automatic Cell Counting Method for Optical Image. BMES/EMBS Conference 1999; 2: 819.
12. Charles P. Frequently Asked Questions about Color. 1997; <http://www.poynton.com/PDFs/ColorFAQ.pdf/> 15.05.2004.
13. Camus PP, Larson DJ. Median-style filters for noise reduction in composition analyses. Applied Surface Science 1993; 76-77: 416-423.
14. Adelman HG. An edge-sensitive noise reduction algorithm for image processing. Computers in Biology and Medicine 1999; 29-2: 137-145.
15. Yang F, Jiang T. Cell Image Segmentation with Kernel-Based Dynamic Clustering and an Ellipsoidal Cell Shape Model. Journal of Biomedical Informatics 2001; 34: 67-73.

Kabul Tarihi: 02.05.2007